

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**  
**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**Trabajo Final de la Lic. en Biotecnología y Biología Molecular**  
**EVALUACIÓN DE UN SISTEMA *EX VIVO* PARA EL ESTUDIO**  
**DEL TRANSPORTE DE LA HORMONA PLASMÁTICA**  
**GHRELINA A TRAVÉS DE LA BARRERA SANGRE-LÍQUIDO**  
**CEFALORRAQUÍDEO**

**Tesinista: Micaela D’Arcangelo**

**Director: Dr. Pablo Nicolás De Francesco**

**Codirector: Dr. Mario Perelló**

**Tutora: Dra. Maia Uriarte Donati**

# ÍNDICE

<b>EVALUACIÓN DE UN SISTEMA <i>EX VIVO</i> PARA EL ESTUDIO DEL TRANSPORTE DE LA HORMONA PLASMÁTICA GHRELINA A TRAVÉS DE LA BARRERA SANGRE-LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO</b>	1
AGRADECIMIENTOS	4
ABREVIATURAS	5
INTRODUCCIÓN	6
1. GHRELINA	7
1.1 Descubrimiento.	7
1.2 Estructura.	7
1.3 Expresión tisular.	9
1.4 Receptor.	9
1.5 Funciones.	10
1.6 Regulación de la secreción de la ghrelina.	10
2. EFECTOS DE LA GHRELINA A NIVEL CENTRAL	11
2.1 Blancos de la ghrelina en el hipotálamo.	11
2.2 Blancos de la ghrelina en el tallo encefálico.	13
2.3 Otros blancos de la ghrelina en el cerebro.	14
3. SISTEMAS DE TRANSPORTE DE PÉPTIDOS AL CEREBRO Y POSIBLES MECANISMOS DE ENTRADA DE LA GHRELINA PLASMÁTICA.	15
3.1 Barrera Hematoencefálica.	15
3.2 Órganos Circunventriculares	16
3.3 Barrera sangre-líquido cefalorraquídeo.	18
OBJETIVO GENERAL	24
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
MATERIALES Y MÉTODOS	25
ANIMALES EXPERIMENTALES.	26
PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES:	26
<b>1. Cirugías estereotáxicas intra-cerebro-ventriculares (ICV).</b>	26
<b>2. Extracción de Plexos Coroideos.</b>	27
<b>4. Prueba de viabilidad de los plexos coroideos.</b>	30
<b>5. Prueba de liberación de ghrelina.</b>	30

<b>6. Adquisición de imágenes.</b>	31
<b>7. Análisis de imágenes.</b>	31
<b>8. Análisis estadístico.</b>	33
RESULTADOS	34
<i>Capacidad de internalización de F-ghrelina por los plexos coroideos in vivo y su dependencia con la expresión de GHSR</i>	35
<i>Capacidad de internalización de F-ghrelina por explantes de plexos coroideos ex vivo y su dependencia con la expresión de GHSR</i>	37
<i>Evaluación de la utilidad del sistema de estudios ex vivo de explantes de plexos coroideos de ratón para estudiar diferentes aspectos mecánicos de la internalización y el transporte de ghrelina</i>	39
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	44
BIBLIOGRAFÍA	48

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer en primer lugar a mi familia, por darme todo lo necesario para poder haber llegado hasta acá, por todo el amor y la paciencia en mis peores momentos, por empujarme siempre a más y no dejarme nunca bajar los brazos.

Gracias a mis amigos de toda la vida, que fueron mi sostén y distracción durante todos estos años y estuvieron siempre presentes para mí. Y a mis nuevos amigos, aquellos que me dio la Facultad de Ciencias Exactas, les doy las gracias también por el apoyo, por hacerme sentir en casa y por enseñarme no sólo sobre temas de la facultad sino sobre la vida. Es un placer haber compartido la carrera con ustedes.

Agradezco enormemente a Mario Perelló, Nicolás De Francesco y Maia Uriarte Donati por abrirme las puertas del IMBICE, por su predisposición y por todas las horas que dedicaron a ayudarme para la realización de esta tesina.

Finalmente, le agradezco a la Universidad Nacional de La Plata por brindarme educación pública, gratuita y de calidad.

## ABREVIATURAS

$\alpha$ -MSH	hormona estimulante de melanocitos alfa
3V	tercer ventrículo
4V	cuarto ventrículo
AP	área postrema
ARC	núcleo arcuato
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
Acb	núcleo accumbens
AgRP	péptido relacionado con Agouti
BHE	barrera hematoencefálica
CART	transcripto regulado por cocaína y anfetamina
CRF	factor liberador de corticotropina
CVO	órgano circumventricular
DMN	núcleo dorsomedial
EM	eminencia media
GABA	ácido gamma-aminobutírico
GH	hormona de crecimiento
GHRH	hormona liberadora de la hormona de crecimiento
GHRP	péptidos liberadores de la hormona de crecimiento
GHS	secretagogo de la hormona de crecimiento
GHSR	receptor de secretagogos de la hormona de crecimiento
GI	tracto gastrointestinal
GOAT	ghrelina o-aciltransferasa
GPCR	receptor acoplado a proteína G
ICV	intra-cerebro-ventricular
IP	intra-peritoneal
LCR	líquido cefalorraquídeo
LHA	área hipotalámica lateral
NPY	neuropéptido Y
NTS	núcleo del tracto solitario
PBS	buffer fosfato salino
PC	plexos coroideos
PC1/3	prohormona convertasa 1/3
POMC	pro-opiomelanocortina
PVN	núcleo paraventricular hipotalámico
SNC	sistema nervioso central
VMN	núcleo ventromedial
VTA	área ventral tegmental
WT	salvaje

A horizontal rectangular banner with a dark background. The background is filled with numerous small, out-of-focus spots of blue and red light, resembling a microscopic view of stained cells. The word "INTRODUCCIÓN" is centered in the banner in a white, serif, all-caps font.

# INTRODUCCIÓN

## 1. GHRELINA

### 1.1 Descubrimiento.

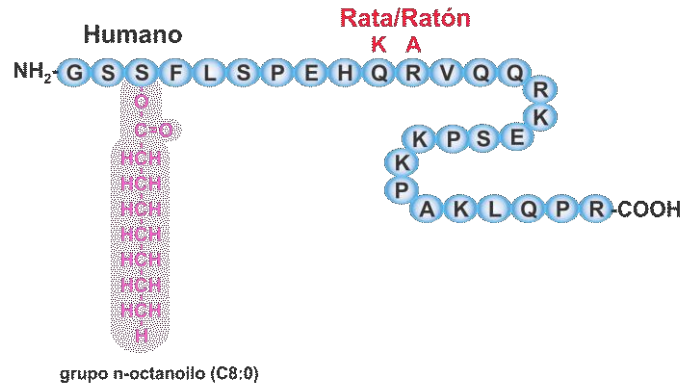
A finales de la década de 1970, el trabajo de Cyril Bowers y Frank Momany condujo a la generación de un grupo de derivados de péptidos opioides sintéticos que promovían la liberación de la hormona de crecimiento (*growth hormone*, GH) de la pituitaria anterior [1], [2]. Las moléculas que Bowers y Momany generaron se denominaron péptidos liberadores de GH (*GH-releasing peptides*, GHRP). Inicialmente, se pensó que estos GHRP actuaban solo sobre la hipófisis, pero pronto quedó claro que también actuaban sobre el núcleo arcuato hipotalámico (ARC)[3], específicamente sobre las neuronas productoras de la hormona liberadora de GH (*GH-releasing hormone*, GHRH) [4]. Se desconocía el mecanismo por el cual estas moléculas promovían la liberación de GH, pero era distinto del de la vía GHRH/somatostatina [3], [5]–[7]. En 1996, Roy Smith y Lex van der Ploeg emplearon un secretagogo de hormona del crecimiento (*growth hormone secretagogue*, GHS) para clonar el receptor de secretagogos de GH (*GH secretagogue receptor*, GHSR) [8], en el que se demostró que los GHS y los GHRP eran agonistas.

En los años siguientes, se realizaron extensos esfuerzos de investigación para identificar el ligando endógeno de GHSR. El ligando permaneció esquivo hasta 1999, cuando Kojima y sus colegas identificaron el agonista afín de GHSR. Purificado a partir de extractos de estómago de rata, el péptido se denominó "ghrelina", nombre proveniente del dialecto proto-indo-europeo, donde la raíz *ghre* significa crecimiento y el sufijo *relin* significa liberación, haciendo referencia a su capacidad de liberación de la GH[9] [10].

### 1.2 Estructura.

La ghrelina es un péptido de 28 aminoácidos, en el que la serina-3 (Ser3) está n-octanoilada (**Figura 1**), y esta modificación es esencial para su actividad. La ghrelina es el único caso conocido de una hormona peptídica modificada por un ácido graso[11].

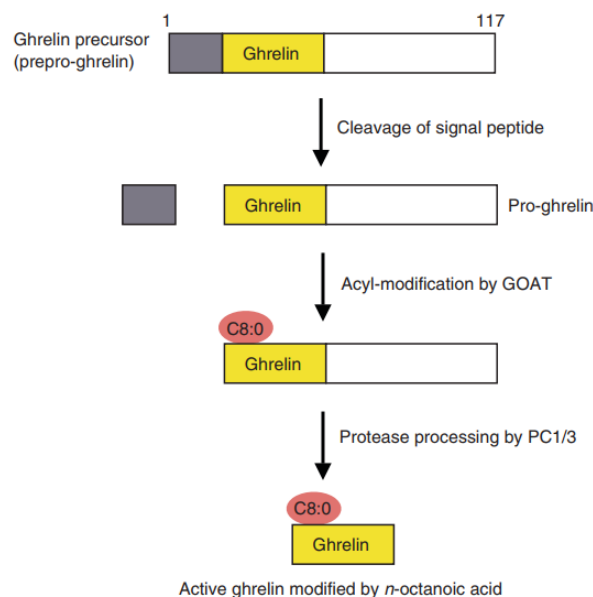
El precursor de ghrelina es un péptido de 117 aminoácidos denominado pre-pro-ghrelina, que consta de un péptido señal de 23 aminoácidos y un segmento de 94 aminoácidos correspondiente a la pro-ghrelina. La pro-ghrelina está constituida por una secuencia de 28 aminoácidos que corresponde a la ghrelina y por un péptido de 66 aminoácidos denominado C-ghrelina en el extremo C-terminal [9], [12]. La pro-ghrelina es procesada a ghrelina por la prohormona convertasa 1/3 (PC1/3) (**Figura 2**), que se expresa en células productoras de ghrelina[13], [14]. La ghrelina posee una acilación en el residuo Serina 3, esta reacción es catalizada por la enzima denominada ghrelina O-aciltransferasa (*ghrelin-O-acyl transferase*, GOAT). Esta modificación da lugar a la hormona ghrelina octanoilada madura de



**Figura 1. Esquema de la estructura de la ghrelina.** La hormona ghrelina está compuesta por 28 aminoácidos, de los cuales únicamente dos difieren en la ghrelina humana respecto de la ghrelina de rata o ratón. Además, contiene un grupo n-octanoilo unido a través de un enlace éster a la Serina 3, el cual es esencial para la unión a su receptor.

3371 Da. La GOAT es una enzima miembro de las O-aciltransferasa de membrana y la ausencia de la GOAT lleva a la ausencia completa de la ghrelina bioactiva en circulación [15], [16].

En el transcurso de la purificación de la ghrelina humana del estómago, también se aislaron otras formas del péptido. Estas podrían clasificarse en cuatro grupos según el tipo de acilación observado en Ser3: no acilado, octanoilado (C8:0), decanoilado (C10:0) y posiblemente decenoilado (C10:1). Todos los péptidos encontrados tenían 27 o 28 aminoácidos de longitud, y se derivan del mismo



**Figura 2. Pasos de procesamiento propuestos para ghrelina.** Después de eliminar el péptido señal, el precursor de ghrelina se modifica con un grupo acílico (principalmente ácido n-octanoico) por GOAT y se escinde mediante una proteasa de procesamiento PC1/3 para producir ghrelina activa.



precursor de ghrelina. Como fue el caso en la rata y del ratón, la forma activa principal de la ghrelina humana es un péptido de 28 aminoácidos con Ser3 octanoilada [11].

La ghrelina de rata y la de ratón difieren de la ghrelina humana en solo dos aminoácidos. La secuencia de aminoácidos de la ghrelina en mamíferos se encuentra bien conservada; en particular, los 10 aminoácidos en el extremo NH<sub>2</sub> son idénticos. Esta conservación estructural y el requisito universal de modificación con acilo del tercer residuo indican que esta región NH<sub>2</sub>-terminal es de importancia central para la actividad del péptido [11].

### **1.3 Expresión tisular.**

El ARNm de ghrelina se detecta de manera robusta en el tejido gástrico y también está presente en niveles bajos en el intestino, páncreas, riñones y placenta [9], [17], [18]. Las células productoras de ghrelina, antes denominadas células similares a X/A en roedores, están presentes desde el cuello hasta la base de las glándulas oxínticas en el fundus gástrico [19]. Estas células, que representan el 20% de la población de células endocrinas en las glándulas oxínticas, contienen gránulos redondos, compactos y electrodensos (aproximadamente 120 nm de diámetro) llenos de ghrelina.

### **1.4 Receptor.**

La ghrelina media sus acciones a través de la activación de su receptor específico GHSR, el cual se expresa en muchos tejidos centrales y periféricos [8], [20].

El GHSR pertenece a la familia de receptores acoplados a proteína G. Existen dos subtipos de GHSR como resultado de empalme alternativo: el subtipo 1a y el subtipo 1b. El GHSR1a es una proteína de 366 aminoácidos con 7 dominios transmembrana mientras que GHSR1b es una proteína de 289 aminoácidos con 5 dominios transmembrana [8]. El GHSR1a es el único receptor conocido de la hormona ghrelina. La ghrelina se une al GHSR1a a través de su extremo N-terminal, siendo esencial para esta unión el grupo n-octanoílo. Por otro lado, el GHSR1b no es activado por la ghrelina y aún no está clara su funcionalidad [8].

La principal cascada de señalización del GHSR1a es la vía  $G\alpha_q/PLC$  [8], [21]. La activación de GHSR1a lleva a la subsecuente activación de la enzima fosfolipasa C, producción de inositol trifosfato y diacilglicerol. El inositol trifosfato media el aumento del  $Ca^{+2}$  intracelular y el diacilglicerol activa a la proteína quinasa C. Por otro lado, se ha reportado que el GHSR1a también puede activar la vía  $G\alpha_{i/o}$  cuando actúa en forma constitutiva [22], [23].

El ARNm de GHSR1a es detectado en el cerebro (por ejemplo en varios núcleos del hipotálamo, hipocampo, sustancia nigra, área ventral tegmental, núcleos del rafe dorsal y mediano), la hipófisis anterior, los islotes pancreáticos, la glándula suprarrenal, la tiroides, el pulmón, el hígado, el riñón, las células inmunes, el intestino, el tejido adiposo y el miocardio [24], [25].

En contraste con la mayoría de los otros GPCR, GHSR1a exhibe una elevada actividad constitutiva independiente del ligando, lo que resulta en una alta activación basal de  $G\alpha_q$  (aproximadamente el 50% de su capacidad máxima) [26], [27].

### **1.5 Funciones.**

Las acciones de la hormona incluyen la modulación de la liberación de la hormona de crecimiento, la homeostasis de la glucosa, la regulación de respuestas relacionadas al estrés y el control de la motilidad gastrointestinal, entre otras [10], [28]–[30]. Una característica relevante de la ghrelina es su efecto orexigénico, siendo la hormona peptídica conocida más potente en estimular el apetito [31].

### **1.6 Regulación de la secreción de la ghrelina.**

El factor más importante que regula la secreción de ghrelina es la alimentación: la concentración plasmática de ghrelina aumenta en ayunas y disminuye después de la ingesta de alimentos [32], [33]. El nivel de glucosa en sangre puede ser crítico ya que la administración oral o intravenosa de glucosa disminuye la concentración de ghrelina plasmática [34], [35]. Sin embargo, la concentración plasmática de ghrelina es sensible a la composición de una comida: disminuye con una comida rica en lípidos y aumenta con una baja en proteínas [36], [37]. Además, la distensión mecánica del estómago no induce la liberación de ghrelina.

La concentración de ghrelina en plasma es baja en personas obesas y alta en personas delgadas [38]–[40]. En relación con este hecho, el nivel de ghrelina plasmático es muy elevado en pacientes con anorexia nerviosa y vuelve a niveles normales al aumentar de peso y recuperarse de la enfermedad [41], [42].

Los pacientes con bypass gástrico pierden peso y sus niveles de ghrelina disminuyen [40], [43]. Los cambios en la concentración de ghrelina asociados con la ingesta de alimentos disminuyen en estos pacientes, lo que confirma que el estómago es el sitio principal de producción de ghrelina. La concentración plasmática de ghrelina también disminuye en pacientes con síndrome del intestino corto, probablemente debido a la pérdida de tejidos productores de ghrelina [44].

El tratamiento exógeno con somatostatina y sus análogos, como octreótido, así como la infusión de urocortina-1, un péptido anorexigénico potente, suprimen la

concentración plasmática de ghrelina [45]–[47]. Sin embargo, la administración de leptina no modifica los niveles de ghrelina [48]. La insulina suprime la secreción de ghrelina a través de la vía PI3K-Akt [49].

La activación de los nervios simpáticos estimula la secreción de ghrelina, mientras que los antagonistas adrenérgicos la suprimen [50], [51]. Concordantemente, la ablación específica del receptor adrenérgico  $\beta 1$  en las células productoras de ghrelina inhibe la secreción de ghrelina y causa hipoglucemia severa con la restricción calórica [52]. Otro regulador clave de la secreción de ghrelina es la señalización quimiosensorial. La administración por sonda de agonistas del receptor del sabor amargo estimula la secreción de ghrelina, mientras que este efecto se atenúa en ratones knockout para  $\alpha$ -gustducina [53]. Además, la línea celular MGN3-1, que secretan ghrelina, detectan L-Phe, L-Ala y glutamato monosódico a través de sus respectivos receptores gustativos y aumentan la secreción ghrelina después de la exposición a estos aminoácidos [54].

El nivel de ghrelina circulante se ve alterado por la fase cefálica, como lo demuestra el aumento en el nivel de ghrelina cuando se anticipa la comida en un modelo fijo de alimentación con comida [55]. La secreción de ghrelina también está regulada por el sistema colinérgico: los agonistas y antagonistas colinérgicos aumentan y disminuyen los niveles plasmáticos de ghrelina, respectivamente [56], [57].

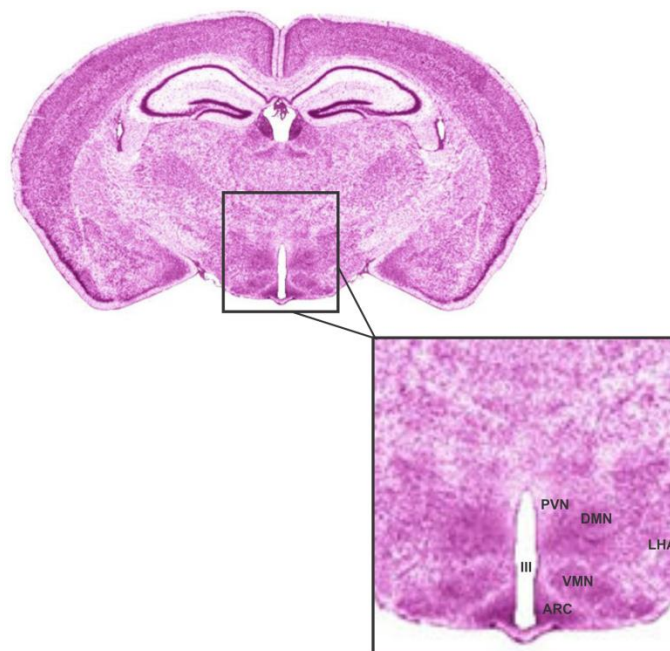
## **2. EFECTOS DE LA GHRELINA A NIVEL CENTRAL**

### **2.1 Blancos de la ghrelina en el hipotálamo.**

El hipotálamo está constituido por distintos núcleos hipotalámicos que incluyen el núcleo arcuato (ARC), el núcleo paraventricular (PVN), el área hipotalámica lateral (LHA), el núcleo dorsomedial (DMN) y el núcleo ventromedial (VMN), entre otros **(Figura 3)**.

El ARC es un área muy importante del SNC involucrada en el control de la homeostasis energética. Se encuentra debajo del VMN, a ambos lados del tercer ventrículo e inmediatamente adyacente a la eminencia media (EM). Este área tiene una barrera hematoencefálica (BHE) semipermeable y, por lo tanto, está estratégicamente posicionada para detectar las fluctuaciones hormonales y de nutrientes en el torrente sanguíneo. En el ARC, hay al menos dos poblaciones principales de neuronas que controlan el apetito y el gasto de energía: i) una población de neuronas que co-expresan los péptidos orexigénicos: péptido relacionado con el gen Agouti (agouti-related peptide, AgRP) y neuropéptido Y (NPY) y ii) una población de neuronas que co-expresan péptidos anorexigénicos: transcrita regulado por cocaína y anfetamina (CART) y hormona estimulante de

melanocitos alfa ( $\alpha$ -MSH, un producto del procesamiento de pro-opiomelanocortina (POMC)) [58].



**Figura 3. Núcleos hipotalámicos en corte coronal de cerebro de ratón.** PVN: núcleo paraventricular hipotalámico; DMN: núcleo dorsomedial; LHA: área hipotalámica lateral; VMN: núcleo ventromedial; ARC: núcleo arcuato; III: tercer ventrículo ventral.

Distintas evidencias muestran que los incrementos agudos de ghrelina plasmática pueden alcanzar la región ventromedial del ARC, que está enriquecida en neuronas que expresan GHSR. El blanco principal de la ghrelina dentro del ARC son las neuronas que sintetizan el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) y los neuropéptidos orexigénicos AgRP y el NPY [59]. La ghrelina requiere la presencia de estas neuronas en el ARC para aumentar la ingesta de alimentos [60], y la presencia de GHSR exclusivamente en estas neuronas es suficiente para restaurar la ingesta de alimentos inducida por ghrelina [61]. Sin embargo, los ratones sometidos a ablación del ARC no aumentan la ingesta de alimentos en respuesta a la ghrelina administrada por vía subcutánea, pero responden completamente a los efectos orexigénicos de la hormona administrada de forma central [62]. Por tanto, el ARC surge como un mediador clave de los efectos orexigénicos agudos de la ghrelina inyectada sistémicamente, aunque existen otros blancos de ghrelina en el cerebro que podrían explicar parte de los efectos de esta hormona cuando se la administra de forma central.

Otro núcleo hipotalámico blanco para la ghrelina es el PVN. La ghrelina plasmática puede atravesar la barrera sangre-líquido cefalorraquídeo (LCR) y llegar al LCR, desde donde la hormona puede acceder a las regiones cerebrales periventriculares, incluido el PVN. El PVN se encuentra adyacente a la parte dorsal del tercer ventrículo y contiene una variedad de tipos neuronales, incluidas las

neuronas hipofisiotrópicas productoras del factor liberador de corticotropina (CRF) que se proyectan a la EM y controlan la actividad del eje hipotálamo-hipófiso-adrenal. Además, las neuronas CRF reciben inervaciones de distintos sitios del cerebro, siendo reguladas por neurotransmisores como GABA, glutamato, NPY, catecolaminas y serotonina [63]. Los incrementos endógenos de ghrelina plasmática activan las neuronas CRF del PVN. En el PVN, la ghrelina no actúa sobre las neuronas CRF, que carecen de GHSR, sino que las activa indirectamente mediante la inhibición de la liberación local de GABA [61], [62], [64]. Por tanto, la activación de las neuronas CRF inducida por ghrelina puede producirse de forma independiente del ARC a pesar de que las neuronas del PVN reciben una fuerte inervación del ARC [62]. Por ende, la ghrelina parece regular las respuestas orexigénicas y relacionadas con el estrés a través de circuitos neuronales independientes.

## **2.2 Blancos de la ghrelina en el tallo encefálico.**

Las neuronas del tallo encefálico realizan contribuciones claves al control del equilibrio energético procesando la información del estado energético en cuatro niveles diferentes: i) detectando los metabolitos circulantes y las hormonas liberadas por los órganos periféricos; ii) recibiendo impulsos vagales del tracto gastrointestinal (GI); iii) recibiendo señales neuronales de los núcleos del mesencéfalo y el prosencéfalo que también detectan e integran señales relacionadas con la energía; y iv) proyectando en los circuitos locales del propio tronco cerebral y otras regiones del cerebro para proporcionar información que será integrada por estas neuronas para controlar el equilibrio energético. Dentro del tronco encefálico, el complejo dorsal del vago es un módulo clave para la integración de señales relacionadas con la energía al depender de señales periféricas a través de aferencias vagales y proyectarlas hacia el hipotálamo y otras áreas relevantes. El complejo dorsal del vago comprende el núcleo motor dorsal del vago, el núcleo del tracto solitario (NTS) y el área postrema (AP), que tiene una BHE especializada que permite el pasaje de señales periféricas [58].

El AP es otro blanco importante de la ghrelina plasmática. El AP es un órgano circunventricular (CVO) ubicado en la superficie dorsal de la médula, justo por encima del cuarto ventrículo. Contiene una gran variedad de tipos neuronales, principalmente glutamatérgicas y GABAérgicas. El AP controla las funciones del sistema nervioso autónomo, como la función cardiovascular, el equilibrio de líquidos y el equilibrio energético [65]. El AP inerva densamente al NTS, que es un centro integrador importante dentro del tronco cerebral. El NTS se puede dividir en NTS rostral, que recibe principalmente aferencias gustativas y orotáctiles, y NTS caudal que recibe aferencias cardiovasculares, viscerales y respiratorias a través del nervio vago [66]. Tanto el AP como el NTS están enriquecidos en neuronas que expresan GHSR [20], [28], [67], [68]. La ghrelina inyectada por vía subcutánea llega

al AP, donde activa las neuronas que expresan GHSR, pero no accede al NTS [28]. Se ha descrito que esto se debe a la presencia de una barrera llamada *funiculus separans*, que actúa como una barrera física que evita que el NTS perciba cambios rápidos de ghrelina plasmática. En apoyo de esta idea, se ha encontrado que la ghrelina administrada periféricamente no activa el c-Fos en el NTS de los animales sometidos a ablación del AP, mientras que si lo hace en animales con el AP intacta [69]. En el AP, la ghrelina actúa sobre las neuronas GABAérgicas que son necesarias para el vaciamiento gástrico inducido por ghrelina pero no para la ingesta de alimentos inducida por ghrelina [28]. Además, la acción de la ghrelina en el AP regula la secreción de proteínas pancreáticas [69]. En conjunto, el AP parece ser un componente crítico de la médula que detecta cambios en las concentraciones plasmáticas de ghrelina y luego transmite esta información al NTS, que regula diversas funciones autónomas.

### **2.3 Otros blancos de la ghrelina en el cerebro.**

Algunos estudios indican que la ghrelina inyectada sistémicamente también impacta en algunas áreas del cerebro distantes de los CVOs o del sistema ventricular. Un ejemplo de esto es la vía mesolímbica, que conecta el área ventral tegmental (VTA) y el núcleo accumbens (Acb) e interviene en la regulación de los procesos cognitivos asociados a la recompensa. El VTA se localiza en la base del mesencéfalo y está compuesto principalmente por neuronas dopaminérgicas que se proyectan al Acb, ubicado en el estriado ventral [70], [71]. Se sabe que la ghrelina actúa sobre la vía mesolímbica y regula una variedad de comportamientos relacionados con la recompensa en ratones [72]–[77]. Dentro de la vía mesolímbica, las neuronas que expresan GHSR se encuentran principalmente en el VTA [20], [68], y la administración intra-VTA de ghrelina en ratones aumenta la ingesta de alimentos, la ingesta de alcohol, la actividad locomotora y las conductas sexuales [73], [78]–[80]. El hallazgo de que la administración intra-VTA de un antagonista de GHSR bloquea los efectos orexigénicos de la ghrelina inyectada sistémicamente en ratas se ha considerado una indicación de que la hormona circulante puede alcanzar el VTA [81]. Sin embargo, actualmente no existe evidencia directa que demuestre que la ghrelina plasmática pueda alcanzar dicho núcleo. Diversas evidencias muestran que la ghrelina inyectada sistémicamente modula algunos comportamientos relacionados con la recompensa en los roedores, pero los mecanismos por los cuales el sistema mesolímbico detecta las fluctuaciones de la ghrelina plasmática siguen siendo una pregunta intrigante sin respuesta que merece más estudios.

La circunvolución dentada del hipocampo de ratón también expresa GHSR [20], [67], [82]. El hipocampo es una estructura cortical ubicada en el lóbulo temporal medio del cerebro. La inyección central (intra-cerebro-ventricular, ICV) de ghrelina en ratas y ratones mejora el desempeño en tareas relacionadas con los

procesos de aprendizaje y memoria [83], [84]. Algunas evidencias en ratones sugieren que la ghrelina circulante actúa en el hipocampo [85]–[91].

### **3. SISTEMAS DE TRANSPORTE DE PÉPTIDOS AL CEREBRO Y POSIBLES MECANISMOS DE ENTRADA DE LA GHRELINA PLASMÁTICA.**

La ghrelina no se sintetiza en el sistema nervioso central [92]; por lo tanto, la ghrelina plasmática debe transportarse al cerebro para poder acceder a sus blancos neuronales [93]. Las hormonas peptídicas pueden acceder al cerebro cruzando la **barrera hematoencefálica**, difundiéndose a través de los capilares fenestrados en los **órganos circunventriculares** o cruzando la **barrera sangre-LCR**.

#### **3.1 Barrera Hematoencefálica.**

Los péptidos plasmáticos no pueden acceder libremente al cerebro debido a la presencia de la BHE presente en la mayoría de los capilares cerebrales. La BHE es crucial para mantener la homeostasis cerebral y proporcionar un entorno estable. La BHE está formada por células endoteliales que recubren las paredes de los vasos y por células murales que rodean a las células endoteliales [94]. Las células endoteliales impiden la libre difusión de moléculas al cerebro porque están conectadas por uniones estrechas que sellan las células adyacentes [94]. Las células murales incluyen células de músculo liso vascular y pericitos, que están incrustados en la membrana basal vascular. Las células endoteliales de la BHE pueden transportar péptidos al cerebro a través de transportadores de membrana específicos o a través de endocitosis mediada por receptores o mediada por adsorción y subsecuente transcitosis [94], [95].

El transporte de ghrelina al cerebro se ha investigado utilizando diferentes estrategias. El trabajo inicial de Banks y sus colegas utilizó ghrelina radiactiva, en la que se introdujo <sup>131</sup>I mediante la halogenación del residuo de histidina 9. Este estudio fundamental investigó el transporte de ghrelina de ratón y de ghrelina humana radiactivas al cerebro de ratones. El flujo de entrada de estos péptidos desde la sangre al cerebro se evaluó usando análisis de regresión lineal múltiple de la proporción de radiactividad cerebro/sangre en muestras de ratones inyectados por vía intravenosa con los marcadores. El flujo de salida del cerebro a la sangre se estimó analizando la radiactividad restante en el cerebro en diferentes momentos en muestras de ratones a los que se les inyectaron centralmente (ICV) los marcadores. Además, la penetración de los marcadores en el cerebro se estimó utilizando el método de depleción capilar, en el que los vasos sanguíneos se extraen de los tejidos cerebrales homogeneizados. El estudio encontró que ambas variantes de ghrelina difieren en su grado de acceso al cerebro y su mecanismo de

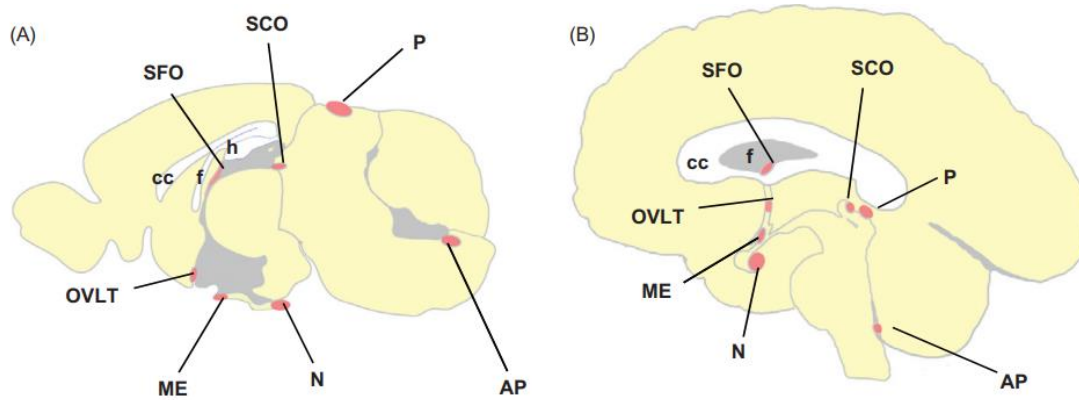
transporte. La ghrelina humana se transportó a través de un sistema saturable en las direcciones sangre a cerebro y cerebro a sangre, mientras que la ghrelina de ratón sólo se transportó en la dirección de cerebro a sangre a través de un mecanismo saturable. Este estudio concluye que únicamente la ghrelina humana puede acceder al cerebro desde la sangre a través de la BHE en el ratón, mientras que la ghrelina de ratón no es capaz de acceder al cerebro cruzando la BHE. Otro estudio mostró que la mayor absorción de  $^{131}\text{I}$ -ghrelina inyectada sistémicamente ocurre en la corteza occipital, en los bulbos olfatorios y en el hipotálamo, en ese orden, y que la absorción de ghrelina en el hipocampo es similar a la absorción en todo el cerebro [85]. Otros estudios observaron que el transporte de  $^{131}\text{I}$ -ghrelina humana al cerebro se afecta por el estado fisiológico, disminuyendo en ratones obesos y siendo promovido por hipertrigliceridemia, y que el transporte a través de la BHE es independiente de la presencia de GHSR [96], [97]. Además, otro estudio observó que la  $^{131}\text{I}$ -ghrelina interactúa con las células endoteliales de microvasos cerebrales RBE4 [97]. En particular, una fracción ( $\sim 6,6\%$ ) de  $^{131}\text{I}$ -ghrelina añadida al medio de cultivo permaneció unida a la superficie celular y dicha unión disminuyó durante el tiempo de incubación. Este estudio también mostró que una fracción ( $\sim 2,5\%$ ) de  $^{131}\text{I}$ -ghrelina fue endocitada y liberada intacta, y que un exceso de ghrelina sin marcar bloqueó ambos procesos, lo que sugiere que los mismos ocurren de manera saturable. **(Figura 5)**.

### 3.2 Órganos Circunventriculares

Los péptidos plasmáticos también pueden acceder al cerebro a través de los CVOs, áreas del cerebro que se caracterizan por la ausencia de BHE ya que el endotelio de los capilares de estas regiones se encuentra fenestrado [86], [98], [99]. Las células endoteliales de los capilares fenestrados tienen poros de  $\sim 30\text{-}80$  nm de diámetro que atraviesan las células y permiten la difusión pasiva de moléculas según su tamaño y carga [87].

Los CVOs están separados del tejido cerebral por células ependimarias modificadas, y se considera que desempeñan un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis del cuerpo a través de regular la comunicación sangre-cerebro [88], [100]. Dependiendo de su función, los CVOs se clasifican en sensoriales y secretores [89]. El órgano subfornical, el AP y el órgano vascular de la lámina terminal son los CVOs sensoriales, que pueden transmitir información a otras regiones del cerebro y al sistema nervioso autónomo a través de la detección de moléculas plasmáticas. La glándula pineal, la eminencia media (EM), la neurohipófisis y el órgano subcomisural entran en la categoría de CVOs secretores, ya que secretan péptidos y glicoproteínas a la sangre. Además de estos, algunos autores consideran a los plexos coroideos como un CVO por tener capilares fenestrados **(Figura 4)**.





**Figura 4.** Representación esquemática de una sección sagital de cerebro de ratón (A) y humano (B) que muestra la ubicación de los CVOs. AP, área postrema; ME, eminencia media; N, neurohipófisis; P, glándula pineal; OVLT, órgano vascular de la lámina terminal; SCO, órgano subcomisural; SFO, órgano subfornical [105].

La EM se localiza debajo del tercer ventrículo y se encuentra limitada lateralmente por el ARC, posterior al quiasma óptico y rostral al infundíbulo [91], [101]. La EM se puede dividir en una zona interna y una externa. La zona interna contiene los axones de las neuronas magnocelulares del núcleo supraóptico y del PVN que proyectan hacia la neurohipófisis. La zona externa contiene capilares fenestrados contorneados del sistema porta-hipofisario y terminales axónicas de las neuronas hipofisiotrópicas neurosecretoras que se encuentran en regiones hipotalámicas protegidas por la BHE. Los capilares hipofisarios no solo reciben moléculas liberadas por neuronas hipofisiotrópicas y las transportan a la adenohipófisis, sino que también permiten la difusión de moléculas plasmáticas hacia el espacio perivascular cercano [91], [101]. Llamativamente, algunos capilares hipofisarios fenestrados se ramifican a la región ventromedial del ARC, donde las moléculas plasmáticas también pueden difundir [99].

El AP es un CVO sensorial ubicado en la médula, justo dorsal al cuarto ventrículo y al canal central. El AP se puede dividir en 3 zonas denominadas: manto, central y ventral. El manto y la zona central constan de glía, neuronas, capilares fenestrados enrevesados y espacios de Virchow-Robin, que están ubicados perivascularmente y permiten que las células del AP que rodean los capilares interactúen con las moléculas plasmáticas durante largos períodos de tiempo [102]. Las neuronas del AP expresan una serie de receptores para factores plasmáticos, incluida la ghrelina, y envían proyecciones a otras áreas del cerebro, como el NTS, para modular la actividad del sistema nervioso autónomo [65]. La zona ventral del AP contiene principalmente glía y una barera de tanicitos conectados por uniones estrechas, identificado como el *funiculus separans*, que limita el AP y lo separa del NTS adyacente [65].

El transporte de ghrelina al cerebro también se ha investigado utilizando marcadores de ghrelina fluorescentes, los cuales requieren modificaciones

estructurales para incorporar el fluoróforo. Las variantes fluorescentes de ghrelina se basan en modificaciones en el extremo C-terminal del péptido y, en consecuencia, muestran una afinidad de unión a GHSR y una bioactividad similar a la de la ghrelina nativa [82], [103], [104]. El uso de marcadores fluorescentes permite realizar estudios neuroanatómicos precisos así como estimar la cantidad de marcador en el cerebro cuantificando directamente la fluorescencia. Los marcadores fluorescentes han proporcionado información interesante sobre las rutas que transportan la ghrelina al cerebro del ratón. Schaeffer y sus colegas inyectaron ghrelina fluorescente intacta (3,8 kDa) por vía intravenosa en ratones y luego analizaron *in vivo* la tasa de extravasación del marcador en la EM utilizando un microscopio multifotónico de larga distancia de trabajo [105]. El estudio encontró que la ghrelina plasmática difunde a través de los capilares fenestrados ubicados en la EM. En particular, la ghrelina fluorescente inyectada sistémicamente rápidamente accedió al ARC, donde se unió a neuronas orexigénicas que se encuentran cerca de los capilares fenestrados, mientras que no marcó las regiones del cerebro protegidas por la BHE, como el hipocampo [105], [106]. En un estudio independiente se utilizó como marcador fluoresceína-ghrelina (de aquí en adelante llamado F-ghrelina) que contiene los 19 residuos iniciales de la secuencia de ghrelina conjugada con isotiocianato de fluoresceína en el extremo C-terminal (2.7 kDa) para investigar las áreas del cerebro donde accede la ghrelina plasmática. Se inyectó de manera subcutánea a ratones con diferentes dosis de F-ghrelina y luego se analizó la presencia del marcador junto con la inducción del marcador de activación neuronal c-Fos [62]. En estos estudios se encontró que la ghrelina inyectada en una dosis de 60 pmol/g de peso corporal alcanza exclusivamente la región EM/ARC e induce la expresión de c-Fos solo en el ARC. Esta dosis induce un aumento de ~2 veces en los niveles de ghrelina plasmática 30 minutos después del tratamiento y aumenta la ingesta de alimentos. Por el contrario, la ghrelina inyectada en una dosis de 600 pmol/g de peso corporal, alcanza las regiones EM, ARC, AP y PVN e induce la expresión de c-Fos no sólo en el ARC y el AP sino también en el PVN y NTS. Esta dosis, a diferencia de la anterior, induce un aumento de ~17 veces en los niveles de ghrelina plasmática 30 minutos después del tratamiento. Por lo tanto, el uso de marcadores fluorescentes indica que la ghrelina plasmática puede atravesar los capilares fenestrados y acceder al cerebro a través de algunos CVOs. **(Figura 5)**.

### 3.3 Barrera sangre-líquido cefalorraquídeo.

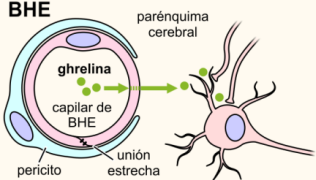
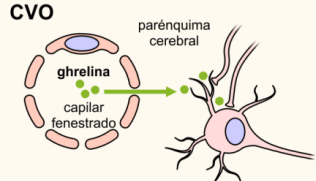
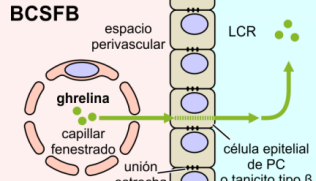
Los péptidos plasmáticos también pueden acceder al cerebro a través del LCR, después de cruzar la barrera sangre-LCR, que es una interfaz compleja entre la sangre y el LCR [101]. La barrera sangre-LCR está formada por los plexos coroideos y los tanicitos hipotalámicos. Ambos tipos celulares poseen uniones estrechas, lo cual les confiere la capacidad de actuar como barrera [107], [108]. Los **plexos coroideos** se encuentran en los ventrículos laterales, en el tercer

ventrículo dorsal y en el cuarto ventrículo del cerebro y están formados por células epiteliales cuboidales especializadas que rodean un cúmulo de capilares fenestrados. Los plexos coroideos producen LCR y regulan su composición controlando el paso de moléculas desde la sangre [109]. Los **tanicitos hipotalámicos** que forman la barrera sangre-LCR se clasifican como de tipo  $\beta$  y son células bipolares que poseen un cuerpo apical (localizado en la pared del ventrículo), una prolongación (que proyecta hacia la zona externa de la EM) y una zona terminal o *endfeet* basal que contacta con capilares fenestrados. Por lo tanto, los tanicitos de tipo  $\beta$  forman una barrera que une el LCR dentro del tercer ventrículo con la sangre que irriga el sistema porta-hipofisario [91]. Los tanicitos de tipo  $\beta$  no solo controlan la liberación de neuropéptidos de los axones terminales presentes en la EM, sino que también transportan hormonas circulantes al LCR [91], [110].

La F-ghrelina y la ghrelina fluorescente intacta inyectadas por vía subcutánea se internalizan en los tanicitos de tipo  $\beta$  y en las células de los plexos coroideos de los ratones adultos, lo que sugiere que la ghrelina también accede al cerebro cruzando la barrera sangre-LCR [93], [111]. Las concentraciones de ghrelina en el LCR son significativamente menores que en el plasma, una indicación de que la hormona no se mueve libremente en la dirección de la sangre al LCR [112], [113]. Grousselle y sus colegas investigaron la relación entre los niveles de ghrelina en plasma y LCR en ovejas [114] y encontraron que los niveles de ghrelina en el LCR son pulsátiles y que alrededor de la mitad de los picos de los niveles de ghrelina en el LCR ocurren después de un pico en el nivel de ghrelina en plasma. Este estudio también encontró que los niveles de ghrelina en el LCR aumentan posteriormente al aumento de los niveles de ghrelina en plasma en ovejas inyectadas por vía intravenosa con ghrelina (~ 330 nmol/animal). En otro estudio realizado en el IMBICE, se encontró que la F-ghrelina inyectada sistémicamente (60 pmol/g de peso corporal) se localiza en tanicitos hipotalámicos a los 15 minutos post-tratamiento [62]. Collden y sus colegas confirmaron además la presencia de fluorescencia en tanicitos de crías de ratón inyectadas por vía intravenosa con ghrelina fluorescente intacta (25 nmol/cría), a los 5 minutos después del tratamiento [115]. Usando cultivos primarios de tanicitos de rata, este estudio también encontró que la ghrelina fluorescente intacta se internaliza a través de vesículas recubiertas de clatrina, en las que la ghrelina permanece intacta. Se realizó un análisis de respuesta en el tiempo de la presencia de F-ghrelina en el hipotálamo de ratones adultos inyectados por vía subcutánea con F-ghrelina y se descubrió que el marcador alcanza rápidamente las regiones hipotalámicas ubicadas en aposición a la EM y más lentamente alcanza el parénquima periventricular [111]. También se encontró que la concentración de ghrelina aumenta en el LCR de ratones inyectados de manera subcutánea con esta hormona (300 pmol/g de peso corporal) y que las maniobras dirigidas a restringir el acceso de ghrelina al LCR o la acción de la ghrelina en el LCR bloquean parcialmente su

efecto orexigénico [111]. Por lo tanto, una fracción de ghrelina plasmática puede ser transportada selectivamente por células de la barrera sangre-LCR al LCR. La monocapa de células endoteliales que recubre los ventrículos carece de uniones estrechas, por lo que la ghrelina presente en el LCR puede difundir al parénquima cerebral periventricular y alcanzar las neuronas que expresan GHSR para mediar algunos efectos [82], [93], [111]. Dado que los niveles de ghrelina en el LCR están sujetos a una regulación dinámica, que depende de los niveles de ghrelina en plasma [113], [114], parece probable que las condiciones en las que los niveles de ghrelina en plasma son crónicamente altos también muestren incrementos de los niveles de ghrelina en el LCR que pueden afectar la función cerebral.

Es importante mencionar que el transporte de ghrelina plasmática al cerebro a través de la BHE y de la barrera sangre-LCR parece implicar mecanismos saturables, mientras que la extravasación de ghrelina plasmática al cerebro a través de los capilares fenestrados implica una difusión pasiva (**Figura 5**). Dado que la detección de variantes fluorescentes de ghrelina en cerebro de ratón requiere la administración sistémica de altas dosis de los marcadores, tales condiciones experimentales podrían saturar los mecanismos de transporte y favorecer la visualización de ghrelina en áreas cerebrales en las que su accesibilidad ocurre de manera menos restringida. Por lo tanto, la ausencia de

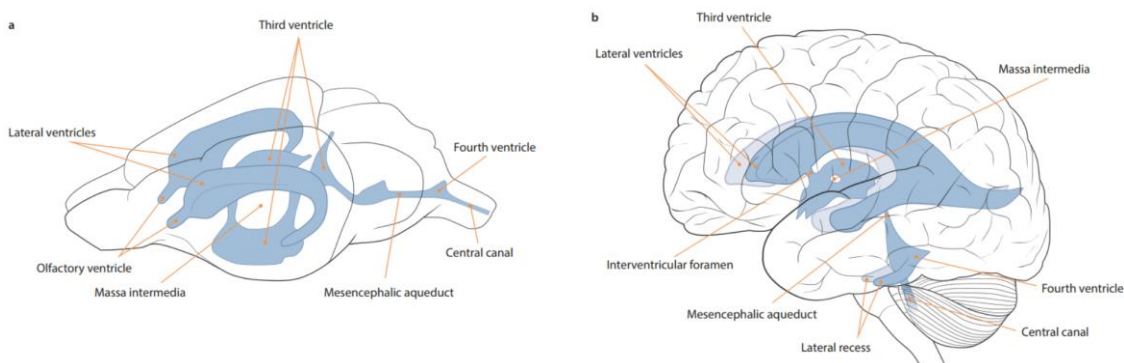
Mecanismos potenciales que median el acceso de ghrelina al cerebro	Evidencia directa a favor / en contra
<p><b>BHE</b></p>  <p>parénquima cerebral ghrelina capilar de BHE pericito unión estrecha</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ La <sup>131</sup>I-ghrelina de ratón inyectada sistémicamente mostró una tasa de transporte baja en el sentido sangre-cerebro, con niveles de captación que siguieron este orden: <b>bulbo olfatorio &gt; hipotálamo ≈ bulbo raquídeo ≈ cuerpo estriado &gt; hipocampo ≈ mesencéfalo</b>.</li> <li>✗ La ghrelina fluorescente inyectada sistémicamente no se encontró en áreas del cerebro distantes de los CVO, tales como el <b>VTA</b>, el <b>NTS</b> o el <b>hipocampo</b>.</li> </ul>
<p><b>CVO</b></p>  <p>parénquima cerebral ghrelina capilar fenestrado</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ La ghrelina fluorescente administrada por vía intravenosa se extravasó rápidamente de los capilares de la <b>EM</b>.</li> <li>✓ La ghrelina fluorescente inyectada sistémicamente pudo alcanzar la <b>EM</b>, el <b>ARC</b> ventromedial y el <b>AP</b>.</li> <li>✗ En estos estudios sólo se utilizaron dosis suprafisiológicas de ghrelina fluorescente.</li> </ul>
<p><b>BCSFB</b></p>  <p>espacio perivascular ghrelina capilar fenestrado unión estrecha LCR célula epitelial de PC o tanicito tipo β</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Se encontró ghrelina y ghrelina fluorescente inyectadas sistémicamente en tanicitos hipotalámicos y en algunas células de los <b>plexos coroideos</b>.</li> <li>✓ La ghrelina fluorescente inyectada de forma sistémica alcanzó lentamente el parénquima periventricular hipotalámico, adyacente a la parte dorsal del tercer ventrículo.</li> <li>✓ Los niveles de ghrelina en el LCR aumentaron luego de la administración sistémica de ghrelina.</li> <li>✗ En estudios que incluían ghrelina fluorescente sólo se utilizaron dosis suprafisiológicas.</li> </ul>

**Figura 5.** Ilustración de los posibles mecanismos que median el acceso de la ghrelina al cerebro, acompañada de un resumen de evidencias directas en modelos animales que apoyan o cuestionan cada posibilidad. BCSFB: barrera sangre-LCR. Modificada de *Perelló et al.*[122].

señal fluorescente en áreas cerebrales distantes de los CVOs de ratones inyectados sistémicamente con ghrelina fluorescente no debería ser considerado como una evidencia incuestionable de que la ghrelina plasmática no accede al cerebro a través de la BHE [116].

### 3.3.1 Plexos Coroideos.

Los plexos coroideos son estructuras vascularizadas ubicadas en los ventrículos laterales, la porción dorsal del tercer ventrículo y el cuarto ventrículo (**Figura 6**, **Figura 7**). Están formados por una monocapa de células epiteliales cuboidales que rodean una red vascular. Los plexos coroideos producen LCR y regulan su composición controlando el paso de moléculas desde la sangre. Las células de los plexos coroideos se encuentran polarizadas y presentan una cara apical, en contacto con el LCR y que contiene numerosas microvellosidades, y una cara basolateral, en contacto con una red de capilares fenestrados que se extiende por el interior de los plexos coroideos. La cara basolateral presenta pliegues que pueden jugar un papel importante en términos del movimiento de péptidos al proporcionar una mayor área de superficie para el transporte o al permitir la generación de microambientes discretos [118].

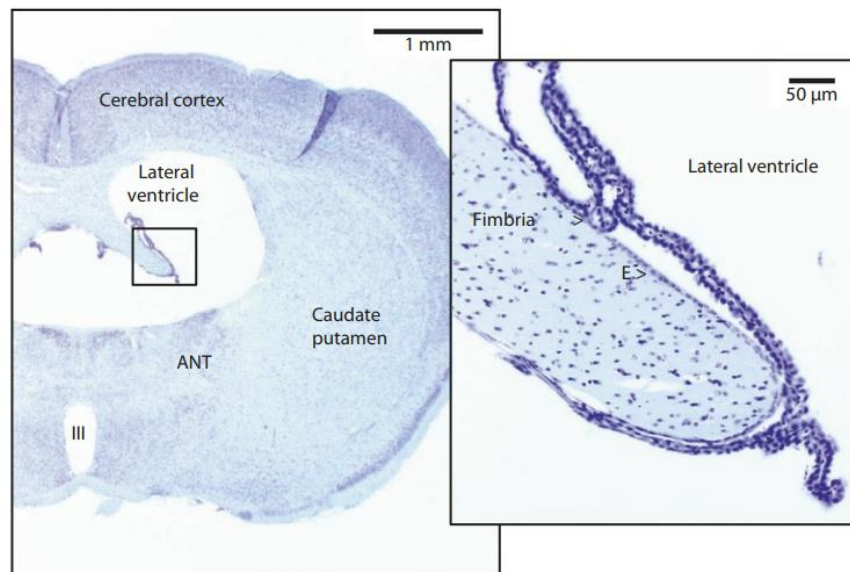


**Figura 6.** Sistema ventricular de ratón (a) y humano (b) [123].

El epitelio de los plexos coroideos está enriquecido en mitocondrias. Dado que la actividad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa es parte integral de la formación de LCR, se requiere una alta tasa de metabolismo oxidativo para mantener la secreción. Las células de los plexos coroideos poseen transportadores que utilizan directamente ATP para translocar algunos compuestos orgánicos. Sin embargo, muchos transportadores son impulsados por el gradiente de concentración de  $\text{Na}^+$  intracelular-extracelular establecido por la actividad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa.

Las células epiteliales de los plexos coroideos tienen el complejo de Golgi bien desarrollado, retículo endoplásmico, ribosomas y una red vesicular. Estas estructuras pueden desempeñar múltiples funciones en la disposición de los péptidos. Por lo tanto, puede haber síntesis de péptidos dentro del epitelio y estos péptidos luego ser exportados al LCR a través del sistema vesicular. También

puede haber transcitosis (endocitosis, seguida de tráfico vesicular intracelular y posterior exocitosis) de péptidos a través del epitelio. Alternativamente, puede haber endocitosis de péptidos seguida de degradación.



**Figura 7. Corte coronal de cerebro de ratón (tinción de Nissl) a nivel de los núcleos anteriores del tálamo.** Representación histológica de epéndima (E) y plexos coroideos (CP). Las células epiteliales del epéndima (E) son continuas (>) con los plexos coroideos que están suspendidos en el ventrículo. III = tercer ventrículo [123].

Se cree que el epitelio de los plexos coroideos tiene tres funciones de barrera generales. En primer lugar, las células epiteliales de los plexos coroideos y sus uniones estrechas forman una barrera física para la difusión de moléculas entre la sangre y el LCR. En segundo lugar, los plexos coroideos pueden formar una barrera metabólica que limite el movimiento de moléculas entre la sangre y el LCR. En tercer lugar, los plexos coroideos expresan una variedad de moléculas que degradan péptidos. Los plexos coroideos poseen una amplia variedad de proteínas transportadoras que pueden estar involucradas en la elusión de la barrera física para permitir la entrada de moléculas (por ejemplo, nutrientes) de la sangre al LCR o para eliminar moléculas (por ejemplo, productos de desecho) del LCR a la sangre [109].

Se ha descrito la expresión del GHSR en los plexos coroideos [119]. En otros tipos celulares se ha observado que luego de la unión de la ghrelina al GHSR ocurre la internalización del complejo hormona-receptor por endocitosis mediada por  $\beta$ -arrestina y clatrina, en vesículas que colocalizan con Rab5, un marcador de endosomas tempranos. Luego, el GHSR es mayormente reciclado a la membrana plasmática a través de vesículas que expresan Rab4 y Rab11 [118], [120]. Esto nos permite hipotetizar que las células de los plexos coroideos podrían estar involucradas en el transporte de la ghrelina circulante a través de la barrera sangre-LCR y que dicho transporte podría ser dependiente del GHSR.

A horizontal rectangular banner with a dark background. The background is filled with numerous small, out-of-focus spots of light, primarily in shades of blue and red, resembling a microscopic view of stained cells or a starry night sky. The word "OBJETIVOS" is centered in the banner in a white, serif, all-caps font.

# OBJETIVOS

## **OBJETIVO GENERAL**

El objetivo general del presente trabajo es estudiar si el transporte de la ghrelina a través de los plexos coroideos depende de GHSR.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1.** Evaluar la capacidad de internalización de un análogo fluorescente de la ghrelina por los plexos coroideos y su dependencia de la expresión de GHSR utilizando ratones salvajes y ratones deficientes de GHSR.
- 2.** Estudiar si explantes de plexos coroideos provenientes de ratones salvajes y de ratones deficientes de GHSR son capaces de internalizar un análogo fluorescente de la ghrelina cuando son incubados *ex vivo*, y contrastar estos resultados con los observados en el objetivo 1.
- 3.** Evaluar la utilidad del sistema de estudios *ex vivo* de explantes de plexos coroideos de ratón como sistema complementario para estudiar diferentes aspectos mecanísticos de la internalización y transporte de ghrelina cuya evaluación *in vivo* resulte compleja o no sea factible.





# MATERIALES Y MÉTODOS

## ANIMALES EXPERIMENTALES.

En este trabajo se utilizaron:

- **Ratones salvajes** (*wild type*, WT) adultos (12 a 16 semanas de edad) de la cepa C57BL/6J.
- **Ratones deficientes de GHSR** (Zigman et al., 2005)[121] adultos (12 a 16 semanas de edad). En estos ratones la expresión del GHSR se encuentra bloqueada por la inserción de un casete de bloqueo de la transcripción insertado entre el primer y el segundo exón del gen. Este casete se encuentra localizado entre dos sitios loxP, que pueden ser reconocidos por la recombinasa Cre para su eventual escisión. Esta cepa se obtuvo por cruce de animales heterocigotas y han sido retrocruzadas por más de 10 generaciones contra un fondo genético de C57BL/6J.

Estos animales fueron generados y criados en el bioterio del IMBICE. Los procedimientos experimentales se realizaron siguiendo normas estrictas para minimizar el sufrimiento animal, y cuentan con la aprobación de la Comisión Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del IMBICE (ID exp. 17-0221).

## PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES:

### **1. Cirugías estereotáxicas intra-cerebro-ventriculares (ICV).**

Se realizaron las cirugías estereotáxicas bajo anestesia general según se describe en trabajos anteriores del grupo [62]. Mediante esta cirugía se les implantó a ratones WT o deficientes del GHSR una cánula guía permanente dentro del ventrículo lateral derecho. Se utilizaron las coordenadas: -0,34 mm antero-posterior; +1,0 mm lateral y -2,3 mm ventral, que corresponden al ventrículo lateral derecho según el Atlas del cerebro de ratón de Paxinos y Franklin [122]. En todos los casos, la posición final de la cánula fue determinada por observación histológica de los cerebros al finalizar los experimentos.

Después de la cirugía, los ratones fueron alojados en cajas individuales, y se dejaron recuperar por al menos 5 días tratándolos diariamente con flunixin meglumina (Flumeg 5%, Over) para reducir la inflamación antes de someterlos a los protocolos experimentales.

#### **1.1 Inyecciones ICV.**

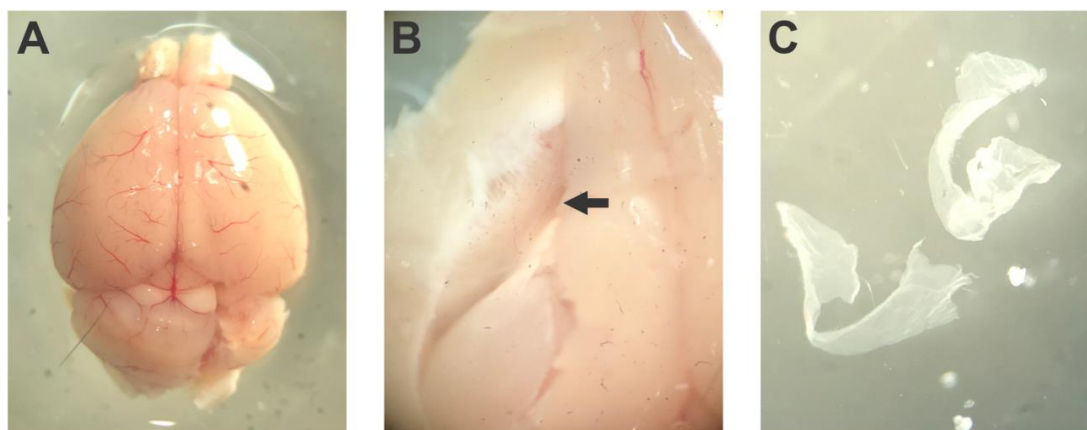
Luego del período de recuperación detallado anteriormente, se realizaron inyecciones centrales (por vía ICV) de 2 µl de vehículo (LCR artificial, LCRA) solo o

conteniendo 60 pmol/ratón de F-ghrelina. La F-ghrelina (GS-D-(N-octil)-FLSPEHQKAQQRKESC-(DY-647)) es un análogo de la ghrelina que contiene 19 aminoácidos y está conjugado a un fluoróforo DY-647-maleimida, por lo que se puede observar por fluorescencia directa en el rojo lejano ( $\lambda_{em}^{max} = 672 \text{ nm}$ ). Además la serina octanoilada en la posición 3 es reemplazada por un residuo de ácido aspártico cuya cadena lateral se encuentra amidada con n-octilamina (sintetizada por el laboratorio del Dr. Fehrentz del Instituto de Biomoléculas Max Mousseron, Montpellier, Francia). Esta dosis de F-ghrelina elegida representa la menor dosis que permite una observación directa en microscopio de fluorescencia y cuantificación de la molécula. Las inyecciones centrales fueron realizadas a un flujo constante durante 2 minutos a través de un inyector calibre 30G que se extiende 0,5 mm por debajo de la cánula guía, el cual se encuentra conectado a través de un tubo de polietileno a una jeringa Hamilton. Luego de cada inyección, se dejó el inyector dentro de la cánula durante 2 minutos para evitar el reflujo de la solución inyectada. Luego de 15 minutos, los ratones fueron anestesiados y perfundidos trans-cardíacamente con una solución de lavado (PBS 0,01 M pH 7,4 conteniendo 10 UI/ml de heparina) y formaldehído al 4% en PBS como fijador. Los cerebros fueron extraídos, post-fijados y cortados en cuatro series de secciones coronales en un crióstato. Luego, las secciones conteniendo los plexos coroideos de una de las series se montaron secuencialmente protegiéndolas de la luz, se colocó el cubreobjetos con medio de montaje para fluorescencia y se tomaron microfotografías de fluorescencia.

Los procedimientos experimentales de colocación de las cánulas, inyecciones ICV y perfusión de los animales que se describen en esta sección, así como el corte de los cerebros, fueron realizados por la Dra. Maia Uriarte y proveyeron las muestras que posteriormente fueron fotografiadas y cuantificadas para esta tesis.

## ***2. Extracción de Plexos Coroideos.***

Para obtener los explantes de plexos coroideos se sacrificaron ratones macho adultos del genotipo WT o deficientes del GHSR mediante decapitación bajo anestesia. Posteriormente, se extrajeron sus cerebros y se disecaron los plexos coroideos con pinzas bajo lupa binocular en medio Hanks estéril (KCl 0,40 g/l;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,06 g/l; NaCl 8 g/l;  $\text{NaHCO}_3$  0,35 g/l;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,04 g/l; glucosa 1 g/l) frío para prolongar la viabilidad del tejido (**Figura 8**).



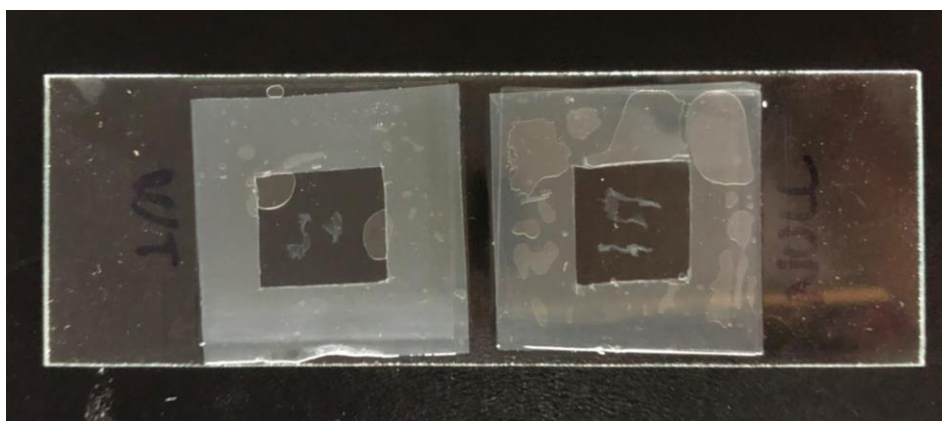
**Figura 8. Pasos en la extracción de los Plexos Coroideos.** Una vez elegidos los ratones según el genotipo deseado, se extraen sus cerebros (A), se realizan incisiones dorsales para localizar los plexos coroideos en los ventrículos cerebrales (VL y 4V) (B) y se los extrae cuidadosamente (C).

### **3. Incubaciones ex vivo.**

#### **3.1 Incubación con ghrelina fluorescente (F-ghrelina).**

Los plexos coroideos provenientes de ratones WT o deficientes de GHSR se transfirieron a un Eppendorf con medio Hanks nuevo y se incubaron 15 minutos a 37°C, para estabilizar el tejido. Luego se los incubó con F-ghrelina 300 nM durante 15 minutos a 37°C. Posteriormente se lavaron con Buffer Fosfato-Salina (PBS, de sus siglas en inglés para *phosphate buffered saline*, 0,01 M) y se fijaron con solución de formaldehído 4% en PBS por 30 minutos a 4°C. Por último, se los lavó nuevamente con PBS, se realizó la tinción de los núcleos con Hoechst (Hoeschst 33258, Sigma-Aldrich, cat# B1155) durante 5 minutos y se los volvió a lavar con PBS. Los plexos coroideos fueron montados utilizando un medio de montaje para fluorescencia que contiene el compuesto antifading DABCO (Sigma, cat# D27802). Se utilizó un separador de Parafilm perforado entre cubre y portaobjetos para evitar la deformación del tejido (**Figura 9**). Las muestras fueron observadas bajo microscopio de fluorescencia, se tomaron microfotografías del tejido y se cuantificaron dos parámetros: 1) el porcentaje de células con marca fluorescente roja asociada a F-ghrelina, que se obtuvo dividiendo el número de células con marca positiva de F-ghrelina por el número total de células, estimado utilizando la marca de Hoechst en los núcleos, y multiplicando por 100; y 2) la intensidad promedio de fluorescencia en el rojo lejano presente en cada célula considerada positiva para F-ghrelina. Como control negativo se incubaron los plexos con medio Hanks sin F-ghrelina (vehículo).

Además, se realizó un ensayo en el que se utilizaron los plexos coroideos provenientes de ratones WT, a los cuales se les realizaron las incubaciones descritas anteriormente a 4°C, con el objetivo de determinar la especificidad de marca de la F-ghrelina a una temperatura baja, no fisiológica.



**Figura 9.** Montaje de los plexos coroideos para la adquisición de imágenes. Los explantes fijados provenientes de cada animal se colocaron en una cámara construida interponiendo un separador perforado entre porta- y cubreobjeto.

### **3.2 Incubación con JMV2959.**

El JMV2959 es un antagonista de ghrelina y al mismo tiempo un agonista parcial de GHSR. Este compuesto favorece la permanencia del receptor en la membrana por dos mecanismos: inhibiendo la internalización del GHSR que es inducida por ghrelina así como a través del bloqueo de la internalización que ocurre por la vía de  $\beta$ -arrestina [123].

Los plexos coroideos provenientes de ratones WT se pre-incubaron inicialmente con el ligando de GHSR JMV2959 30  $\mu$ M (100X en exceso con respecto a F-ghrelina), por 15 minutos a 37°C, y pasado ese tiempo se los incubó con JMV2959 y F-ghrelina (30  $\mu$ M y 300 nM, respectivamente) por 15 minutos a 37°C. Luego se prosiguió de la misma manera que en sección 2.1. Se realizaron dos controles negativos: 1) se incubaron los plexos coroideos con F-ghrelina y sin JMV2959, 2) se incubaron los plexos coroideos solo con vehículo.

### **3.3 Incubación con Pitstop 2.**

Los plexos coroideos provenientes de ratones WT se pre-incubaron durante 30 minutos a 37°C con Pitstop 2 30  $\mu$ M (#SML 1169, Sigma-Aldrich), que inhibe de manera selectiva los procesos de endocitosis mediados por clatrina, ya que interfiere con el ensamblaje de la membrana vesicular formada por las unidades de clatrina [124]. Pasado ese tiempo se los incubó con Pitstop 2 y F-ghrelina (30  $\mu$ M y 30 nM, respectivamente) por 15 minutos a 37°C. Luego se prosiguió de la misma manera que en la sección 2.1. Se realizaron dos controles negativos: 1) se incubaron los plexos coroideos con F-ghrelina y sin Pitstop 2, 2) se incubaron los plexos coroideos solo con vehículo. Las concentraciones y los tiempos de incubación utilizados para Pitstop 2 se basan en datos de bibliografía [125].

### ***3.4 Incubación con Colchicina.***

Los plexos coroideos provenientes de ratones WT se pre-incubaron durante 45 minutos a 37°C con Colchicina 1mM (Sigma-Aldrich), que inhibe la polimerización de los microtúbulos a través de su unión a la tubulina, afectando a la estructura del citoesqueleto celular, lo cual tiene efectos inhibitorios sobre el proceso de endocitosis en diferentes tipos celulares [126]–[129]. Pasado ese tiempo se los incubó con Colchicina y F-ghrelina (1mM y 30 nM, respectivamente) por 15 minutos a 37°C. Luego se prosiguió de la misma manera que en la sección 2.1. Se realizaron dos controles negativos: 1) se incubaron los plexos coroideos con F-ghrelina y sin Colchicina, 2) se incubaron los plexos coroideos solo con vehículo. Las concentraciones y los tiempos de incubación utilizados para Colchicina se basan en datos de bibliografía [130].

### ***4. Prueba de viabilidad de los plexos coroideos.***

Para los ensayos de viabilidad se utilizó azul de tripán, un colorante vital que permite diferenciar células vivas de células muertas. Este colorante azul no tiñe las células con membranas intactas y que son metabólicamente activas. En cambio, las células sin vitalidad adquieren un tono azulado en su citoplasma ya que son incapaces de excluir el colorante [131].

Inicialmente, los plexos coroideos se incubaron en medio Hanks durante 15 minutos a 37°C. Luego se les agregó azul de tripán y se los montó en un portaobjetos para evaluar viabilidad por observación microscópica directa en campo claro.

En un segundo ensayo, los plexos coroideos se incubaron 4 horas a temperatura ambiente en medio Hanks. A una muestra de estos plexos coroideos se la incubó con F-ghrelina 300 nM y se prosiguió de la misma manera que en la sección 2.1. A otra porción de los plexos coroideos se la tiñó con azul de tripán y se los montó en un portaobjetos para evaluar viabilidad en campo claro.

### ***5. Prueba de liberación de ghrelina.***

Los plexos coroideos provenientes de ratones WT fueron incubados en medio Hanks por 15 minutos a 37°C. Pasado ese tiempo se los incubó con F-ghrelina 30 nM durante 15 minutos a 37°C. Luego, se lavaron los explantes con medio Hanks y se los incubó con medio Hanks fresco conteniendo KCl 50 nM [61] durante 15 minutos a 4°C. Finalmente, se lavaron con PBS y se fijaron los explantes para su observación microscópica de la misma forma que se indicó anteriormente. El control de este experimento consistió en explantes de plexos coroideos sometidos

al mismo protocolo inicial de incubación con F-ghrelina, pero que posteriormente fueron fijados sin que pasaran por la etapa de incubación con medio fresco (etapa de liberación).

## **6. Adquisición de imágenes.**

Las imágenes de fluorescencia se adquirieron a distintas magnificaciones (10X, 40X y 63X) empleando un microscopio Zeiss AxioObserver D1 equipado con un módulo de iluminación estructurada Apotome 2, una cámara monocroma AxioCam 506 y objetivos de 10x/0.45, 40x/0.95 y 63x/1.4 (aceite). Se utilizó el cubo de filtros zeiss #49 (ex: BP 359/48 nm, em: BP 445/50 nm) para Hoechst, el #50 (ex: BP 640/30 nm, em: BP 690/50 nm) para DY-647 y para autofluorescencia en verde el #38HE (ex: BP 470/40 nm, em: BP 525/50 nm). Luego, las imágenes a 40X y 63X fueron utilizadas para realizar las cuantificaciones correspondientes. Las imágenes a 10X fueron tomadas con el fin de documentar.

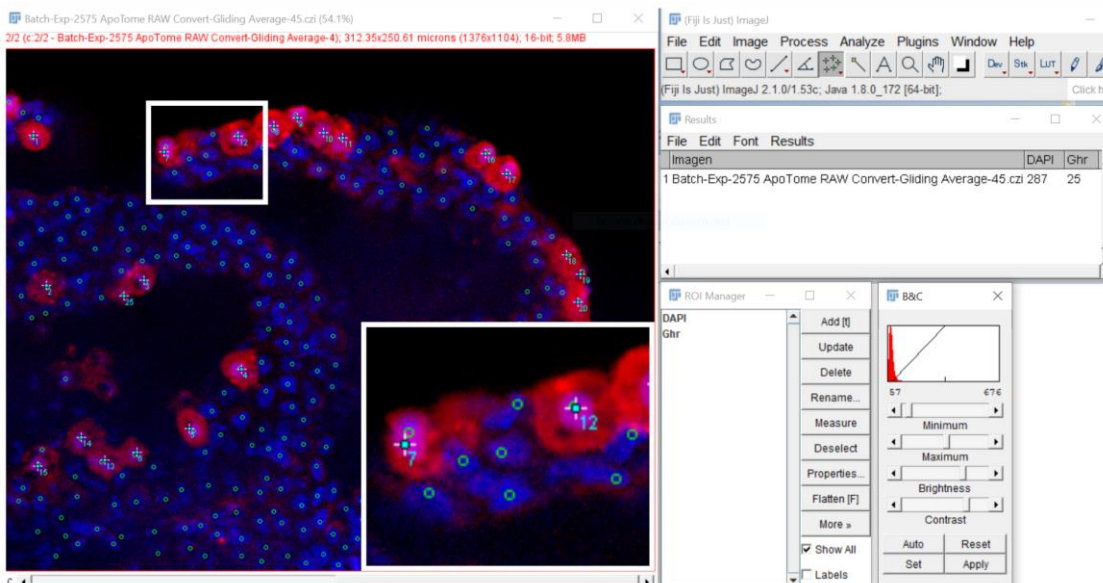
Las imágenes fueron adquiridas utilizando la modalidad de luz estructurada, y luego procesadas en el mismo software de adquisición, Zen Blue (ZEISS), para exportar los planos de seccionamiento óptico resultantes en formato nativo (.czi), incluyendo la metadata correspondiente.

## **7. Análisis de imágenes.**

Se utilizó el software Fiji [132] para el análisis y la cuantificación de las imágenes, y luego para su exportación para presentación. Las figuras finales fueron generadas utilizando el programa Corel Draw X7, para su presentación en esta tesina.

### **7.1 Cuantificación del porcentaje de células con marca fluorescente.**

Para determinar el porcentaje de células de los plexos coroideos con señal fluorescente roja de la F-ghrelina se tomaron microfotografías de los plexos coroideos a alta magnificación (40X y 63X). Luego, utilizando el software Fiji, se cuantificó a través de un macro generado en nuestro laboratorio el número de núcleos presentes identificados con el colorante Hoechst, utilizando un algoritmo de detección automática supervisada. Por otro lado, sobre la misma fotografía, se marcó y contó el número de células que poseen señal fluorescente roja (**Figura 10**). Las marcas obtenidas para cada imagen se guardaron como regiones de interés (ROIs) en sendos archivos complementarios, permitiendo su posterior revisión. Por último, se calculó el porcentaje de células marcadas como el número de células con marca / número de núcleos \* 100.

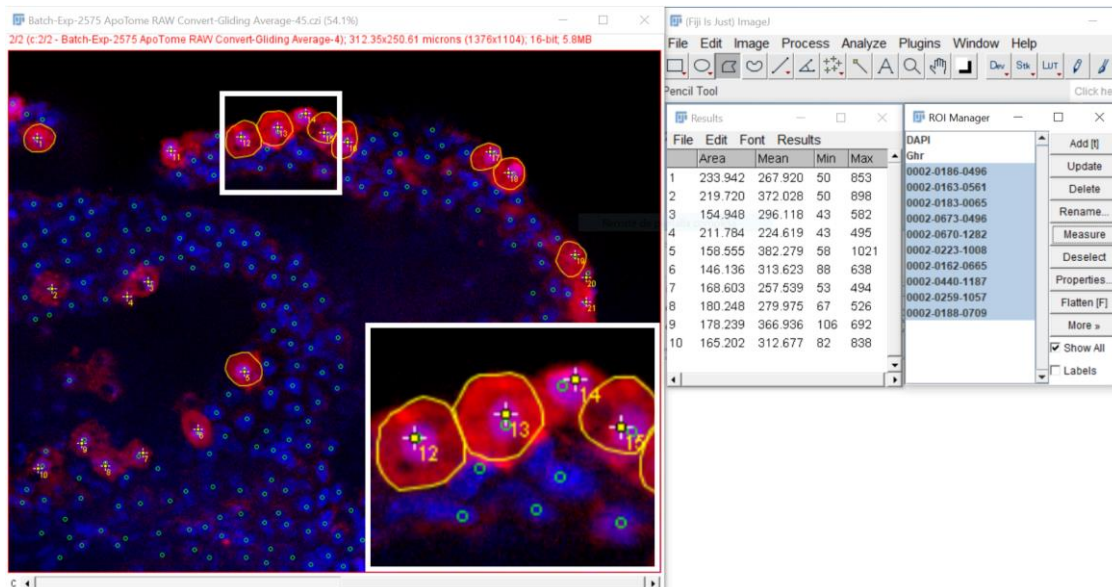


**Figura 10.** Cuantificación de las células de los plexos coroideos con marca fluorescente usando el software Fiji. En la microfotografía se encuentran marcados con círculos verdes los núcleos teñidos con Hoechst y con cruces las células que internalizaron la F-ghrelina. A la izquierda se encuentran el panel de comandos del software Fiji, brillo y contraste, ROI Manager y resultados.

## 7.2 Cuantificación de la intensidad de señal fluorescente de F-ghrelina.

Para estimar la intensidad de la señal fluorescente de F-ghrelina en las células de los plexos coroideos, tanto en los cortes de cerebro de ratones inyectados de manera ICV como en los explantes, se utilizaron microfotografías a baja (10X) y alta magnificación (40X y 63X) obtenidas con el microscopio de fluorescencia descrito anteriormente. Luego, utilizando el software Fiji, se delimitaron manualmente todas las células consideradas positivas y se midió la intensidad de fluorescencia media en las mismas (**Figura 11**). Todas las regiones de interés generadas para cada imagen fueron guardadas para permitir su revisión posterior. En los experimentos de liberación de F-ghrelina se generaron máscaras comprendiendo la totalidad del tejido, valiéndose de la autofluorescencia en el canal verde, se midió el valor medio en el canal rojo lejano y se sustrajo la contribución promedio del fondo sin tejido en cada imagen.





**Figura 11.** Cuantificación de la intensidad de señal fluorescente de F-ghrelina usando el software Fiji. En la microfotografía se encuentran delimitadas con amarillo algunas células representativas que internalizaron la F-ghrelina. A la izquierda se encuentra el panel de resultados en el cual se observan las intensidades medias (mean) cuantificadas en el interior de cada una de esas células, junto al ROI Manager con la lista de regiones demarcadas.

### 8. Análisis estadístico.

Para los experimentos en los que se compararon ratones WT y deficientes del GHSR, tanto *in vivo* como *ex vivo*, se promediaron los resultados obtenidos de todas las imágenes correspondientes a cada animal. En el resto de los casos se promediaron los resultados obtenidos para el conjunto de los campos en cada condición experimental.

Los resultados obtenidos se expresan como media  $\pm$  SEM o mediana con rango intercuartílico según corresponda, indicando también el tamaño muestral. Para evaluar la normalidad de la distribución de los datos se realizó el test de Kolmogorov-Smirnov.

Para realizar las comparaciones entre las condiciones evaluadas se utilizó el test t, en los casos en los que la distribución fue normal, o el test de Mann-Whitney en los casos en los que la distribución no fue normal. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando p fue menor a 0,05.

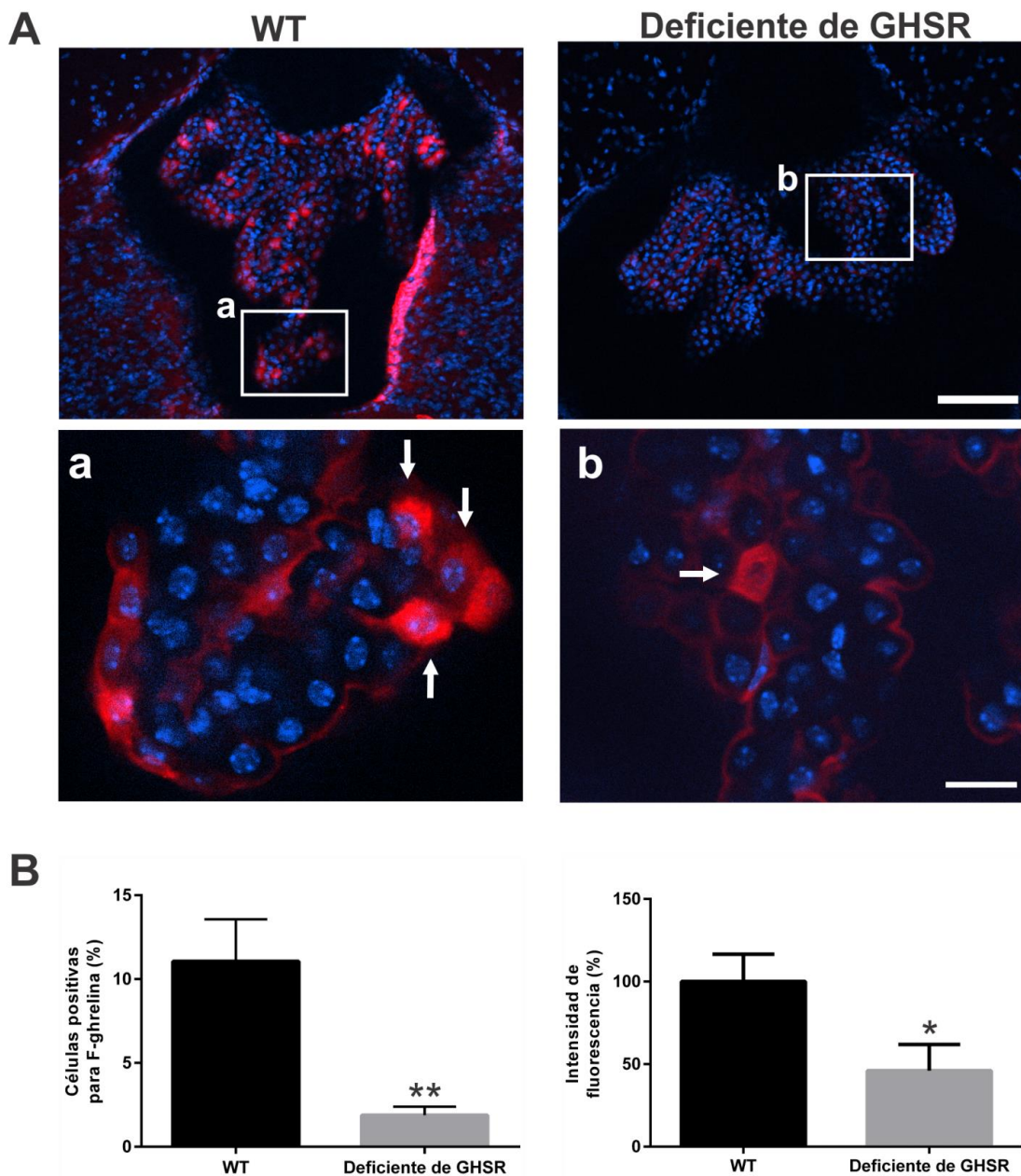
El software utilizado para realizar el análisis estadístico fue Graphpad Prism 6.

A horizontal rectangular banner with a dark background. The background is filled with numerous small, out-of-focus spots of blue and red, resembling a microscopic view of stained cells. The word "RESULTADOS" is centered in the banner in a white, serif, all-caps font.

# RESULTADOS

### ***Capacidad de internalización de F-ghrelina por los plexos coroideos in vivo y su dependencia con la expresión de GHSR***

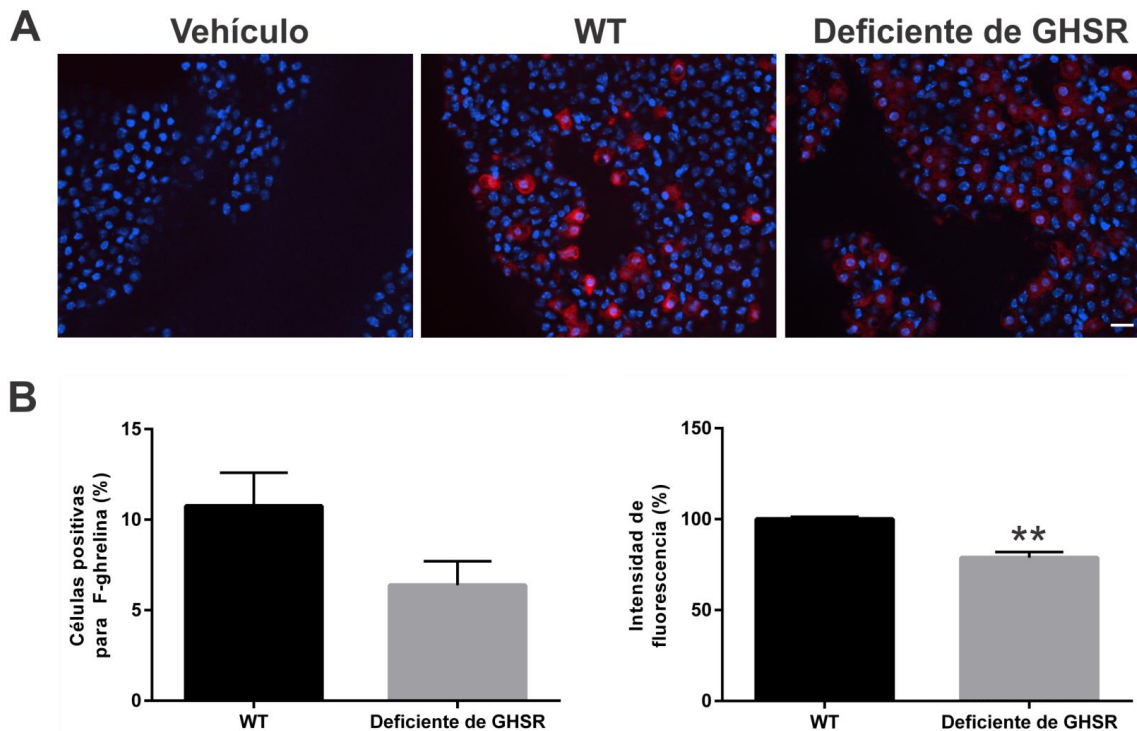
Con el objetivo de estudiar si la presencia del GHSR es necesaria para la internalización de F-ghrelina en los plexos coroideos, analizamos la señal fluorescente de la F-ghrelina en estas células luego de realizar inyecciones ICV de dicho análogo fluorescente en ratones WT y en ratones deficientes del GHSR. Tanto en los ratones WT como en los ratones deficientes del GHSR se observó una marca fluorescente de F-ghrelina en algunas de las células epiteliales de los plexos coroideos. En ambos grupos de ratones, la señal se encontró concentrada en el interior de algunas de las células epiteliales de los plexos coroideos, mientras que otras células no mostraron señal fluorescente en su interior, observándose una marcación “en parches” (**Figura 12A**). El análisis cuantitativo indicó que los ratones deficientes del GHSR poseen un menor porcentaje de células epiteliales marcadas con F-ghrelina (respecto del total de células epiteliales presentes) que los animales WT ( $1,9 \pm 0,5\%$ ,  $n=6$ , y  $11,1 \pm 2,5\%$ ,  $n=9$ , respectivamente,  $p<0,01$ ) (**Figura 12B**). Por otro lado, la intensidad de señal dentro de cada una de las células marcadas con F-ghrelina también fue mayor para el genotipo WT que para el deficiente del GHSR (considerando al promedio de la intensidad de fluorescencia de los ratones WT como 100%, para dichos animales la cuantificación fue de  $100,0 \pm 16,6\%$ ,  $n=9$ , mientras que para los deficientes del GHSR fue de  $46,1 \pm 15,9\%$ ,  $n=6$ ,  $p<0,05$ ) (**Figura 12B**). En los ratones inyectados con vehículo no se observó ningún tipo de señal fluorescente específica, independientemente del genotipo.



**Figura 12.** Las células de los plexos coroideos de ratones WT y deficientes del GHSR muestran marca de F-ghrelina cuando es administrada de manera ICV. **A.** Las microfotografías muestran el patrón de distribución de la señal fluorescente de la F-ghrelina (roja) en los plexos coroideos de ratones WT o deficientes del GHSR que fueron inyectados por vía ICV con F-ghrelina y perfundidos 15 minutos después. a y b muestran imágenes a alta magnificación de las áreas marcadas en las imágenes de baja magnificación. En todos los casos se observan los núcleos marcados con Hoechst (azul). Las flechas indican células de los plexos coroideos con señal de F-ghrelina en el interior celular. Barras de escala: 100  $\mu$ m (baja magnificación, 10X) y 20  $\mu$ m (alta magnificación, 63X). **B.** Los gráficos de barras muestran las cuantificaciones del porcentaje de células positivas para F-ghrelina y de la intensidad de fluorescencia en el interior de dichas células para los plexos coroideos de animales WT o deficientes del GHSR inyectados con F-ghrelina por vía ICV. La intensidad de fluorescencia se expresa en porcentaje respecto de la intensidad promedio de los animales WT. Los datos representan la media  $\pm$  SEM y fueron analizados mediante test t, con corrección de Welch en los casos en los que corresponde. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ , respecto del grupo WT.

### **Capacidad de internalización de F-ghrelina por explantes de plexos coroides ex vivo y su dependencia con la expresión de GHSR**

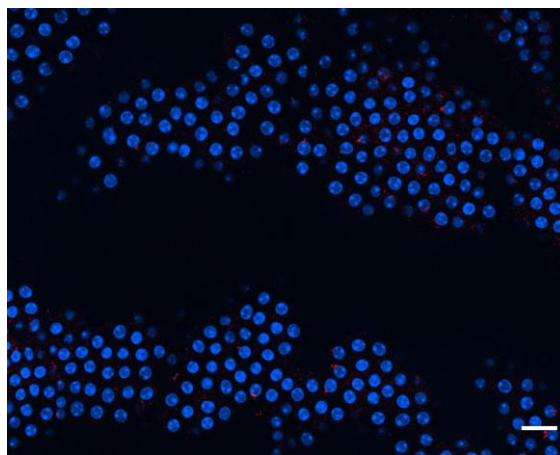
Para evaluar si la internalización de la F-ghrelina por las células de los plexos coroides depende de la presencia del GHSR, utilizamos también una estrategia *ex vivo*. Para ello, sacrificamos ratones WT o deficientes del GHSR, extrajimos los plexos coroides de sus cerebros y los incubamos en medio Hanks solo o conteniendo 300 nM de F-ghrelina por 15 minutos. Se encontró marca de F-ghrelina en algunas de las células epiteliales, pero no en otras, observándose en las primeras una intensa señal fluorescente en su interior (**Figura 13A**). Los análisis cuantitativos no mostraron diferencias en el porcentaje de células marcadas con F-ghrelina entre los ratones WT y los deficientes del GHSR (**Figura 13B**). Sin embargo, la intensidad de fluorescencia en el interior de las células marcadas fue mayor para los animales WT que para los deficientes del GHSR (considerando al



**Figura 13.** Las células de los explantes de plexos coroides de ratones WT y deficientes del GHSR muestran marca de F-ghrelina. **A.** Microfotografías representativas de explantes de plexos coroides de ratones WT o deficientes de GHSR incubados con vehículo solo o conteniendo F-ghrelina durante 15 min. En todos los casos se observan los núcleos marcados con Hoechst (azul). Barra de escala: 20  $\mu$ m (40X). **B.** Los gráficos de barras muestran las cuantificaciones del porcentaje de células positivas para F-ghrelina y de la intensidad de fluorescencia en el interior de dichas células para los explantes de plexos coroides de animales WT o deficientes del GHSR. La intensidad de fluorescencia se expresa en porcentaje respecto de la intensidad promedio de los animales WT. Los datos representan la media  $\pm$  SEM y fueron analizados mediante un test t. \*\*,  $p < 0,01$  respecto del grupo WT.

promedio de la intensidad de fluorescencia de los animales WT como 100%, la cuantificación fue de 100,0 (98,7–101,3)%, n=6, y 78,8 (74,0–81,9)%, n=5, respectivamente,  $p < 0,01$ ) (**Figura 13B**).

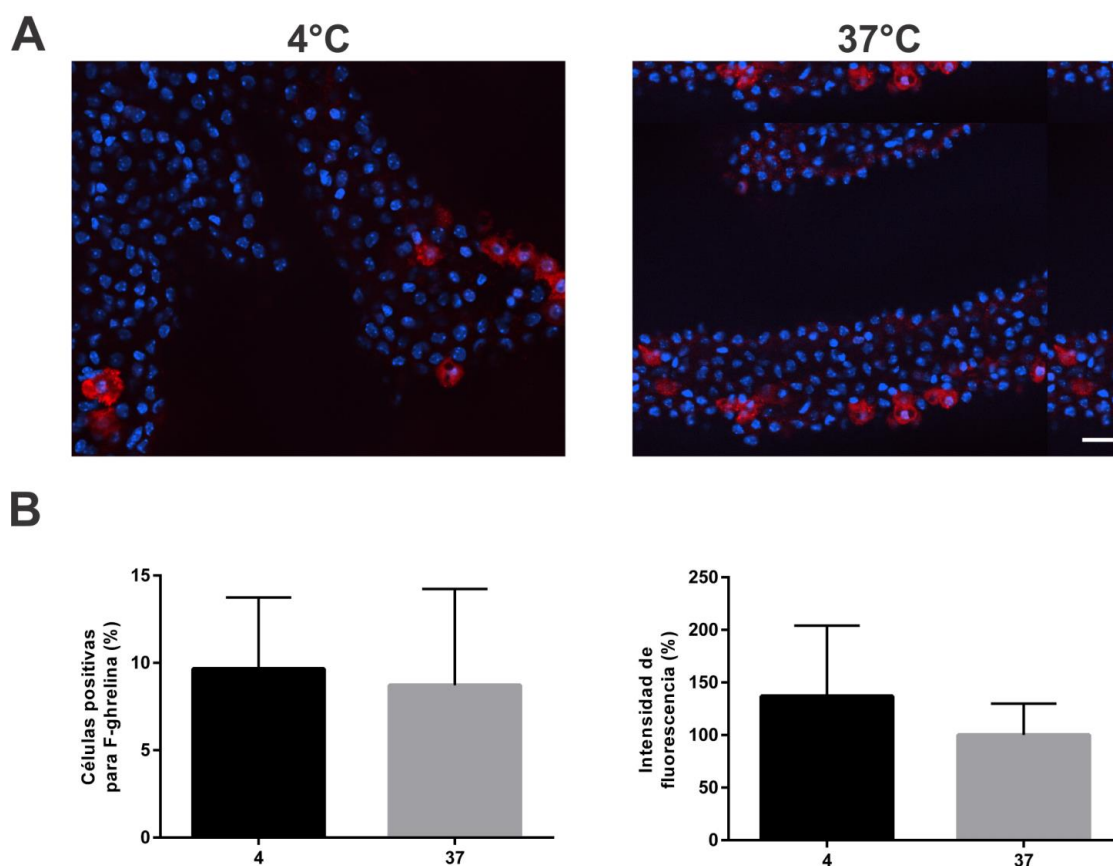
Para poder corroborar que las células de los plexos coroideos estuvieran viables al momento de hacer los experimentos con los explantes realizamos una prueba con azul de tripán, la cual nos permitió ver que con los tiempos de incubación utilizados en los experimentos entre el 60 y el 70% de las células permanecían viables (eliminaban la marca del colorante), y que estas células mantenían su capacidad para internalizar la F-ghrelina. Por otro lado, se observó que con la incubación a temperatura ambiente durante 4 horas el 100% de las células de los plexos coroideos había perdido viabilidad (permanecían teñidas con el colorante). Estas células, al incubarlas con F-ghrelina, mostraron una pérdida completa de la capacidad de marcarse (**Figura 14**).



**Figura 14.** La pérdida de viabilidad previa a la incubación reduce la marca asociada a F-ghrelina. Microfotografía representativa de las células de los plexos coroideos pre-incubadas en medio Hanks a temperatura ambiente durante 4 horas, y posteriormente incubadas con F-ghrelina.

## ***Evaluación de la utilidad del sistema de estudios ex vivo de explantes de plexos coroideos de ratón para estudiar diferentes aspectos mecanísticos de la internalización y el transporte de ghrelina***

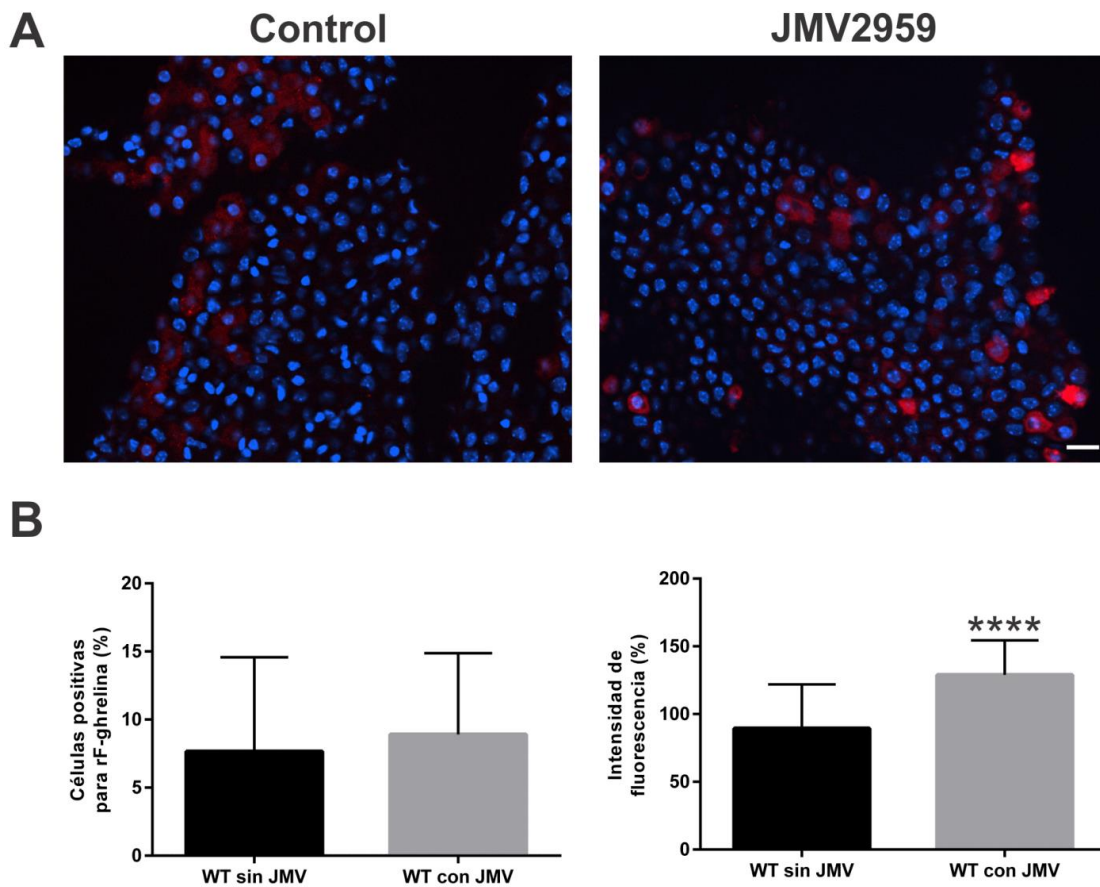
Continuando con el estudio de la capacidad de los plexos coroideos de internalizar la ghrelina, evaluamos la internalización de la F-ghrelina a dos temperaturas de incubación: 4°C y 37°C. Para ello, sacrificamos ratones WT, diseccionamos los plexos coroideos de sus cerebros y los incubamos en medio Hanks a 4°C o a 37°C. Luego, incubamos los plexos coroideos a las respectivas temperaturas en medio Hanks conteniendo F-ghrelina por 15 minutos (**Figura 15**). En este experimento no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de células marcadas con F-ghrelina entre las condiciones a 4°C vs 37°C ( $9,6 \pm 1,8\%$ ,  $n=5$  vs  $8,7 \pm 2,5\%$ ,



**Figura 15. Fluorescencia asociada a F-ghrelina en células de explantes de los plexos coroideos a bajas temperaturas.** **A.** Microfotografías representativas de explantes de plexos coroideos de ratones WT incubados con F-ghrelina a 4°C o 37°C. En todos los casos se observan los núcleos marcados con Hoechst (azul). Barra de escala: 20  $\mu$ m (40X). **B.** Los gráficos de barras muestran las cuantificaciones del porcentaje de células positivas para F-ghrelina y de la intensidad de fluorescencia en el interior de dichas células para los explantes de plexos coroideos de animales WT. La intensidad de fluorescencia se expresa en porcentaje respecto de la intensidad promedio de los animales WT tratados a la temperatura de 37°C. Los datos representan la media  $\pm$  SEM y fueron analizados mediante un test t.

n=5 respectivamente,  $p= 0,7682$ ) ni en la intensidad de fluorescencia ( $136,9 \pm 30,0\%$ , n=5 vs  $100,0 \pm 13,3\%$ , n=5, respectivamente,  $p= 0,2931$ ) en el interior de las células marcadas entre las dos temperaturas empleadas.

En segundo lugar, utilizamos el ligando del GHSR JMV2959 para evaluar si la presencia del mismo afectaba la capacidad de las células de internalizar la F-ghrelina. Para ello sacrificamos ratones WT, aislamos los plexos coroideos y los pre-incubamos en medio Hanks solo o con JMV2959 a 37°C. Luego, incubamos los plexos coroideos en medio Hanks conteniendo F-ghrelina o en medio Hanks con F-ghrelina y JMV2959, por 15 minutos (**Figura 16**). Los resultados mostraron que el número de células epiteliales marcadas con ghrelina no presentó diferencias significativas entre las condiciones con y sin JMV2959, pero la intensidad de

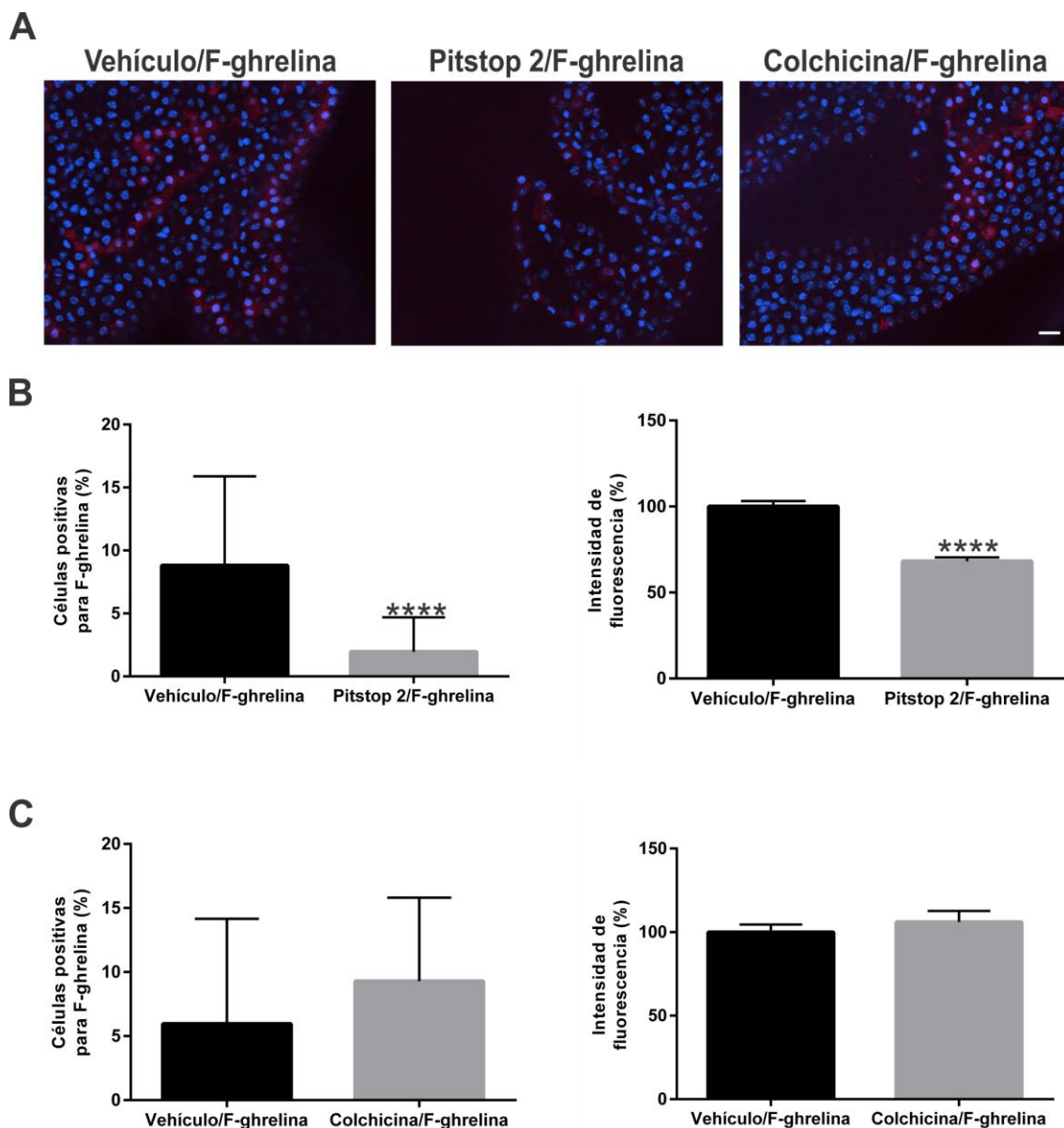


**Figura 16.** Fluorescencia asociada a F-ghrelina en explantes de plexos coroideos cuando sus células son pre-incubadas con y sin JMV2959. **A.** Microfotografías representativas de explantes de plexos coroideos de ratones WT incubados con F-ghrelina o con JMV2959 y F-ghrelina a 37°C. En todos los casos se observan los núcleos marcados con Hoechst (azul). Barra de escala: 20  $\mu\text{m}$  (40X). **B.** Los gráficos de barras muestran las cuantificaciones del porcentaje de células positivas para F-ghrelina y de la intensidad de fluorescencia en el interior de dichas células para los explantes de plexos coroideos de animales WT. La intensidad de fluorescencia se expresa en porcentaje respecto de la intensidad promedio de los animales WT tratados solo con F-ghrelina. Los datos representan la mediana con rango intercuatílico y fueron analizados mediante un test de Mann-Whitney. \*\*\*\*,  $p<0,0001$ .



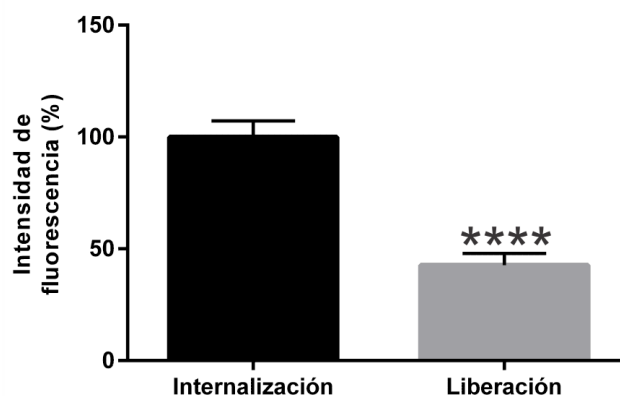
fluorescencia en el interior de cada una de ellas fue mayor en presencia del JMV2959 (89,4 (71,1 - 122,0)%, n=123 campos, y 128,9 (99,9 - 154,4)%, n=123 campos, respectivamente,  $p < 0,0001$ ).

En tercer lugar, estudiamos los efectos de distintos inhibidores de la endocitosis en la internalización de ghrelina en las células de los plexos coroideos, con el objetivo de dilucidar los mecanismos moleculares por los cuales estas células internalizan la ghrelina. Para ello, pre-incubamos explantes de plexos coroideos a 37°C con medio sólo o conteniendo un inhibidor de procesos de transporte intracelular (Colchicina) o de la endocitosis mediada por clatrina (Pitstop 2). Luego incubamos las células con vehículo solo o conteniendo F-ghrelina durante 15 minutos y procesamos los explantes como se describió anteriormente para su observación por microscopía de fluorescencia. Finalmente, tomamos microfotografías del tejido y sobre ellas cuantificamos el porcentaje de células positivas para F-ghrelina y la intensidad de fluorescencia de cada una de ellas (**Figura 17A**). Los resultados de estas cuantificaciones mostraron que Pitstop 2 disminuyó el número de células positivas para F-ghrelina respecto del total de células presentes (1,3 (0,0 - 3,2)%, n=32 campos, y 6,2 (3,2 - 6,2)%, n=33 campos, respectivamente,  $p < 0,0001$ ) y también la intensidad de fluorescencia en las células marcadas ( $100,0 \pm 3,1\%$  para la condición control, n=31 campos, y  $68,1 \pm 2,2\%$  para la condición con Pitstop 2, n=20 campos,  $p < 0,0001$ ) (**Figura 17B**). La Colchicina, en cambio, no afectó el número de células capaces de ser marcadas por F-ghrelina ni tampoco la intensidad de fluorescencia medida en ellas (**Figura 17C**).



**Figura 17. Fluorescencia asociada a la F-ghrelina en células de plexos coroideos de ratones WT en presencia de inhibidores de la endocitosis.** **A.** Microfotografías representativas de explantes de plexos coroideos incubados con vehículo y F-ghrelina, con Pitstop 2 y F-ghrelina o con Colchicina y F-ghrelina. En todos los casos se observan los núcleos marcados con Hoechst (azul). Barra de escala: 20  $\mu$ m (40X). **B.** Los gráficos de barras muestran las cuantificaciones del porcentaje de células positivas para F-ghrelina respecto del total de las células presentes, y de la intensidad de fluorescencia en el interior de dichas células consideradas positivas para F-ghrelina en presencia de Pitstop 2. **C.** Los gráficos de barras muestran las cuantificaciones del porcentaje de células positivas para F-ghrelina respecto del total de las células presentes, y de la intensidad de fluorescencia en el interior de dichas células consideradas positivas para F-ghrelina en presencia de Colchicina. La intensidad de fluorescencia se expresa en porcentaje respecto de la intensidad promedio de los animales WT. Los datos representan la mediana con rango intercuartílico para el porcentaje células positivas para F-ghrelina o la media  $\pm$  SEM para el porcentaje de intensidad de fluorescencia, y fueron analizados mediante un test de Mann-Whitney o mediante test t, respectivamente. \*\*\*\*,  $p < 0,0001$  respecto de la condición sin inhibidor.

Por último, estudiamos la capacidad de los plexos coroideos para liberar la ghrelina previamente internalizada. Para ello incubamos los explantes con F-ghrelina de la misma forma explicada anteriormente durante 15 minutos (etapa de internalización) y, luego de lavar con medio, incubamos con medio fresco con alto  $K^+$  durante 15 minutos más (etapa de liberación). Observamos que la intensidad de fluorescencia correspondiente a la F-ghrelina fue menor en los plexos coroideos a los que se les permitió la liberación con respecto a los que solo realizaron la etapa de internalización ( $100,0 \pm 7,2\%$ ,  $n=28$  campos, y  $42,7 \pm 5,3\%$ ,  $n=22$  campos, respectivamente,  $p < 0,0001$ ) (**Figura 18**).



**Figura 18. Liberación de F-ghrelina al medio de cultivo.** El grafico de barras muestra la cuantificación de la intensidad de fluorescencia en los explantes de plexos coroideos que fueron incubados con F-ghrelina y fijados ("Internalización") o incubados con F-ghrelina y luego con medio fresco ("Liberación"). Los datos representan la media  $\pm$  SEM y fueron analizados mediante t test. \*\*\*\*,  $p < 0,0001$  respecto de la etapa de internalización.



# DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En este trabajo de tesina nos propusimos estudiar si la ghrelina es capaz de internalizarse en las células epiteliales de los plexos coroideos y si este proceso es dependiente o no del GHSR. Para ello realizamos ensayos de internalización en plexos coroideos tanto *in vivo* como *ex vivo* utilizando diferentes estrategias experimentales para interrogar este sistema.

En primer lugar utilizamos un modelo *in vivo* en el cual se inyectó F-ghrelina por vía ICV en ratones WT y deficientes del GHSR. En este caso observamos que el número de células de los plexos coroideos capaces de internalizar la F-ghrelina presente en el LCR es menor en los ratones deficientes del GHSR que en los animales WT, en ambos casos existiendo una fracción de células que no incorpora el trazador. Asimismo, vimos que las células de los plexos coroideos que internalizan la F-ghrelina en los ratones deficientes del GHSR, lo hacen en una menor cantidad que las células de los plexos coroideos de los ratones WT. Los resultados obtenidos en este experimento nos permiten describir tres poblaciones de células de los plexos coroideos: aquellas que dependen exclusivamente de la expresión del GHSR para internalizar F-ghrelina, aquellas que pueden internalizar F-ghrelina de forma tanto dependiente como independiente del GHSR, y aquellas que no internalizan la F-ghrelina.

El patrón fluorescente que presentan las células marcadas se corresponde con el de una distribución intracelular. El uso de una técnica microscópica como la iluminación con luz estructurada, que posee capacidad de seccionamiento óptico, nos permite asegurar que la fluorescencia medida proviene de planos focales que incluyen inequívocamente el interior celular. Debido a esto, podemos interpretar la señal observada como una internalización del análogo fluorescente en las células.

El patrón de fluorescencia intracelular observado es homogéneo, en contraposición a un patrón punteado típicamente esperable para un proceso de endocitosis mediado por vesículas. Sin embargo, la resolución que se puede alcanzar con el sistema óptico utilizado, afectada por el espesor de la muestra, no permitiría distinguir un patrón de otro a la densidad de marca observada. Para poder confirmar o descartar esta hipótesis se podría utilizar una menor concentración de F-ghrelina para limitar la cantidad de ésta que es internalizada en las células, como así también podrían utilizarse marcadores específicos de vesículas endocíticas, como Rab5, para verificar la co-localización de estas marcas.

En segundo lugar pusimos a punto un modelo *ex vivo* de explantes de plexos coroideos provenientes de ratones WT o deficientes del GHSR. Utilizando este sistema observamos que la cantidad de F-ghrelina internalizada en las células de los plexos coroideos de los ratones deficientes del GHSR fue menor que en los WT, en concordancia a lo que observamos con las inyecciones por vía ICV. Sin embargo, el porcentaje de células epiteliales capaces de internalizar F-ghrelina entre ambos genotipos de ratones fue similar, a diferencia de lo observado cuando

administramos la F-ghrelina por vía ICV. Esta diferencia entre ambos métodos puede deberse a que al aislar los plexos coroideos en el modelo *ex vivo* la polaridad de las células epiteliales se puede ver comprometida. En los explantes de plexos coroideos, tanto la cara apical como la basolateral de las células epiteliales quedan en contacto con el mismo medio de incubación. Además, existe la posibilidad de que algunas células se dañen durante el procedimiento de extracción de los plexos coroideos. Para evitar estos inconvenientes se podría hacer un cultivo primario de células epiteliales de los plexos coroideos, lo que permitiría mantener la polaridad de las células y mejorar su supervivencia. Sin embargo este procedimiento demandaría un nivel de experiencia y complejidad técnica mucho más altas.

Una vez establecido el sistema *ex vivo*, realizamos experimentos utilizando el ligando del GHSR JMV2959. En ellos observamos que el JMV2959 afectaba la internalización de la F-ghrelina, aumentándola. Esto puede deberse a que este ligando, a la concentración utilizada en nuestros experimentos, puede favorecer la permanencia del GHSR en la membrana de las células, lo cual podría aumentar la capacidad de las mismas para internalizar ghrelina [123], [133]. Estos resultados constituyen otro indicio de que las células de los plexos coroideos poseen GHSR y de que manipulando este sistema se pueden inducir diferencias en la internalización de F-ghrelina.

Tanto en los experimentos *in vivo* como *ex vivo* observamos que aún en ausencia del GHSR ocurre la internalización de la F-ghrelina en una fracción de las células. Estos resultados sugieren que el GHSR es parcialmente necesario para la internalización de F-ghrelina en las células de los plexos coroideos, y nos permiten hipotetizar la coexistencia de más de un mecanismo para su incorporación. Con el objetivo de dilucidar los mecanismos moleculares por los cuales se produce la internalización de F-ghrelina en las células de los plexos coroideos, procedimos a realizar ensayos *ex vivo* sobre explantes de plexos coroideos utilizando inhibidores de la endocitosis. En estos experimentos observamos que la capacidad de los plexos coroideos de internalizar la F-ghrelina disminuye en presencia de Pitstop 2, un inhibidor específico de la endocitosis mediada por clatrina [124], [125]. Sin embargo, no se observaron diferencias en la capacidad de las células de los plexos coroideos para internalizar la F-ghrelina en presencia de Colchicina. La Colchicina inhibe la polimerización de los microtúbulos a través de su unión a la tubulina, afectando a la estructura del citoesqueleto celular y a todo mecanismo de transporte que lo involucre, resultando, en principio, un inhibidor general de cualquier proceso de tránsito celular, como así también de procesos de endocitosis en varios tipos celulares [126]–[129]. Si bien esperábamos ver diferencias en la internalización de la F-ghrelina en estas condiciones, es posible que los tiempos o las dosis utilizadas no fueran suficientes para ver un efecto. Estos experimentos podrían repetirse utilizando dosis menores de F-ghrelina para desenmascarar diferencias más sutiles entre estos procesos, así como utilizando dosis mayores de Colchicina o tiempos más largos de pre-incubación para acentuar sus efectos. En

apoyo de nuestras observaciones, está descrito que las células epiteliales de los plexos coroideos expresan una variedad de proteínas adaptadoras que intervienen en el proceso de endocitosis mediada por clatrina [134]. Además, dado que en algunas de las células de los plexos coroideos la endocitosis de ghrelina parece depender del GHSR, la dependencia de clatrina se corresponde con la forma de endocitosis descrita para dicho receptor a través de  $\beta$ -arrestina. Los resultados obtenidos hasta el momento parecen apoyar, al menos parcialmente, esta vía de internalización como una de las presentes en este tejido.

Además, para obtener más información sobre este posible mecanismo endocítico, realizamos experimentos a una temperatura menor a la fisiológica, ya que se sabe que diversos procesos moleculares y celulares activos, en particular los asociados al tráfico vesicular, son sensibles a la temperatura [135], [136]. Al emplear nuestro sistema *ex vivo* esperábamos que la internalización de la F-ghrelina en las células de los plexos coroideos disminuyera a la temperatura de 4°C con respecto a 37°C. Sin embargo, esto no fue lo observado, lo que indicaría que este cambio de temperatura no afecta el proceso de internalización de F-ghrelina para las condiciones en la que se realizó el experimento, incluyendo la concentración utilizada de F-ghrelina. Por otro lado, como la internalización de ghrelina en las células de los plexos coroideos posiblemente ocurra por más de una vía a la concentración de F-ghrelina utilizada, uno de estos mecanismos podría encontrarse saturado y por ende no nos permitiría evidenciar cambios en el proceso endocítico. A futuro, pensamos realizar nuevos experimentos utilizando una concentración menor de F-ghrelina (30 nM por ejemplo), los cuales podrían brindarnos información valiosa para comprender mejor los procesos involucrados.

Por último realizamos experimentos de liberación de la ghrelina. Estos experimentos mostraron una reducción de la marca de F-ghrelina en los explantes de plexos coroideos luego de someterlos a una segunda etapa de incubación en un medio sin el trazador. Este resultado sugiere que dichas células tienen la capacidad de liberar al medio de cultivo la ghrelina previamente internalizada, y constituyen otro indicio de que las células de los plexos coroideos internalizan la ghrelina y serían capaces de liberarla posteriormente. Estos experimentos podrían ampliarse en un futuro para dilucidar la naturaleza del posible mecanismo involucrado, por ejemplo, utilizando inhibidores de las vías vesiculares de exocitosis o bloqueantes del tráfico transcelular.

En conclusión, estos resultados apoyan la hipótesis de que las células de los plexos coroideos son capaces de internalizar la ghrelina tanto de manera dependiente como independiente del GHSR. Además, los resultados experimentales ponen de manifiesto la presencia de procesos endocíticos dependientes de clatrina, y de mecanismos de liberación vesicular, ambos compatibles con una vía de transporte transcelular de esta hormona.



# BIBLIOGRAFÍA



- [1] C. Y. Bowers, F. Momany, G. A. Reynolds, D. Chang, A. Hong, y K. Chang, «Structure-Activity Relationships of a Synthetic Pentapeptide that Specifically Releases Growth Hormone *in Vitro* \*», *Endocrinology*, vol. 106, n.º 3, pp. 663-667, mar. 1980, doi: 10.1210/endo-106-3-663.
- [2] F. A. Momany, C. Y. Bowers, G. A. Reynolds, D. Chang, A. Hong, y K. Newlander, «Design, Synthesis, and Biological Activity of Peptides which Release Growth Hormone *in Vitro*\*», *Endocrinology*, vol. 108, n.º 1, pp. 31-39, ene. 1981, doi: 10.1210/endo-108-1-31.
- [3] S. L. Dickson, G. Leng, y I. C. A. F. Robinson, «Systemic administration of growth hormone-releasing peptide activates hypothalamic arcuate neurons», *Neuroscience*, vol. 53, n.º 2, pp. 303-306, mar. 1993, doi: 10.1016/0306-4522(93)90197-N.
- [4] S. L. Dickson y S. M. Luckman, «Induction of c-fos Messenger Ribonucleic Acid in Neuropeptide Y and Growth Hormone (GH)-Releasing Factor Neurons in the Rat Arcuate Nucleus Following Systemic Injection of the GH Secretagogue, GH-Releasing Peptide-6», vol. 138, n.º 2, p. 7, 1997.
- [5] A. D. Blake y R. G. Smith, «Desensitization studies using perfused rat pituitary cells show that growth hormone-releasing hormone and His-d\|x=req-\ Trp-Ala-Trp-d-Phe-Lys-NH<sub>2</sub> stimulate growth hormone release through distinct receptor sites», p. 9.
- [6] C. Y. Bowers *et al.*, «Growth Hormone (GH)-Releasing Peptide Stimulates GH Release in Normal Men and Acts Synergistically with GH-Releasing Hormone\*», *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, vol. 70, n.º 4, pp. 975-982, abr. 1990, doi: 10.1210/jcem-70-4-975.
- [7] R. Cheng, W. W.-S. Chan, B. Butler, A. Barreto, y R. G. Smith, «Evidence for a Role of Protein Kinase-C in His-D-Trp Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH<sub>2</sub> -Induced Growth Hormone Release from Rat Primary Pituitary Cells», *Endocrinology*, vol. 129, n.º 6, pp. 3337-3342, dic. 1991, doi: 10.1210/endo-129-6-3337.
- [8] A. D. Howard *et al.*, «A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release», *Science*, vol. 273, n.º 5277, Art. n.º 5277, ago. 1996.
- [9] M. Kojima, H. Hosoda, Y. Date, M. Nakazato, H. Matsuo, y K. Kangawa, «Ghrelin is a growth-hormone- releasing acylated peptide from stomach», vol. 402, p. 5, 1999.
- [10] T. D. Müller *et al.*, «Ghrelin», *Mol Metab*, vol. 4, n.º 6, Art. n.º 6, jun. 2015, doi: 10.1016/j.molmet.2015.03.005.
- [11] M. Kojima y K. Kangawa, «Ghrelin: Structure and Function», *Physiological Reviews*, vol. 85, n.º 2, pp. 495-522, abr. 2005, doi: 10.1152/physrev.00012.2004.
- [12] P. L. Jeffery *et al.*, «Expression of the Ghrelin Axis in the Mouse: An Exon 4- Deleted Mouse Proghrelin Variant Encodes a Novel C Terminal Peptide», *Endocrinology*, vol. 146, n.º 1, pp. 432-440, ene. 2005, doi: 10.1210/en.2003-1466.
- [13] T. Takahashi *et al.*, «Production of n-octanoyl-modified Ghrelin in Cultured Cells Requires Prohormone Processing Protease and Ghrelin O-acyltransferase, as well as n-octanoic Acid», *The Journal of Biochemistry*, vol. 146, n.º 5, pp. 675-682, nov. 2009, doi: 10.1093/jb/mvp112.

- [14] X. Zhu, Y. Cao, K. Voodg, y D. F. Steiner, «On the Processing of Proghrelin to Ghrelin», *J. Biol. Chem.*, vol. 281, n.º 50, pp. 38867-38870, dic. 2006, doi: 10.1074/jbc.M607955200.
- [15] J. Yang, M. S. Brown, G. Liang, N. V. Grishin, y J. L. Goldstein, «Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone», *Cell*, vol. 132, n.º 3, Art. n.º 3, feb. 2008, doi: 10.1016/j.cell.2008.01.017.
- [16] J. A. Gutierrez *et al.*, «Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 105, n.º 17, Art. n.º 17, abr. 2008, doi: 10.1073/pnas.0800708105.
- [17] C. Dornonville de la Cour *et al.*, «A-like cells in the rat stomach contain ghrelin and do not operate under gastrin control», *Regulatory Peptides*, vol. 99, n.º 2-3, pp. 141-150, jun. 2001, doi: 10.1016/S0167-0115(01)00243-9.
- [18] O. Gualillo *et al.*, «Ghrelin, A Novel Placental-Derived Hormone», vol. 142, n.º 2, p. 7, 2001.
- [19] Y. Date *et al.*, «Ghrelin, a Novel Growth Hormone-Releasing Acylated Peptide, Is Synthesized in a Distinct Endocrine Cell Type in the Gastrointestinal Tracts of Rats and Humans», vol. 141, n.º 11, p. 7, 2000.
- [20] J. M. Zigman, J. E. Jones, C. E. Lee, C. B. Saper, y J. K. Elmquist, «Expression of ghrelin receptor mRNA in the rat and the mouse brain», *J. Comp. Neurol.*, vol. 494, n.º 3, Art. n.º 3, ene. 2006, doi: 10.1002/cne.20823.
- [21] M. Kojima, H. Hosoda, H. Matsuo, y K. Kangawa, «Ghrelin: discovery of the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor», *Trends in Endocrinology & Metabolism*, vol. 12, n.º 3, pp. 118-122, abr. 2001, doi: 10.1016/S1043-2760(00)00362-3.
- [22] K. A. Bennett, C. J. Langmead, A. Wise, y G. Milligan, «Growth Hormone Secretagogues and Growth Hormone Releasing Peptides Act As Orthosteric Super-Agonists but Not Allosteric Regulators for Activation of the G Protein  $G_{\alpha 1}$  by the Ghrelin Receptor», *Mol Pharmacol*, vol. 76, n.º 4, pp. 802-811, oct. 2009, doi: 10.1124/mol.109.056101.
- [23] K. Dezaki, M. Kakei, y T. Yada, «Ghrelin Uses  $G_{i2}$  and Activates Voltage-Dependent  $K^+$  Channels to Attenuate Glucose-Induced  $Ca^{2+}$  Signaling and Insulin Release in Islet -Cells: Novel Signal Transduction of Ghrelin», *Diabetes*, vol. 56, n.º 9, pp. 2319-2327, sep. 2007, doi: 10.2337/db07-0345.
- [24] X. M. Guan *et al.*, «Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues», *Brain Res. Mol. Brain Res.*, vol. 48, n.º 1, Art. n.º 1, ago. 1997.
- [25] N. Hattori, T. Saito, T. Yagyu, B.-H. Jiang, K. Kitagawa, y C. Inagaki, «GH, GH Receptor, GH Secretagogue Receptor, and Ghrelin Expression in Human T Cells, B Cells, and Neutrophils», p. 8.
- [26] M. Damian *et al.*, «High Constitutive Activity Is an Intrinsic Feature of Ghrelin Receptor Protein: A STUDY WITH A FUNCTIONAL MONOMERIC GHS-R1a RECEPTOR RECONSTITUTED IN LIPID DISCS», *J. Biol. Chem.*, vol. 287, n.º 6, pp. 3630-3641, feb. 2012, doi: 10.1074/jbc.M111.288324.
- [27] B. Holst, A. Cygankiewicz, T. H. Jensen, M. Ankersen, y T. W. Schwartz, «High constitutive signaling of the ghrelin receptor--identification of a potent inverse agonist», *Mol. Endocrinol.*, vol. 17, n.º 11, Art. n.º 11, nov. 2003, doi: 10.1210/me.2003-0069.

- [28] A. Cabral *et al.*, «Circulating Ghrelin Acts on GABA Neurons of the Area Postrema and Mediates Gastric Emptying in Male Mice», *Endocrinology*, vol. 158, n.º 5, Art. n.º 5, may 2017, doi: 10.1210/en.2016-1815.
- [29] H. Iwakura *et al.*, «Effects of ghrelin administration on decreased growth hormone status in obese animals», *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, vol. 293, n.º 3, Art. n.º 3, sep. 2007, doi: 10.1152/ajpendo.00681.2006.
- [30] K. Takaya *et al.*, «Ghrelin strongly stimulates growth hormone release in humans», *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 85, n.º 12, Art. n.º 12, dic. 2000, doi: 10.1210/jcem.85.12.7167.
- [31] S. Yanagi, T. Sato, K. Kangawa, y M. Nakazato, «The Homeostatic Force of Ghrelin», *Cell Metab.*, vol. 27, n.º 4, Art. n.º 4, abr. 2018, doi: 10.1016/j.cmet.2018.02.008.
- [32] M. Tschöp *et al.*, «Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels», *J Endocrinol Invest*, vol. 24, n.º 6, pp. RC19-RC21, jun. 2001, doi: 10.1007/BF03351037.
- [33] D. E. Cummings, J. Q. Purnell, R. S. Frayo, K. Schmidova, B. E. Wisse, y D. S. Weigle, «A Preprandial Rise in Plasma Ghrelin Levels Suggests a Role in Meal Initiation in Humans», *Diabetes*, vol. 50, n.º 8, pp. 1714-1719, ago. 2001, doi: 10.2337/diabetes.50.8.1714.
- [34] K. McCowen, J. Maykel, B. Bistrrian, y P. Ling, «Circulating ghrelin concentrations are lowered by intravenous glucose or hyperinsulinemic euglycemic conditions in rodents», *Journal of Endocrinology*, vol. 175, n.º 2, pp. R7-11, nov. 2002, doi: 10.1677/joe.0.175r007.
- [35] T. Shiiya *et al.*, «Plasma Ghrelin Levels in Lean and Obese Humans and the Effect of Glucose on Ghrelin Secretion», p. 5.
- [36] J. Erdmann, F. Lippl, y V. Schusdziarra, «Differential effect of protein and fat on plasma ghrelin levels in man», *Regulatory Peptides*, vol. 116, n.º 1-3, pp. 101-107, nov. 2003, doi: 10.1016/S0167-0115(03)00195-2.
- [37] Y. Greenman, N. Golani, S. Gilad, M. Yaron, R. Limor, y N. Stern, «Ghrelin secretion is modulated in a nutrient- and gender-specific manner», *Clin Endocrinol*, vol. 60, n.º 3, pp. 382-388, mar. 2004, doi: 10.1111/j.1365-2265.2004.01993.x.
- [38] T. K. Hansen *et al.*, «Weight loss increases circulating levels of ghrelin in human obesity: *Weight loss and ghrelin*», *Clinical Endocrinology*, vol. 56, n.º 2, pp. 203-206, feb. 2002, doi: 10.1046/j.0300-0664.2001.01456.x.
- [39] A. M. Haqq *et al.*, «Serum Ghrelin Levels Are Inversely Correlated with Body Mass Index, Age, and Insulin Concentrations in Normal Children and Are Markedly Increased in Prader-Willi Syndrome», *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, vol. 88, n.º 1, pp. 174-178, ene. 2003, doi: 10.1210/jc.2002-021052.
- [40] D. E. Cummings *et al.*, «Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery», *N. Engl. J. Med.*, vol. 346, n.º 21, Art. n.º 21, may 2002, doi: 10.1056/NEJMoa012908.
- [41] H. Ariyasu *et al.*, «Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans», *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 86, n.º 10, Art. n.º 10, oct. 2001, doi: 10.1210/jcem.86.10.7885.
- [42] L. Soriano-Guillén, V. Barrios, Á. Campos-Barros, y J. Argente, «Ghrelin levels in obesity and anorexia nervosa: effect of weight reduction or recuperation»,

- The Journal of Pediatrics*, vol. 144, n.º 1, pp. 36-42, ene. 2004, doi: 10.1016/j.jpeds.2003.10.036.
- [43] B. Geloneze, M. A. Tambascia, V. F. Pilla, S. R. Geloneze, E. M. Repetto, y J. C. Pareja, «Ghrelin: a Gut-Brain Hormone: Effect of Gastric Bypass Surgery», *obes surg*, vol. 13, n.º 1, pp. 17-22, feb. 2003, doi: 10.1381/096089203321136539.
- [44] M. Krs, V. Justová, Z. Lacinová, y Z. Jarkovská, «Plasma ghrelin levels and malnutrition», vol. 8, n.º 3, p. 5, 2003.
- [45] A. M. Haqq *et al.*, «Circulating Ghrelin Levels Are Suppressed by Meals and Octreotide Therapy in Children with Prader-Willi Syndrome», *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, vol. 88, n.º 8, pp. 3573-3576, ago. 2003, doi: 10.1210/jc.2003-030205.
- [46] M. E. Davis *et al.*, «Urocortin-1 Infusion in Normal Humans», *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, vol. 89, n.º 3, pp. 1402-1409, mar. 2004, doi: 10.1210/jc.2003-031231.
- [47] H. Nørrelund *et al.*, «Ghrelin immunoreactivity in human plasma is suppressed by somatostatin: Ghrelin in human plasma», *Clinical Endocrinology*, vol. 57, n.º 4, pp. 539-546, oct. 2002, doi: 10.1046/j.1365-2265.2002.01649.x.
- [48] J. L. Chan, J. Bullen, J. H. Lee, N. Yiannakouris, y C. S. Mantzoros, «Ghrelin Levels Are Not Regulated by Recombinant Leptin Administration and/or Three Days of Fasting in Healthy Subjects», *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, vol. 89, n.º 1, pp. 335-343, ene. 2004, doi: 10.1210/jc.2003-031412.
- [49] J. Gagnon y Y. Anini, «Insulin and Norepinephrine Regulate Ghrelin Secretion from a Rat Primary Stomach Cell Culture», *Endocrinology*, vol. 153, n.º 8, pp. 3646-3656, ago. 2012, doi: 10.1210/en.2012-1040.
- [50] T. O. Mundinger, D. E. Cummings, y G. J. Taborsky, «Direct Stimulation of Ghrelin Secretion by Sympathetic Nerves», *Endocrinology*, vol. 147, n.º 6, pp. 2893-2901, jun. 2006, doi: 10.1210/en.2005-1182.
- [51] T.-J. Zhao *et al.*, «Ghrelin secretion stimulated by  $\beta$ 1-adrenergic receptors in cultured ghrelinoma cells and in fasted mice», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 107, n.º 36, Art. n.º 36, sep. 2010, doi: 10.1073/pnas.1011116107.
- [52] B. K. Mani, S. Osborne-Lawrence, P. Vijayaraghavan, C. Hepler, y J. M. Zigman, « $\beta$ 1-Adrenergic receptor deficiency in ghrelin-expressing cells causes hypoglycemia in susceptible individuals», *Journal of Clinical Investigation*, vol. 126, n.º 9, pp. 3467-3478, ago. 2016, doi: 10.1172/JCI86270.
- [53] S. Janssen, J. Laermans, P.-J. Verhulst, T. Thijs, J. Tack, y I. Depoortere, «Bitter taste receptors and  $\alpha$ -gustducin regulate the secretion of ghrelin with functional effects on food intake and gastric emptying», *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 108, n.º 5, pp. 2094-2099, feb. 2011, doi: 10.1073/pnas.1011508108.
- [54] L. Vancleef *et al.*, «Chemosensory signalling pathways involved in sensing of amino acids by the ghrelin cell», *Sci Rep*, vol. 5, n.º 1, p. 15725, dic. 2015, doi: 10.1038/srep15725.
- [55] D. L. Drazen, T. P. Vahl, D. A. D'Alessio, R. J. Seeley, y S. C. Woods, «Effects of a fixed meal pattern on ghrelin secretion: evidence for a learned response independent of nutrient status», *Endocrinology*, vol. 147, n.º 1, Art. n.º 1, ene. 2006, doi: 10.1210/en.2005-0973.
- [56] F. Broglio *et al.*, «Acetylcholine Regulates Ghrelin Secretion in Humans», *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, vol. 89, n.º 5, pp. 2429-2433, may 2004, doi: 10.1210/jc.2003-031517.

- [57] H. Hosoda y K. Kangawa, «The autonomic nervous system regulates gastric ghrelin secretion in rats», *Regulatory Peptides*, vol. 146, n.º 1-3, pp. 12-18, feb. 2008, doi: 10.1016/j.regpep.2007.07.005.
- [58] M. Schneeberger, R. Gomis, y M. Claret, «Hypothalamic and brainstem neuronal circuits controlling homeostatic energy balance», *J. Endocrinol.*, vol. 220, n.º 2, Art. n.º 2, feb. 2014, doi: 10.1530/JOE-13-0398.
- [59] H. Y. Chen *et al.*, «Orexigenic Action of Peripheral Ghrelin Is Mediated by Neuropeptide Y and Agouti-Related Protein», *Endocrinology*, vol. 145, n.º 6, pp. 2607-2612, jun. 2004, doi: 10.1210/en.2003-1596.
- [60] S. Luquet, C. T. Phillips, y R. D. Palmiter, «NPY/AgRP neurons are not essential for feeding responses to glucoprivation», *Peptides*, vol. 28, n.º 2, Art. n.º 2, feb. 2007, doi: 10.1016/j.peptides.2006.08.036.
- [61] A. Cabral, E. Portiansky, E. Sánchez-Jaramillo, J. M. Zigman, y M. Perello, «Ghrelin activates hypophysiotropic corticotropin-releasing factor neurons independently of the arcuate nucleus», *Psychoneuroendocrinology*, vol. 67, pp. 27-39, may 2016, doi: 10.1016/j.psyneuen.2016.01.027.
- [62] A. Cabral, S. Valdivia, G. Fernandez, M. Reynaldo, y M. Perello, «Divergent neuronal circuitries underlying acute orexigenic effects of peripheral or central ghrelin: critical role of brain accessibility», *J. Neuroendocrinol.*, vol. 26, n.º 8, Art. n.º 8, ago. 2014, doi: 10.1111/jne.12168.
- [63] J. Biag *et al.*, «Cyto- and chemoarchitecture of the hypothalamic paraventricular nucleus in the C57BL/6J male mouse: a study of immunostaining and multiple fluorescent tract tracing», *J. Comp. Neurol.*, vol. 520, n.º 1, Art. n.º 1, ene. 2012, doi: 10.1002/cne.22698.
- [64] A. Cabral, O. Suescun, J. M. Zigman, y M. Perello, «Ghrelin indirectly activates hypophysiotropic CRF neurons in rodents», *PLoS ONE*, vol. 7, n.º 2, Art. n.º 2, 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0031462.
- [65] C. J. Price, T. D. Hoyda, y A. V. Ferguson, «The area postrema: a brain monitor and integrator of systemic autonomic state», *Neuroscientist*, vol. 14, n.º 2, Art. n.º 2, abr. 2008, doi: 10.1177/1073858407311100.
- [66] M. S. King, «Anatomy of the Rostral Nucleus of the Solitary Tract», en *The Role of the Nucleus of the Solitary Tract in Gustatory Processing*, R. M. Bradley, Ed. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis, 2007.
- [67] B. K. Mani *et al.*, «Neuroanatomical characterization of a growth hormone secretagogue receptor-green fluorescent protein reporter mouse», *J. Comp. Neurol.*, vol. 522, n.º 16, Art. n.º 16, nov. 2014, doi: 10.1002/cne.23627.
- [68] M. P. Cornejo *et al.*, «Ghrelin receptor signaling targets segregated clusters of neurons within the nucleus of the solitary tract», *Brain Struct Funct*, vol. 223, n.º 7, pp. 3133-3147, sep. 2018, doi: 10.1007/s00429-018-1682-5.
- [69] Y. Li, X. Wu, Y. Zhao, S. Chen, y C. Owyang, «Ghrelin acts on the dorsal vagal complex to stimulate pancreatic protein secretion», *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, vol. 290, n.º 6, Art. n.º 6, jun. 2006, doi: 10.1152/ajpgi.00493.2005.
- [70] S. Ikemoto, «Dopamine reward circuitry: Two projection systems from the ventral midbrain to the nucleus accumbens-olfactory tubercle complex», *Brain Research Reviews*, vol. 56, n.º 1, pp. 27-78, nov. 2007, doi: 10.1016/j.brainresrev.2007.05.004.
- [71] R. G. Nair-Roberts, S. D. Chatelain-Badie, E. Benson, H. White-Cooper, J. P. Bolam, y M. A. Ungless, «Stereological estimates of dopaminergic, GABAergic

- and glutamatergic neurons in the ventral tegmental area, substantia nigra and retrorubral field in the rat», *Neuroscience*, vol. 152, n.º 4, Art. n.º 4, abr. 2008, doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.01.046.
- [72] J.-C. Chuang *et al.*, «Ghrelin mediates stress-induced food-reward behavior in mice», *J. Clin. Invest.*, vol. 121, n.º 7, Art. n.º 7, jul. 2011, doi: 10.1172/JCI57660.
- [73] E. Jerlhag, E. Egecioglu, S. L. Dickson, A. Douhan, L. Svensson, y J. A. Engel, «Ghrelin administration into tegmental areas stimulates locomotor activity and increases extracellular concentration of dopamine in the nucleus accumbens», *Addict Biol*, vol. 12, n.º 1, Art. n.º 1, mar. 2007, doi: 10.1111/j.1369-1600.2006.00041.x.
- [74] M. Perello y S. L. Dickson, «Ghrelin signalling on food reward: a salient link between the gut and the mesolimbic system», *J. Neuroendocrinol.*, vol. 27, n.º 6, Art. n.º 6, jun. 2015, doi: 10.1111/jne.12236.
- [75] E. Disse *et al.*, «Peripheral ghrelin enhances sweet taste food consumption and preference, regardless of its caloric content», *Physiology & Behavior*, vol. 101, n.º 2, pp. 277-281, sep. 2010, doi: 10.1016/j.physbeh.2010.05.017.
- [76] M. Perello *et al.*, «Ghrelin increases the rewarding value of high-fat diet in an orexin-dependent manner», *Biol. Psychiatry*, vol. 67, n.º 9, Art. n.º 9, may 2010, doi: 10.1016/j.biopsych.2009.10.030.
- [77] J. F. Davis *et al.*, «GOAT induced ghrelin acylation regulates hedonic feeding», *Horm Behav*, vol. 62, n.º 5, Art. n.º 5, nov. 2012, doi: 10.1016/j.yhbeh.2012.08.009.
- [78] E. Jerlhag *et al.*, «Requirement of central ghrelin signaling for alcohol reward», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 106, n.º 27, Art. n.º 27, jul. 2009, doi: 10.1073/pnas.0812809106.
- [79] L. Prieto-Garcia, E. Egecioglu, E. Studer, L. Westberg, y E. Jerlhag, «Ghrelin and GHS-R1A signaling within the ventral and laterodorsal tegmental area regulate sexual behavior in sexually naïve male mice», *Psychoneuroendocrinology*, vol. 62, pp. 392-402, dic. 2015, doi: 10.1016/j.psyneuen.2015.09.009.
- [80] M. P. Cornejo, F. Barrile, P. N. De Francesco, E. L. Portiansky, M. Reynaldo, y M. Perello, «Ghrelin Recruits Specific Subsets of Dopamine and GABA Neurons of Different Ventral Tegmental Area Sub-nuclei», *Neuroscience*, sep. 2018, doi: 10.1016/j.neuroscience.2018.09.027.
- [81] A. Abizaid *et al.*, «Ghrelin modulates the activity and synaptic input organization of midbrain dopamine neurons while promoting appetite», *J. Clin. Invest.*, vol. 116, n.º 12, Art. n.º 12, dic. 2006, doi: 10.1172/JCI29867.
- [82] A. Cabral, G. Fernandez, y M. Perello, «Analysis of brain nuclei accessible to ghrelin present in the cerebrospinal fluid», *Neuroscience*, vol. 253, pp. 406-415, dic. 2013, doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.09.008.
- [83] V. P. Carlini *et al.*, «Ghrelin increases anxiety-like behavior and memory retention in rats», *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 299, n.º 5, Art. n.º 5, dic. 2002.
- [84] L. Chen *et al.*, «Local infusion of ghrelin enhanced hippocampal synaptic plasticity and spatial memory through activation of phosphoinositide 3-kinase in the dentate gyrus of adult rats», *Eur. J. Neurosci.*, vol. 33, n.º 2, Art. n.º 2, ene. 2011, doi: 10.1111/j.1460-9568.2010.07491.x.

- [85] S. Diano *et al.*, «Ghrelin controls hippocampal spine synapse density and memory performance», *Nat. Neurosci.*, vol. 9, n.º 3, Art. n.º 3, mar. 2006, doi: 10.1038/nn1656.
- [86] P. Ciofi *et al.*, «Brain-Endocrine Interactions: A Microvascular Route in the Mediobasal Hypothalamus», *Endocrinology*, vol. 150, n.º 12, Art. n.º 12, dic. 2009, doi: 10.1210/en.2009-0584.
- [87] S. Miyata, «New aspects in fenestrated capillary and tissue dynamics in the sensory circumventricular organs of adult brains», *Front Neurosci*, vol. 9, p. 390, 2015, doi: 10.3389/fnins.2015.00390.
- [88] P. M. Gross, A. Weindl, y K. M. Knigge, «Peering through the Windows of the Brain», *J Cereb Blood Flow Metab*, vol. 7, n.º 6, pp. 663-672, dic. 1987, doi: 10.1038/jcbfm.1987.120.
- [89] G. T. Cottrell y A. V. Ferguson, «Sensory circumventricular organs: central roles in integrated autonomic regulation», *Regulatory Peptides*, vol. 117, n.º 1, pp. 11-23, ene. 2004, doi: 10.1016/j.regpep.2003.09.004.
- [90] P. M. Treuting, S. M. Dintzis, C. W. Frevert, H. D. Liggitt, y K. S. Montine, Eds., *Comparative anatomy and histology: a mouse and human atlas*, 1st ed. Amsterdam ; Boston: Elsevier/Academic Press, 2012.
- [91] V. Prevot, B. Dehouck, A. Sharif, P. Ciofi, P. Giacobini, y J. Clasadonte, «The Versatile Tanycyte: A Hypothalamic Integrator of Reproduction and Energy Metabolism», *Endocrine Reviews*, vol. 39, n.º 3, pp. 333-368, jun. 2018, doi: 10.1210/er.2017-00235.
- [92] A. Cabral, E. J. López Soto, J. Epelbaum, y M. Perelló, «Is Ghrelin Synthesized in the Central Nervous System?», *Int J Mol Sci*, vol. 18, n.º 3, Art. n.º 3, mar. 2017, doi: 10.3390/ijms18030638.
- [93] A. Cabral, P. N. De Francesco, y M. Perello, «Brain circuits mediating the orexigenic action of peripheral ghrelin: narrow gates for a vast kingdom», *Front Endocrinol (Lausanne)*, vol. 6, p. 44, 2015, doi: 10.3389/fendo.2015.00044.
- [94] N. J. Abbott, A. A. K. Patabendige, D. E. M. Dolman, S. R. Yusof, y D. J. Begley, «Structure and function of the blood-brain barrier», *Neurobiol. Dis.*, vol. 37, n.º 1, Art. n.º 1, ene. 2010, doi: 10.1016/j.nbd.2009.07.030.
- [95] W. Pan y A. J. Kastin, «Why study transport of peptides and proteins at the neurovascular interface», *Brain Res. Brain Res. Rev.*, vol. 46, n.º 1, Art. n.º 1, ago. 2004, doi: 10.1016/j.brainresrev.2004.04.006.
- [96] E. M. Rhea, T. S. Salameh, S. Gray, J. Niu, W. A. Banks, y J. Tong, «Ghrelin transport across the blood-brain barrier can occur independently of the growth hormone secretagogue receptor», *Mol Metab*, vol. 18, pp. 88-96, 2018, doi: 10.1016/j.molmet.2018.09.007.
- [97] W. Pan, H. Tu, y A. J. Kastin, «Differential BBB interactions of three ingestive peptides: obestatin, ghrelin, and adiponectin», *Peptides*, vol. 27, n.º 4, Art. n.º 4, abr. 2006, doi: 10.1016/j.peptides.2005.12.014.
- [98] H. M. Duvernoy y P.-Y. Risold, «The circumventricular organs: An atlas of comparative anatomy and vascularization», *Brain Research Reviews*, vol. 56, n.º 1, pp. 119-147, nov. 2007, doi: 10.1016/j.brainresrev.2007.06.002.
- [99] P. Ciofi, «The arcuate nucleus as a circumventricular organ in the mouse», *Neurosci. Lett.*, vol. 487, n.º 2, Art. n.º 2, ene. 2011, doi: 10.1016/j.neulet.2010.10.019.

- [100] F. Langlet *et al.*, «Tanycytic VEGF-A boosts blood-hypothalamus barrier plasticity and access of metabolic signals to the arcuate nucleus in response to fasting», *Cell Metab.*, vol. 17, n.º 4, Art. n.º 4, abr. 2013, doi: 10.1016/j.cmet.2013.03.004.
- [101] E. M. Rodríguez, J. L. Blázquez, y M. Guerra, «The design of barriers in the hypothalamus allows the median eminence and the arcuate nucleus to enjoy private milieus: the former opens to the portal blood and the latter to the cerebrospinal fluid», *Peptides*, vol. 31, n.º 4, Art. n.º 4, abr. 2010, doi: 10.1016/j.peptides.2010.01.003.
- [102] P. M. Gross, «Morphology and physiology of capillary systems in subregions of the subfornical organ and area postrema», *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, vol. 69, n.º 7, pp. 1010-1025, jul. 1991, doi: 10.1139/y91-152.
- [103] R. McGirr, M. S. McFarland, J. McTavish, L. G. Luyt, y S. Dhanvantari, «Design and characterization of a fluorescent ghrelin analog for imaging the growth hormone secretagogue receptor 1a», *Regul. Pept.*, vol. 172, n.º 1-3, Art. n.º 1-3, dic. 2011, doi: 10.1016/j.regpep.2011.08.011.
- [104] J.-P. Leyris *et al.*, «Homogeneous time-resolved fluorescence-based assay to screen for ligands targeting the growth hormone secretagogue receptor type 1a», *Anal. Biochem.*, vol. 408, n.º 2, Art. n.º 2, ene. 2011, doi: 10.1016/j.ab.2010.09.030.
- [105] M. Schaeffer *et al.*, «Rapid sensing of circulating ghrelin by hypothalamic appetite-modifying neurons», *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 110, pp. 1512-1517, ene. 2013, doi: 10.1073/pnas.1212137110.
- [106] R. G. P. Denis *et al.*, «Palatability Can Drive Feeding Independent of AgRP Neurons», *Cell Metabolism*, vol. 22, n.º 4, pp. 646-657, oct. 2015, doi: 10.1016/j.cmet.2015.07.011.
- [107] N. R. Saunders, C. J. Ek, M. D. Habgood, y K. M. Dziegielewska, «Barriers in the brain: a renaissance?», *Trends Neurosci.*, vol. 31, n.º 6, Art. n.º 6, jun. 2008, doi: 10.1016/j.tins.2008.03.003.
- [108] F. Langlet, A. Mullier, S. G. Bouret, V. Prevot, y B. Dehouck, «Tanycyte-like cells form a blood-cerebrospinal fluid barrier in the circumventricular organs of the mouse brain», *J. Comp. Neurol.*, vol. 521, n.º 15, Art. n.º 15, oct. 2013, doi: 10.1002/cne.23355.
- [109] D. Smith, C. Johanson, y R. Keep, «Peptide and peptide analog transport systems at the blood-CSF barrier», *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 56, n.º 12, pp. 1765-1791, oct. 2004, doi: 10.1016/j.addr.2004.07.008.
- [110] I. Lazcano *et al.*, «Fasting Enhances Pyroglutamyl Peptidase II Activity in Tanycytes of the Mediobasal Hypothalamus of Male Adult Rats», *Endocrinology*, vol. 156, n.º 7, Art. n.º 7, jul. 2015, doi: 10.1210/en.2014-1885.
- [111] M. Uriarte *et al.*, «Evidence Supporting a Role for the Blood-Cerebrospinal Fluid Barrier Transporting Circulating Ghrelin into the Brain», *Mol. Neurobiol.*, oct. 2018, doi: 10.1007/s12035-018-1362-8.
- [112] T. Laeger, H. Sauerwein, A. Tuchscherer, O. Bellmann, C. C. Metges, y B. Kuhla, «Concentrations of hormones and metabolites in cerebrospinal fluid and plasma of dairy cows during the periparturient period», *J. Dairy Sci.*, vol. 96, n.º 5, Art. n.º 5, may 2013, doi: 10.3168/jds.2012-5909.
- [113] N. A. Tritos, A. Kokkinos, E. Lampadariou, E. Alexiou, N. Katsilambros, y E. Maratos-Flier, «Cerebrospinal fluid ghrelin is negatively associated with body



- mass index», *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 88, n.º 6, Art. n.º 6, jun. 2003, doi: 10.1210/jc.2003-030300.
- [114] D. Grouselle *et al.*, «Pulsatile cerebrospinal fluid and plasma ghrelin in relation to growth hormone secretion and food intake in the sheep», *J. Neuroendocrinol.*, vol. 20, n.º 10, Art. n.º 10, oct. 2008, doi: 10.1111/j.1365-2826.2008.01770.x.
- [115] G. Collden *et al.*, «Neonatal overnutrition causes early alterations in the central response to peripheral ghrelin», *Mol Metab*, vol. 4, n.º 1, Art. n.º 1, ene. 2015, doi: 10.1016/j.molmet.2014.10.003.
- [116] M. Perello, A. Cabral, M. P. Cornejo, P. N. De Francesco, G. Fernandez, y M. Uriarte, «Brain accessibility delineates the central effects of circulating ghrelin», *J. Neuroendocrinol.*, vol. 31, n.º 7, Art. n.º 7, jul. 2019, doi: 10.1111/jne.12677.
- [117] H. Schröder, N. Moser, y S. Huggenberger, *Neuroanatomy of the Mouse: An Introduction*. Cham: Springer International Publishing, 2020.
- [118] N. D. Holliday, B. Holst, E. A. Rodionova, T. W. Schwartz, y H. M. Cox, «Importance of constitutive activity and arrestin-independent mechanisms for intracellular trafficking of the ghrelin receptor», *Mol. Endocrinol.*, vol. 21, n.º 12, Art. n.º 12, dic. 2007, doi: 10.1210/me.2007-0254.
- [119] F. Marques *et al.*, «Transcriptome signature of the adult mouse choroid plexus», *Fluids Barriers CNS*, vol. 8, n.º 1, Art. n.º 1, ene. 2011, doi: 10.1186/2045-8118-8-10.
- [120] J. P. Camiña, M. C. Carreira, S. El Messari, C. Llorens-Cortes, R. G. Smith, y F. F. Casanueva, «Desensitization and endocytosis mechanisms of ghrelin-activated growth hormone secretagogue receptor 1a», *Endocrinology*, vol. 145, n.º 2, Art. n.º 2, feb. 2004, doi: 10.1210/en.2003-0974.
- [121] J. M. Zigman *et al.*, «Mice lacking ghrelin receptors resist the development of diet-induced obesity», *J. Clin. Invest.*, vol. 115, n.º 12, Art. n.º 12, dic. 2005, doi: 10.1172/JCI26002.
- [122] G. Paxinos y K. B. J. Franklin, *The mouse brain in stereotaxic coordinates*, 2nd ed. San Diego: Academic Press, 2001.
- [123] A. Abizaid y J. L. Hougland, «Ghrelin Signaling: GOAT and GHS-R1a Take a LEAP in Complexity», *Trends in Endocrinology & Metabolism*, vol. 31, n.º 2, pp. 107-117, feb. 2020, doi: 10.1016/j.tem.2019.09.006.
- [124] D. Dutta, C. D. Williamson, N. B. Cole, y J. G. Donaldson, «Pitstop 2 Is a Potent Inhibitor of Clathrin-Independent Endocytosis», *PLoS ONE*, vol. 7, n.º 9, p. e45799, sep. 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0045799.
- [125] L. von Kleist *et al.*, «Role of the clathrin terminal domain in regulating coated pit dynamics revealed by small molecule inhibition», *Cell*, vol. 146, n.º 3, Art. n.º 3, ago. 2011, doi: 10.1016/j.cell.2011.06.025.
- [126] A. Piasek y J. Thyberg, «Effects of colchicine on endocytosis and cellular inactivation of horseradish peroxidase in cultured chondrocytes.», *Journal of Cell Biology*, vol. 81, n.º 2, pp. 426-437, may 1979, doi: 10.1083/jcb.81.2.426.
- [127] K. M. Kitchens, R. B. Kolhatkar, P. W. Swaan, y H. Ghandehari, «Endocytosis Inhibitors Prevent Poly(amidoamine) Dendrimer Internalization and Permeability across Caco-2 Cells», *Mol. Pharmaceutics*, vol. 5, n.º 2, pp. 364-369, abr. 2008, doi: 10.1021/mp700089s.

- [128] P. A. Valberg, J. D. Brain, y D. Kane, «Effects of colchicine or cytochalasin B on pulmonary macrophage endocytosis in vivo», *Journal of Applied Physiology*, vol. 50, n.º 3, pp. 621-629, mar. 1981, doi: 10.1152/jappl.1981.50.3.621.
- [129] A. Piasek y J. THYBERGf, «EFFECTS OF COLCHICINE ON ENDOCYTOSIS OF HORSERADISH PEROXIDASE BY RAT PERITONEAL MACROPHAGES», p. 14.
- [130] E. Balland *et al.*, «Hypothalamic tanycytes are an ERK-gated conduit for leptin into the brain», *Cell Metab.*, vol. 19, n.º 2, Art. n.º 2, feb. 2014, doi: 10.1016/j.cmet.2013.12.015.
- [131] C. D. Helgason y C. L. Miller, *Basic cell culture protocols*. Totowa, N.J.: Humana Press, 2005.
- [132] J. Schindelin *et al.*, «Fiji: an open-source platform for biological-image analysis», *Nat. Methods*, vol. 9, n.º 7, Art. n.º 7, jul. 2012, doi: 10.1038/nmeth.2019.
- [133] V. T. Ramirez *et al.*, «Differential functional selectivity and downstream signaling bias of ghrelin receptor antagonists and inverse agonists», *FASEB J.*, vol. 33, n.º 1, Art. n.º 1, 2019, doi: 10.1096/fj.201800655R.
- [134] I. B. Christensen, E. N. Mogensen, H. H. Damkier, y J. Praetorius, «Choroid plexus epithelial cells express the adhesion protein P-cadherin at cell-cell contacts and syntaxin-4 in the luminal membrane domain», *Am. J. Physiol., Cell Physiol.*, vol. 314, n.º 5, Art. n.º 5, 01 2018, doi: 10.1152/ajpcell.00305.2017.
- [135] J. Saraste, G. E. Palade, y M. G. Farquhar, «Temperature-sensitive steps in the transport of secretory proteins through the Golgi complex in exocrine pancreatic cells.», *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 83, n.º 17, pp. 6425-6429, sep. 1986, doi: 10.1073/pnas.83.17.6425.
- [136] B. J. Iacopetta y E. H. Morgan, «The kinetics of transferrin endocytosis and iron uptake from transferrin in rabbit reticulocytes.», *Journal of Biological Chemistry*, vol. 258, n.º 15, pp. 9108-9115, ago. 1983, doi: 10.1016/S0021-9258(17)44637-0.