



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MUSEO

Tesis presentada para optar por el título de Doctor en Ciencias Naturales

“Estudio neuroanatómico y funcional de las neuronas del hipotálamo lateral que expresan el receptor de secretagogos de la hormona de crecimiento”

Lic. Franco Barrile

Directores:

Dr. Mario Perelló & Dr. Jorge Ronderos

2023

*El presente Trabajo de Tesis se realizó en el
Instituto Multidisciplinario de Biología Celular*



INSTITUTO MULTIDISCIPLINARIO DE BIOLOGÍA CELULAR



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA



“Who cares what philosophers say about the differences between psychology and neuroscience, or reductionism in general? We are scientists, not philosophers!” The answer to this is simple: there is no escape from philosophy.

Krakauer et al. 2017- *“Neuroscience Needs Behavior. Correcting a Reductionist Bias”*

AGRADECIMIENTOS

Esta Tesis no podría existir sin la paciencia, el consejo y la intriga inagotable de Mario. Gracias por bancar cada inseguridad, cada resultado, cada duda. Gracias por asegurarte que tengamos espíritu crítico y por apostar a la ciencia todos los días. Pero sobre todo gracias por ser una buena persona, cualidad sin la cual ningún proyecto colectivo sería viable. ¡Gracias Mario!

Gracias a todo el laboratorio de Neurofisiología del IMBICE. A Mir, Flor, Guada, Nico, Dani L., Spring, Pau, Gime, Dani, Lu, Juli, Cami, Ivi y Anto. Sin ustedes esta Tesis definitivamente no existiría. Gracias por cada palabra de apoyo y por abrirme las puertas del labo desde el primer día, me hacen muy feliz. En especial quiero agradecer a Pau, Dani y Nico, tres personas que tuvieron mucho que ver tanto en mi formación como científico como en cada resultado que aquí presento. ¡Gracias!

Gracias a la Universidad Nacional de La Plata, a CONICET y a Néstor. Gracias por todas las políticas públicas que permitieron que mis papás puedan dar acceso a sus tres hijos a la educación superior. ¡Gracias!

Gracias a todes les bacaries (y varios ex-becaries je) del IMBICE. Sin elles no hay experimento ni ciencia que aguante. Gracias a todas las pibas de *Bec2-colonia radioactiva*, por lo maravillosas personas que son y por cada consejo, risa, lágrima y carbohidrato compartidos. Mis días serían mucho más grises sin ustedes ¡las quiero muchísimo!

Gracias Sil y Marix por su apoyo y alegría constante. Por cada pregunta, chiste y piropo. ¡Las quiero!

Gracias a los cumpas facultativos, que ya son una familia desperdigada por el mundo. Sin ustedes no hubiera durado ni un minuto en esta ciudad. Gracias por cada risa, cada debate, cada charla, cada cumpajuntada. Los adoro.

Gracias a los fanáticos, en especial a Marita y a Lean. Gracias por cada palabra de apoyo en este tiempo y por estar siempre más allá de mis cuelgues. ¡Los quiero!

Gracias Toti. A esta altura sabés más de ghrelina que yo. Gracias por ser siempre vos y por estar al pie de cañón en cada paso. Gracias por tu amistad sincera y por tu amor a la ciencia que contagiás en cada palabra. ¡Te quiero muchísimo! Esta Tesis es en gran parte tuya.

Gracias a toda mi familia, tanto la sede montense como la local. Sin ellos no habría un Fran científico ni de casualidad. Simplemente gracias por ser la familia tierna que son y por quererme así. Los amo muchísimo. Esta Tesis es de ustedes.

Por último, gracias Santi. Gracias por estar, por quererme y por compartir estos últimos (a veces complicados) años al lado mío. Gracias por bancarte el olor a bioterio en mis buzos, los estornudos constantes y mi silencio en el desayuno. Gracias por tu alegría contagiosa y por tu cariño inagotable, sin el cual, los días serían solo míos y no nuestros. ¡Te amo!

INDICE

AGRADECIMIENTOS	4
ABREVIATURAS	9
RESUMEN	11
ABSTRACT	12
INTRODUCCIÓN	14
1. Ghrelina, LEAP2, y su receptor GHSR	15
1.1. Ghrelina	15
1.2. LEAP2	17
1.3. El receptor de ghrelina y LEAP2: GHSR	18
2. Área hipotalámica lateral (AHL)	19
2.1. Generalidades	19
2.2. Características neuroanatómicas del AHL	20
2.3. Características funcionales del AHL.....	24
4. Principales efectos de ghrelina y LEAP2 en el hipotálamo sobre el consumo de alimentos	26
OBJETIVOS	29
MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
1. Animales experimentales	30
2. Genotipificado de los animales.....	31
3. Reactivos.....	32
4. Ligandos de GHSR utilizados	33
5. Dietas utilizadas	34
6. Cirugías estereotáxicas	34
7. Procedimientos experimentales	35
7.1. Caracterización neuroanatómica de las neuronas AHL ^{GHSR}	35
7.2. Respuesta de las neuronas AHL ^{GHSR} a ghrelina.....	38
7.3. Respuesta de las neuronas AHL ^{GHSR} a LEAP2 y caracterización funcional del péptido .	41
7.4. Estudio del rol de las neuronas AHL ^{GHSR} en la modulación de conductas alimentarias	44
8. Perfusión y extracción del encéfalo	47
9. Inmunotinciones	47
9.1. Inmunotinciones fluorescentes.....	47

9.2. Inmunotinciones cromogénicas	48
10. Montaje y procesamiento de las muestras	50
11. Obtención de imágenes.....	50
12. Análisis neuroanatómico cuantitativo.....	51
12.1. Cuantificación de células inmunorreactivas	51
12.2. Cuantificación de intensidad de fluorescencia.....	52
13. Análisis estadístico	52
RESULTADOS.....	53
1. Caracterización neuroanatómica de las neuronas AHL ^{GHSR}	53
1.1. Estudio de la distribución neuroanatómica de las células AHL ^{GHSR}	53
1.2. Estudio del agrupamiento de las neuronas AHL ^{GHSR}	56
1.3. Caracterización fenotípica de las neuronas AHL ^{GHSR}	58
2. Respuesta de las neuronas AHL ^{GHSR} a ghrelina	62
2.1. Caracterización funcional de las neuronas AHL ^{GHSR}	62
2.2. Estudio de la accesibilidad de la ghrelina fluorescente al AHL	73
2.3. Estudio de la respuesta de las neuronas del AHL a la ghrelina sistémica y central	74
2.4. Estudio de la respuesta de las neuronas AHL ^{GHSR} a la ghrelina sistémica y central.....	76
3. Respuesta de las neuronas AHL ^{GHSR} a LEAP2 y caracterización funcional del péptido.....	77
3.1. Estudio de los segmentos bioactivos de LEAP2.....	78
3.2. Estudio de la accesibilidad del LEAP2 fluorescente (F-LEAP2) al AHL y a diversas regiones del encéfalo	80
3.2 Respuesta de las neuronas del AHL al LEAP2.....	86
4. Estudio del rol de las neuronas AHL ^{GHSR} en la modulación de conductas alimentarias	87
4.1. Estudio de la respuesta de las neuronas AHL ^{GHSR} a cambios endógenos de la relación ghrelina/LEAP2 plasmática	87
4.2. Estudio de los efectos conductuales de la expresión de GHSR exclusivamente en el AHL	89
DISCUSIÓN.....	94
Consideraciones metodológicas	94
Consideraciones conceptuales	100
Caracterización neuroanatómica de las neuronas AHL ^{GHSR} y respuesta de las mismas a ghrelina.....	100
Respuesta de las neuronas AHL ^{GHSR} a LEAP2 y caracterización funcional del péptido.....	104
Estudio del rol de las neuronas AHL ^{GHSR} en la modulación de conductas alimentarias	106
CONCLUSIONES.....	110

BIBLIOGRAFÍA111

ABREVIATURAS

AAV: vector viral adenoasociado

AgRP: péptido relacionado a Agouti

AHL: área hipotalámica lateral

AHL^{eGFP}: células que expresan eGFP en el AHL

AHL^{GHSR}: células que expresan GHSR en el AHL

ARC: núcleo arcuato

ARC^{NPY}: neuronas del núcleo arcuato que expresan el neuropéptido Y

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

AVT: área ventral tegmental

CART: transcripto regulado por anfetamina y cocaína

DACG: dieta con alto contenido graso

DAT: transportador activo de dopamina

DBSCAN: agrupamiento espacial de aplicaciones con ruido basado en densidad

DMH: hipotálamo dorsomedial

eGFP: proteína verde fluorescente de *Aequorea victoria*

F-ghrelina: versión fluorescente de la ghrelina

F-LEAP2: versión fluorescente del péptido antimicrobiano 2 liberado por el hígado

fx: fórnix

Gad2: glutamato descarboxilasa 2

GHSR: receptor de secretagogos de la hormona de crecimiento

hrGFP: proteína verde fluorescente humanizada de *Renilla reniformis*

ICV: intra-cerebro-ventricular

IP: intraperitoneal

ISHH: histoquímica de hibridación *in situ*

LCR: líquido cefalorraquídeo

LCRa: líquido cefalorraquídeo artificial

LEAP2: péptido antimicrobiano 2 liberado por el hígado

MCH: hormona concentradora de melanocitos

NAcb: núcleo *accumbens*

nNOS: óxido nítrico sintasa neuronal

NPY: neuropéptido Y

PBS: buffer fosfato-salina

SC: subcutáneo

TBC: cassette de bloqueo de la transcripción

TH: tirosina hidroxilasa

TRH: hormona liberadora de tirotrópina

u.a.: unidades arbitrarias

VMH: hipotálamo ventromedial

WT: *wild type*

RESUMEN

El control del consumo de alimentos involucra a múltiples regiones del encéfalo. Estas regiones son sensibles a la actividad de receptores que modulen su actividad y que consecuentemente evoquen cambios en la conducta alimenticia. Dentro de los receptores más importantes en dicha modulación se encuentra el receptor de secretagogos de la hormona de crecimiento (GHSR del inglés para *growth hormone secretagogue receptor*). GHSR se expresa en diversas regiones del encéfalo incluyendo el área hipotalámica lateral (AHL), una región clave en la modulación del balance energético y la motivación para obtener alimentos. GHSR posee dos ligandos endógenos conocidos: ghrelina y LEAP2 (del inglés para *liver-expressed antimicrobial peptide 2*). Ambas hormonas gastrointestinales poseen funciones antagónicas dado que la ghrelina aumenta el consumo de alimentos mientras que el LEAP2 lo disminuye. Dada la relevancia que tienen tanto GHSR como el AHL en la modulación del balance energético, en este Trabajo de Tesis decidimos estudiar aspectos neuroanatómicos y funcionales de las neuronas que expresan GHSR en el AHL (AHL^{GHSR}), así como la respuesta a sus ligandos endógenos ghrelina y LEAP2. En un principio hicimos uso de un modelo murino que nos permitió visualizar las neuronas AHL^{GHSR} y determinamos que estas neuronas se distribuyen a lo largo de todo el eje anteroposterior del AHL sin presentar agrupamientos diferenciales. A su vez, observamos que una subpoblación de las AHL^{GHSR} expresa el neuropéptido neurotensina y otra subpoblación expresa el marcador nNOS. Posteriormente observamos que la acción directa de la ghrelina sobre las neuronas AHL^{GHSR} de ratones induce el consumo de alimento a través de la activación de las neuronas de orexina del AHL (AHL^{orexina}) y de las neuronas AgRP/NPY del núcleo arcuato (ARC^{NPY}), siendo ambas poblaciones neuronales claves en la modulación del apetito. No obstante, observamos que la ghrelina no accede al AHL, aunque su administración directa en el líquido cefalorraquídeo induce la activación de poblaciones neuronales dentro del AHL, indicando así que esta hormona podría actuar de manera indirecta sobre esta región a través de otros núcleos sensibles a la hormona. Luego, observamos que el otro ligando endógeno de GHSR, LEAP2, tampoco accede al AHL y no induce su activación al ser administrado en el líquido cefalorraquídeo de ratones. Finalmente, evaluamos el rol funcional de las neuronas AHL^{GHSR} sin la administración exógena de ninguno de sus ligandos y observamos que modulan positivamente el consumo de alimentos apetecibles. Así, nuestros resultados nos permiten proponer que las neuronas AHL^{GHSR} regulan el consumo de alimentos en ratones, aunque no censen sus ligandos endógenos. Esta regulación podría suceder a través del circuito neuronal AHL^{GHSR}→AHL^{orex}→ARC^{NPY}. Por último, es importante destacar que todos los resultados de este trabajo de Tesis fueron obtenidos usando

ratones como modelo experimental. En nuestro conocimiento, los estudios previos de las neuronas AHL^{GHSR} se realizaron en ratas siendo este trabajo de Tesis el primero en usar ratones para estudiar estas células. A su vez, el uso de ratones genéticamente modificados fue de gran relevancia en este trabajo y permitió investigar con mayor detalle el sistema ghrelina/LEAP2/GHSR en el AHL.

ABSTRACT

The modulation of food intake involves many brain regions. These regions are sensitive to membrane receptors that modify their activity and induces changes in the organism's behaviour. Growth hormone secretagogue receptor (GHSR) is a receptor that expresses in key brain regions that modulate food intake including the lateral hypothalamic area (LHA) a brain region involved in energy balance and motivated behaviour. GHSR has two endogenous ligands: ghrelin and liver expressed and antimicrobial peptide 2 (LEAP2). Both are gastrointestinal hormones that have opposite functions: ghrelin induces while LEAP2 decreases food intake. As both GHSR and LHA have key roles in energy balance, in this Thesis we studied neuroanatomical and functional aspects of GHSR-expressing LHA neurons (LHA^{GHSR} neurons) and their response to ghrelin and LEAP2. We used transgenic mice models to study LHA^{GHSR} neurons and found that they are homogeneously distributed throughout the entire nucleus. Also, we found that some LHA^{GHSR} neurons express neurotensin and another LHA^{GHSR} neurons express nNOS. After that, we found that ghrelin injection into the mice LHA induces food intake through orexin neurons in the LHA (LHA^{orexin} neurons) and agouti related protein/neuropeptide Y (AgRP/NPY) neurons in the arcuate nucleus (ARC^{NPY} neurons), both key neuronal populations in the energy balance. Of note, we found that ghrelin cannot access the LHA but enhance LHA neuronal activation. This indicate that ghrelin could act on the LHA indirectly through other nuclei that sense the hormone. In the same way, we found that LEAP2 cannot access the LHA and that does not enhance its activation when injected ICV. Afterwards, we studied the LHA^{GHSR} neurons in mice without any ligand injection and found that these neurons modulate high fat diet intake. Therefore, our results indicate that LHA^{GHSR} neurons modulate food intake in mice, although they do not sense plasma ghrelin or LEAP2. This modulation could be through $LHA^{GHSR} \rightarrow LHA^{orexin} \rightarrow ARC^{NPY}$ neuronal pathway. Finally, all the results in this Thesis were obtained using mice as an experimental model. In our knowledge, previous studies of LHA^{GHSR} neurons

were made using rats. Therefore, this Thesis may be the first one using mice models to study these neurons. Also, the use of genetic modified mice models was extremely relevant for this Thesis and allowed to investigate in deeper detail the ghrelin/LEAP2/GHSR system in the LHA.

INTRODUCCIÓN

Los mecanismos neurobiológicos que modulan el consumo de alimentos en los animales son muy variados e incluyen diversas regiones del encéfalo. Estas zonas del encéfalo están fuertemente reguladas por señales periféricas, como hormonas, que ajustan la actividad de las neuronas que las componen. Esta combinación de diferentes poblaciones neuronales, hormonas y sus receptores produce múltiples respuestas biológicas que van desde la activación de una vía neuronal hasta la ejecución de una conducta. Entender cómo se relacionan estos actores entre sí y en qué grado determinan la conducta alimenticia es de gran importancia en el contexto actual, en donde los trastornos vinculados a la alimentación constituyen un problema de salud creciente tanto en el contexto local como en el mundial.

Entre las señales periféricas que modulan la actividad de neuronas en el encéfalo se destacan la ghrelina y el LEAP2. Ambas son hormonas secretadas por distintas regiones del tracto gastrointestinal y actúan sobre el sistema nervioso modulando el balance energético de manera antagónica. La ghrelina estimula la secreción de hormona de crecimiento y es la principal hormona conocida que induce el consumo de alimento. Por el contrario, LEAP2 actúa reduciendo tanto la secreción de GH como el consumo de alimento. Curiosamente, ambas hormonas ejercen sus efectos antagónicos a través de un mismo receptor: GHSR. Este es un receptor acoplado a proteína G que se expresa principalmente en el encéfalo y que posee una gran actividad independiente de ligandos, ampliando aún más el repertorio de efectos fisiológicos posibles de este sistema ligandos/receptor.

La modulación del consumo de alimentos a través de la acción de la ghrelina en ciertas regiones del encéfalo ha sido ampliamente caracterizada en el pasado. El núcleo arcuato (ARC) del hipotálamo y el área ventral tegmental (AVT) del mesencéfalo son dos regiones claves en la modulación del consumo de alimentos. Por un lado, el ARC regula aspectos homeostáticos del apetito, es decir aquellos comportamientos vinculados a satisfacer la necesidad calórica, mientras el AVT regula aspectos hedónicos del apetito, es decir aquellos comportamientos vinculados con las propiedades recompensantes de los alimentos. Tanto en el ARC como en el AVT hay expresión de GHSR y la unión de ghrelina en estos núcleos produce, entre otras cosas, el aumento del consumo de alimentos.

Otro actor clave en la modulación del consumo de alimentos y el balance energético es el área hipotalámica lateral (AHL). Esta región perteneciente al hipotálamo mantiene aferencias y eferencias con una gran parte del encéfalo, incluyendo al ARC y el AVT. Estas conexiones con

ambos núcleos sitúan al AHL como una región que modula tanto aspectos homeostáticos como hedónicos del apetito. El AHL juega un papel sumamente relevante no solo en la modulación del consumo de alimentos, sino también en la regulación de las conductas motivacionales y de la homeostasis energética en general. El AHL produce, libera y censa una gran cantidad de neuropéptidos y neurotransmisores. Esta característica lo hace especialmente atractivo al momento de estudiar el balance energético ya que lo es un centro integrador de la información metabólica, desde el cual luego se coordinarán respuestas conductuales complejas. La relación entre GHSR y el hipotálamo ha sido extensamente estudiada, aunque se conoce sorprendentemente poco acerca del rol que posee este receptor y sus ligandos en la fisiología del AHL. Es así que en este trabajo de Tesis es de especial interés estudiar los aspectos neuroanatómicos y fisiológicos que tiene la expresión de GHSR en el AHL.

1. Ghrelina, LEAP2, y su receptor GHSR

1.1. Ghrelina

La ghrelina es una hormona peptídica producida por el fundus del estómago que regula diversas funciones y actúa principalmente en el sistema nervioso central. La ghrelina está compuesta por 28 aminoácidos, esterificada en su tercer residuo con un ácido octanoico [1, 2]. Además, los primeros 9 aminoácidos N-terminales incluyendo el ácido octanoico son claves para la correcta unión de la hormona a su receptor y están altamente conservados en la mayoría de los vertebrados [3, 4].

La ghrelina se sintetiza principalmente en un grupo de células endócrinas ubicadas dentro de glándulas oxínticas en el fundus del estómago. En los roedores estas células se denominan de tipo X/A. La ghrelina también se produce en menor medida en otros órganos como el duodeno, el yeyuno íleon, el colon, el páncreas y el riñón [2, 6, 7]. Primero se sintetiza como un péptido de 117 aminoácidos, la proghrelina, la cual se cliva formando un péptido de 94 aminoácidos llamado proghrelina. Luego, la proghrelina se esterifica en la Ser3 con un grupo *n*-octanoilo a través de la acción de una transferasa presente en el retículo endoplásmico llamada ghrelina-*O*-aciltransferasa (GOAT por sus siglas en inglés) del grupo de las transferasas de unión a membrana (MBOAT por sus siglas en inglés) [8–10]. Esta enzima usa, en parte, ácidos grasos provenientes de la dieta para realizar la esterificación [11]. Una vez octanoilada, la proghrelina de 94 aminoácidos es clivada nuevamente en el complejo de Golgi por la prohormona convertasa 1/3 (PC 1/3) hasta obtener un péptido de 28 aminoácidos en su extremo N-terminal,

la ghrelina, y obestatina en su extremo C-terminal [12, 13]. La esterificación de la ghrelina con un ácido octanoico es esencial para su unión al receptor, lo que permite la correcta bioactividad de la hormona.

La ghrelina también presenta en plasma una forma no octanoilada llamada desacil-ghrelina [14] la cual se encuentra en mayor proporción que la ghrelina acilada [15]. La desacil-ghrelina no se une al receptor de ghrelina aunque si accede al núcleo arcuato del hipotálamo [16] y es aún controversial si posee efectos biológicos, por lo que se precisan estudios específicos para conocer su relevancia fisiológica.

Los niveles plasmáticos de ghrelina dependen mayormente del status energético del organismo. Estos niveles aumentan en situaciones de balance energético negativo, como el ayuno o la restricción calórica, y bajan luego de la realimentación tanto en roedores como en humanos [17–19].

Los niveles plasmáticos de ghrelina aumentan previo al consumo de alimentos y bajan luego de la ingesta tanto en roedores como en humanos, indicando un posible rol de la hormona en iniciar comportamientos alimentarios [20–22]. Los niveles plasmáticos de ghrelina se reducen luego del consumo de hidratos de carbono, proteínas o lípidos, aunque en menor medida ante estos últimos [23]. Esta inhibición se da probablemente por señales gastrointestinales que son reclutadas por los macronutrientes que llegan al estómago [23]. También la inervación colinérgica y la β -adrenérgica sobre las células productoras de ghrelina, estimulan su liberación tanto en humanos como en roedores [24, 25]

Existe una correlación negativa entre los niveles plasmáticos de ghrelina y el grado de adiposidad en humanos, por lo que la ghrelina en plasma disminuye en personas con obesidad y en roedores con obesidad inducida por la dieta [26–29] mientras que es alta en pacientes con caquexia, anorexia nerviosa y bulimia nerviosa [30–34].

Es interesante destacar que la ghrelina no se produce en el encéfalo, de manera que la hormona llega al sistema nervioso central únicamente a través de la circulación periférica [35]. Sin embargo, una vez que la ghrelina ingresa al encéfalo su accesibilidad a los núcleos cerebrales es restringida [36]. Entre las regiones a las cuales ghrelina accede se encuentran aquellas con capilares fenestrados, como el ARC, el área postrema (AP), la eminencia media (EM) y los plexos coroideos; y regiones como el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN), el AVT, el núcleo del tracto solitario y el hipocampo [36].

1.2. LEAP2

Recientemente se identificó un segundo ligando endógeno de GHSR, el LEAP2 (por sus siglas en inglés para *Liver-expressed Antimicrobial Peptide 2*), un péptido gastrointestinal al cual anteriormente se le asignó una función antimicrobiana. LEAP2 se identificó por primera vez en el 2003 en plasma humano y debido a su alto grado de conservación y homología molecular con otros péptidos se postula que posee funciones antimicrobianas, aunque cuando es probado en concentraciones plasmáticas normales presenta bajas propiedades antibacterianas y antifúngicas [37]. LEAP2 es primero sintetizado como un pro-péptido de 77 residuos y luego modificado a un péptido de 40 residuos con dos puentes disulfuro [37]. En su forma madura es producida por varios tejidos del sistema gastrointestinal, principalmente el hígado y el yeyuno, y en menor medida el duodeno, el íleon, los riñones y el estómago [38–40].

En el año 2018 Ge y colaboradores estudiaron los efectos metabólicos que una gastrectomía vertical tenía en roedores. En el estómago de estos animales, se identificaron altos niveles de ARNm de LEAP2, y bajos niveles en el duodeno. Al evaluar el posible efecto de unión de LEAP2 sobre una gran cantidad de receptores acoplados a proteína G (GPCR de sus siglas en inglés para *G-protein coupled receptors*), identificaron que LEAP2 inhibía a GHSR en células en cultivo. En el mismo sentido, LEAP2 inhibe el consumo de alimento y la liberación de GH evocados por ghrelina, en sistemas in-vivo [38]. Incluso, durante una restricción calórica al 40%, la administración crónica de LEAP2 inhibe el eje ghrelina-GH en roedores e imposibilita la supervivencia a largo plazo, lo que indica un rol clave de LEAP2 en la modulación de GHSR sobre el metabolismo de glucosa [38]. La concentración de LEAP2 en plasma varía según el estado metabólico del organismo, de forma inversa a las concentraciones de ghrelina. Durante un balance metabólico negativo, como ayuno o restricción calórica, los niveles plasmáticos de LEAP2 disminuyen, mientras que aumentan en un balance metabólico positivo, junto con la masa corporal y los niveles plasmáticos de glucosa [38, 41–43].

Al momento del desarrollo de este trabajo de Tesis, se desconoce si los efectos anorexigénicos de LEAP2 son específicos de su unión a GHSR. Inyecciones intra-cerebro-ventriculares (ICV) de LEAP2 en roedores inhiben los efectos de ghrelina sobre el consumo de alimentos, la inducción de c-Fos en el hipotálamo y el aumento en los niveles plasmáticos de glucosa; mientras que no afectan el consumo de alimento mediado por NPY o la reducción de la temperatura corporal mediada por desacil-ghrelina [42]. También LEAP2 administrado ICV inhibe efectos hedónicos de GHSR sobre el apetito, como el consumo de dieta alta en grasa en un protocolo de atracón [44].

Hasta el momento la evidencia indica que LEAP2 actuaría tanto como antagonista como

agonista inverso de GHSR. LEAP2 se une a GHSR a través de su extremo N-terminal de manera competitiva inhibiendo la actividad constitutiva del receptor [45, 46].

1.3. El receptor de ghrelina y LEAP2: GHSR

La ghrelina y LEAP2 tienen como único receptor conocido a GHSR, el cual se expresa principalmente en la hipófisis y en núcleos del hipotálamo [47]. GHSR es un receptor acoplado a proteína G (GPCR, de sus siglas en inglés *para G-protein coupled receptor*) de 7 dominios transmembrana, con el extremo N-terminal ubicado del lado externo de la membrana y el extremo C-terminal del lado interno [47, 48]. La proteína humana del GHSR contiene 366 aminoácidos y está muy conservada evolutivamente [4, 49]. El gen para GHSR codifica dos transcritos GHSR-1a y GHSR-1b por empalme alternativo, siendo GHSR1a el único que tiene capacidad de unir y responder a ghrelina [50].

GHSR modula diversas funciones como la secreción de la hormona de crecimiento y la regulación del consumo de alimentos, la homeostasis de la glucosa y la adiposidad. Las vías de señalización intracelular por la cual GHSR media estas funciones son diversas e incluyen la activación de G_q , $G_{i/o}$ y $G_{12/13}$, siendo G_q el mecanismo canónico [50–52]. GHSR también puede reclutar la vía de las β -arrestinas las cuales desensibilizan al receptor en la membrana por medio de su internalización celular [51].

Algunos GPCR poseen actividad que es independiente de la unión de sus ligandos. Un tipo de actividad independiente de ligando es la actividad constitutiva en la cual el receptor señala y estabiliza su conformación en ausencia de su ligando. Esto ocurre en GHSR, el cual posee una actividad constitutiva muy alta, alrededor del 50% de la actividad máxima cuando es estudiada *in-vitro* [48, 51, 53]. Si bien se conoce poco acerca de la relevancia fisiológica de la actividad constitutiva de GHSR, Pantel y colaboradores en el 2006 reportaron una mutación puntual en el gen de GHSR, que reduce esta actividad y que se vincula con un fenotipo de baja estatura en humanos [54]. En roedores esta misma mutación produce un menor tamaño corporal y reducción en la liberación de hormona de crecimiento [55].

Otra manera en la cual GHSR modifica su actividad de manera independiente de sus ligandos, es a través de la modulación alostérica de otros GPCR con los que heterodimeriza. Trabajos previos estudiaron modulaciones alostéricas de GHSR con el receptor 1 y el receptor 2 de dopamina (D1R y D2R respectivamente) [56–59], el receptor de serotonina 2C [60] y con el receptor 1 de

orexina [61]. Incluso, la acción de ligandos sobre GHSR puede afectar estas modulaciones alostéricas. En este sentido, se ha reportado en sistemas *in vitro* que LEAP2 disminuye la inhibición alostérica de GHSR al D2R [62].

Es importante resaltar que la actividad independiente de ligandos de GHSR parece ser relevante para entender la función de este receptor en regiones del encéfalo donde ghrelina no accede [63].

GHSR se expresa en diversas regiones del cuerpo, tanto a nivel central como periférico. Sin embargo los mayores niveles de expresión del receptor se encuentran en el encéfalo, en particular en el hipotálamo y el tallo cerebral [64, 65]. En el tallo cerebral GHSR se encuentra en el AVT, el área postrema (AP) y el núcleo del tracto solitario (NTS), mientras que en el hipotálamo se ubica en varios núcleos incluyendo el ARC, el núcleo ventromedial, el paraventricular y el AHL. Es interesante destacar que GHSR se encuentra en varios núcleos del encéfalo en donde la ghrelina plasmática no accede [36] lo que lleva a la luz la pregunta de ¿cuál puede ser el rol fisiológico de la presencia del receptor en dicha región? Una posible respuesta a esto es que, debido a que GHSR posee una gran actividad independiente de ligandos, la llegada o no de ghrelina o LEAP2 no determina necesariamente la relevancia fisiológica de GHSR en esos núcleos [63, 66].

2. Área hipotalámica lateral (AHL)

2.1. Generalidades

El AHL es una región del hipotálamo muy heterogénea en su composición neuronal así como en sus aferencias y eferencias hacia otras áreas del encéfalo [67–69]. Ubicada en el margen más externo del hipotálamo, el AHL es una región simétrica situada a ambos lados del tercer ventrículo, con límites neuroanatómicos poco definidos [70]. Surge rostralmente luego del área preóptica y termina caudalmente antes del área ventral tegmental (AVT), ocupando el 45% del volumen total del hipotálamo [67, 70, 71].

Entre las funciones más estudiadas del AHL se pueden mencionar el mantenimiento de la homeostasis energética, la regulación del balance hídrico, la recepción de señales interoceptivas, la regulación del sueño y el estado de alerta, de la respiración, de la presión sanguínea, la participación en comportamientos vinculados al sistema de recompensas, la actividad locomotora, entre otros [70, 72–78]. Estas funciones están reguladas en parte por una

amplia variedad de señales endócrinas, parácrinas, metabólicas y neuronales que interactúan con las poblaciones de neuronas del AHL [70, 74, 79]. El rol del AHL en el control del apetito y de comportamientos vinculados a la búsqueda y obtención de alimento y otras recompensas ha sido particularmente estudiado [78] y es de especial interés en este trabajo de tesis. La estimulación eléctrica del AHL induce fuertemente la búsqueda y el consumo de alimentos, mientras que su lesión induce afagia [72, 80, 81]. Este rol del AHL en la modulación del apetito llevó a que funcionalmente se la pueda considerar un área que articula las vías homeostáticas y hedónicas del consumo de alimentos debido a sus conexiones con núcleos del hipotálamo y con núcleos de la vía mesolímbica [82].

2.2. Características neuroanatómicas del AHL

Desde la publicación de trabajos pioneros a fines de la década de 1950 hasta la actualidad, se ha hecho un gran esfuerzo para caracterizar neuroquímica y fisiológicamente al AHL. A diferencia de otros núcleos del hipotálamo, el AHL se caracteriza por poseer una distribución de neuronas difusa, sin formar necesariamente un núcleo compacto [83]. También, el AHL envía y recibe proyecciones de numerosas regiones del encéfalo, lo que es un indicio de su complejidad funcional [83] (**Figura 1**).

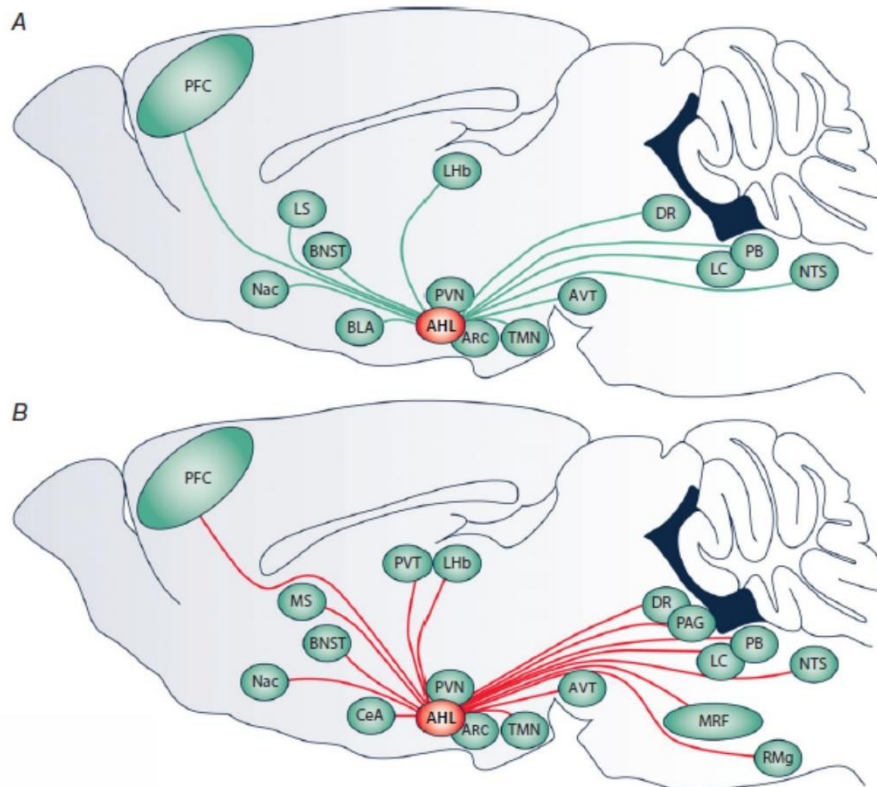


Figura 1. El AHL posee conexiones con diversas regiones del encéfalo. El esquema muestra dos cortes medio-sagitales del cerebro de ratón indicando las eferencias y aferencias del AHL con otros núcleos del encéfalo. En el **Panel A** se muestran las aferencias hacia el AHL mientras que en el **Panel B** se indican las eferencias del AHL hacia distintas regiones encefálicas. ARC: arcuato, TMN: núcleo tuberomamilar, PVN: núcleo paraventricular del hipotálamo, CeA: amígdala central, BNST: núcleo del lecho de la estría terminal, Nac: núcleo accumbens, MS: septum medial, PFC: corteza prefrontal, PVT: núcleo paraventricular del tálamo, Lhb: habénula lateral, AVT: área ventral tegmental, DR: rafe dorsal, PAG: materia gris periacueductal, LC: *locus coeruleus*, PB: núcleo parabraquial, MRF: formación reticular mesencefálica, NTS: núcleo del tracto solitario, RMg: núcleo del rafe magno. Modificado de *Bonnavion et al. 2016*.

Por otro lado, dos grandes haces de fibras atraviesan el AHL: el fórnix y el haz prosencefálico medial (MFB por las siglas en inglés para *medial forebrain bundle*) [68]. El fórnix es un sistema de fibras que conecta el complejo hipocámpal con los cuerpos mamilares del hipotálamo y forma parte del sistema límbico. Interviene en procesos vinculados con la formación y declaración de memorias nuevas, y es parte del circuito límbico descrito por Papez a principios del siglo XX, el cual involucra el hipocampo, el hipotálamo, el tálamo y la corteza cerebral entre otras zonas del cerebro [84–86]. También, el fórnix es usado como referencia anatómica ya que marca límite interno del AHL con el hipotálamo ventromedial y el hipotálamo dorsomedial [67]. Por otro lado, el MFB es un sistema de múltiples fibras tanto ascendentes como descendentes, provenientes de distintas regiones del encéfalo, que conectan estructuras desde los bulbos olfatorios hasta el mesencéfalo [87]. En el MFB fueron identificadas alrededor de 50 tipos de fibras, entre las que

se encuentran, por ejemplo, las provenientes de neuronas dopaminérgicas de la vía mesolímbica [87, 88]. Las fibras del MFB no solo pasan por el AHL sino que algunas realizan sinapsis colaterales con este núcleo, lo que aumenta su complejidad [88, 89]. La estimulación del MFB en roedores induce diversos comportamientos como los vinculados al sistema de recompensas, el condicionamiento operante y la estimulación eléctrica intra-craneal [90, 91]. Debido a lo disperso de las fibras del MFB, esta estructura no suele ser una buena referencia neuroanatómica a usar para delimitar el AHL.

Las clasificaciones de los tipos neuronales en el hipotálamo y en otras áreas del cerebro se basan principalmente en los neurotransmisores y neuropéptidos que mayoritariamente expresan. En el AHL se encuentran dos grandes grupos de neuronas en cuanto a los neuropéptidos que liberan: las productoras de orexina/hipocretina (en adelante AHL^{orex}) y las productoras de hormona concentradora de melanina (MCH por sus siglas en inglés para *melanin concentrating hormone*, AHL^{MCH} en adelante) [92]. En cuanto a los neurotransmisores se pueden encontrar neuronas que liberan GABA y neuronas que liberan glutamato (AHL^{GABA} y AHL^{Glut} en adelante) [93–95], aunque recientemente se identificó que estos grupos representa 15 poblaciones diferentes de neuronas dentro del AHL [69, 94]. En las últimas décadas, numerosos estudios sugieren que la complejidad neuroquímica del AHL es mayor que la comentada. Además de las AHL^{orex} y las AHL^{MCH}, en el AHL se encuentran neuronas que expresan neuropéptidos y otros marcadores moleculares tales como neurotensina, galanina, dinorfina, hormona liberadora de tirotrófina (TRH por sus siglas en inglés para *tirotrophin releasing hormone*), factor liberador de corticotrofina (CRF por sus siglas en inglés para *corticotrophin releasing factor*), óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS para sus siglas en inglés para *neuronal nitric oxide synthase*), transcrito regulado por amfetamina y cocaína (CART por sus siglas en inglés para *cocaine and amphetamine regulated transcript*), receptor de leptina, además de neuronas estudiadas en menor medida como las que expresan encefalina, nesfatina y urocortina-3 [94, 96–100] (**Tabla 1**). Incluso, varias poblaciones neuronales del AHL expresan más de un marcador o neuropéptido, lo que complejiza la sistematización y el estudio de las poblaciones presentes en el núcleo (**Figura 2**).

Poblaciones neuronales del AHL	Características neuroquímicas	Características funcionales dadas por la activación de la población neuronal
Orexina (Orex)	-Expresan vGlut2 [101–103] -Una subpoblación expresa dinorfina [83, 103, 104]	↑ el consumo de alimento [76, 105, 106] ↑ las propiedades recompensantes del alimento [76, 105–107] ↑ el estado de alerta y la vigilia [105, 107]
MCH	-Expresan GAD65 y GAD67 [97, 108, 109] y el 50% expresa CART [97] -Una subpoblación expresa vGlut [69, 110]	↑ el consumo de alimento y de líquidos [111–113] ↓ el estado de alerta y la vigilia [111–113]
Neurotensina (Nts)	-Una subpoblación expresa la forma larga del receptor de leptina (LepRb) [114] -Una subpoblación colocaliza con las AHL ^{Gal} [100] -Expresan vGat y GAD67 [114]	↑ el estado de alerta, la vigilia y la locomoción [96, 111] ↑ el esfuerzo para la obtención de recompensas [115] ↓ el consumo de alimento [116–118] ↑ el consumo de líquidos [119, 120] Inhibe localmente a las AHL ^{orex} [98]
Galanina (Gal)	-Expresan vGat [100] -Una subpoblación colocaliza con las AHL ^{Nts} y con AHL ^{CART} [100]	↑ el consumo de alimentos [121] ↑ la locomoción y la búsqueda de alimentos apetecibles [121]
CART	-Expresan GAD67 y MCH [69, 83]	↓ el consumo de alimento [122, 123]
TRH	-Expresan encefalina y urocortina 3 [99, 124] -Una subpoblación expresa vGlut [94, 99]	↑ el estado de alerta y la salida de la hibernación [125]
Parvalbúmina (PV)	-Liberan glutamato [126–128]	↓ la nocicepción a estímulos térmicos [129]
nNOS	-Constituyen una población distinta a las AHL ^{orex} [130]	Su estimulación ↓ la actividad de las AHL ^{orex} [130]
GABA	-Expresan vGat, GAD65 y GAD67 [93, 131–133] -Son una población independiente a las AHL ^{orex} y las AHL ^{MCH} [93, 131]	↑ conductas apetitivas y consumatorias hacia alimentos apetecibles [93, 133, 134] ↑ interacción social [134]
Glutamato (Glut)	-Expresan vGlut -Algunas poblaciones colocalizan con AHL ^{orex} y con AHL ^{MCH}	↓ interacción social [135] La activación de las AHL ^{Glut} que proyectan a la LHb ↓ el consumo de alimentos [136]

Tabla 1. Características neuroquímicas y funcionales de las distintas poblaciones de neurotransmisores y neuropéptidos que conforman el AHL.

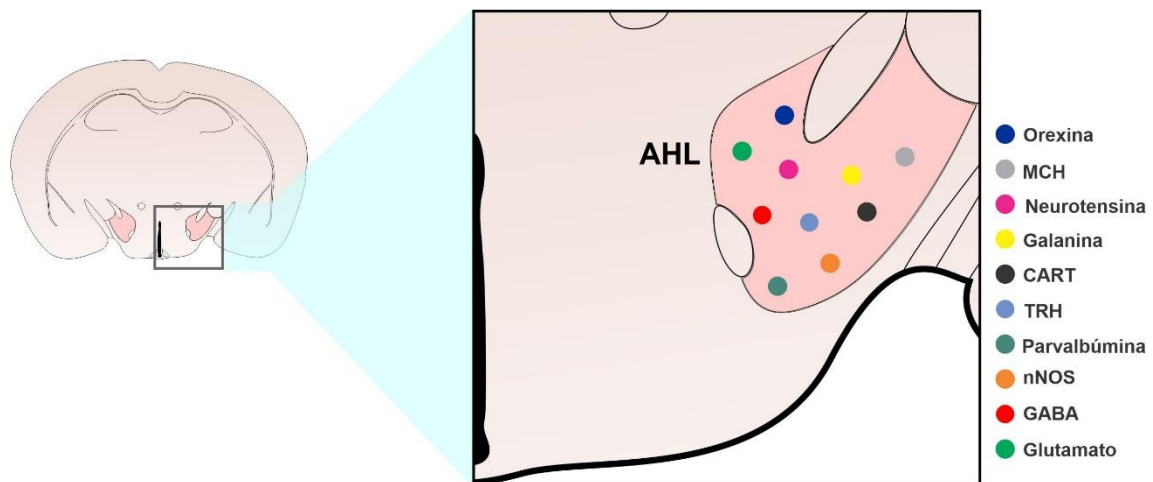


Figura 2. El esquema muestra una imagen representativa de un corte coronal de encéfalo de ratón en donde se muestra en mayor detalle el AHL. Se indican con esferas de distintos colores las poblaciones neuronales según los neurotransmisores y/o neuropéptidos que expresan.

2.3. Características funcionales del AHL

Entre las funciones más estudiadas del AHL se encuentran la regulación del consumo de alimentos y líquidos, del estado sueño/vigilia y de comportamientos motivacionales [70, 83]. Lesiones en el AHL producen el llamado “síndrome del hipotálamo lateral” el cual se caracteriza por la disminución del apetito, falta de sed, pérdida de peso corporal y anhedonia. Por otro lado, la estimulación eléctrica del AHL induce el voraz consumo de alimentos y el consecuente aumento de peso, además de aumentar la motivación para la obtención de recompensas.

2.3.1. El AHL en la regulación del consumo de alimentos

La modulación del consumo de alimentos por el AHL representa un conjunto de conductas ampliamente estudiadas desde hace más de medio siglo. Trabajos pioneros de las décadas de 1950 y 1960 reportaron que lesiones del AHL en roedores induce la hipofagia [72, 137], mientras que tanto la estimulación eléctrica como química del AHL induce la hiperfagia [81, 138]. Estos estudios posicionaron al AHL como el “centro del consumo de alimentos”. Experimentos realizados en las últimas décadas permitieron atribuir la regulación del consumo de alimentos por el AHL a diversas poblaciones neuronales. Respecto a las neuronas AHL^{GABA} que proyectan al AVT, su estimulación tanto optogenética como farmacogenética induce el consumo de

alimentos, mientras que su inhibición por neuronas provenientes del núcleo accumbens (NAcb) lo reduce [93, 139]. Por otro lado, la estimulación optogenética de una subpoblación de neuronas AHL^{GLUT} disminuye el consumo de alimentos, mientras que su inhibición lo promueve [135, 136]. Además de las AHL^{GABA}, la activación de poblaciones neuronales como las AHL^{orex} y las AHL^{MCH} también inducen el consumo de alimento. La activación de las neuronas AHL^{MCH} induce fuertemente la alimentación en roedores, en parte debido a su inervación a ciertas regiones del NAcb [140]. La estimulación de las neuronas AHL^{orex} que proyectan a las AVT^{DA} activa estas últimas e induce comportamientos vinculados a la búsqueda y consumo de alimentos, al igual que el consumo de otros estímulos con alto valor hedónico incluyendo drogas de abuso [141, 142]. En particular, las neuronas AVT^{DA} que resultan activadas son aquellas que inervan y liberan dopamina al NAcb y a la corteza prefrontal (CPF) [143, 144]. A su vez, las neuronas AHL^{orex} son reguladas “internamente” por otros grupos de neuronas en el AHL (como las neuronas AHL^{GLUT}, AHL^{NTS}, otras AHL^{GABA} e incluso mismas AHL^{orex}) como fuera de él [145].

Si bien gran parte de esta evidencia indica que la activación de las neuronas AHL^{orex} aumenta el consumo de alimentos, existen ciertas dudas acerca de si dichas conductas emergen por el solo hecho de que el animal se encuentre en un estado de vigilia, ya que las AHL^{orex} inducen dicho estado [146, 147]. La activación de las AHL^{orex} estimula la locomoción, las conductas exploratorias y el estado de “alerta” en general, y su deleción bloquea la conducta exploratoria en anticipación al alimento en roedores despiertos. Esto parecería indicar que, si bien las AHL^{orex} estimulan el estado de vigilia, también participan en integrar la información metabólica para desarrollar conductas acordes. Esta integración metabólica tiene lugar a través de las conexiones con otros centros integradores, como el ARC, y a través del censado de metabolitos como la glucosa [148, 149].

Por otro lado, ciertas poblaciones del AHL liberan péptidos involucrados en la inhibición del consumo de alimentos (como neurotensina y CART) o expresan receptores de hormonas anorexigénicas como el receptor de leptina LepRb. Estas poblaciones promueven la saciedad inhibiendo neuronas orexigénicas locales como también mediante inervaciones hacia centros reguladores del apetito como el AVT [111, 150].

En conclusión, existen distintas poblaciones neuronales del AHL que modulan la búsqueda y el consumo de alimentos. Estos comportamientos son llevados a cabo por diversos neuropéptidos y neurotransmisores, cuya liberación está finamente regulada tanto por circuitos intra-AHL como por inervaciones de otros núcleos.

4. Principales efectos de ghrelina y LEAP2 en el hipotálamo sobre el consumo de alimentos

El hipotálamo es una de las principales regiones sobre las que actúa la ghrelina. Dentro del hipotálamo, el ARC se destaca por ser el núcleo con mayores niveles de GHSR [151, 152]. Este núcleo se encuentra adyacente a la eminencia media, un órgano circunventricular con capilares fenestrados que posibilita el pasaje de ciertas moléculas pequeñas al encéfalo. Esto permite que el ARC cense el estado metabólico del organismo y actúe como un orquestador del balance energético. El ARC posee dos grandes poblaciones neuronales: las neuronas productoras del péptido relacionado a Agouti y que a su vez producen el neuropéptido Y (ARC^{NPY} de aquí en más) y las neuronas productoras de la hormona estimulante de melanocitos α (α -MSH) derivado de la proopiomelanocortina (POMC) (ARC^{POMC}). La activación de las neuronas ARC^{NPY} poseen un fuerte efecto orexigénico mientras que las ARC^{POMC} son principalmente anorexigénicas. Las neuronas ARC^{NPY} también liberan GABA y envían proyecciones inhibitorias a las ARC^{POMC}. Así, el balance en la actividad entre ambas poblaciones neuronales determina la modulación del consumo de alimento por parte del ARC. Las neuronas ARC^{NPY} envían proyecciones a diversas regiones del encéfalo incluyendo otros núcleos del hipotálamo como el núcleo paraventricular (PVN), el hipotalámico dorsomedial (DMH), el núcleo hipotalámico ventromedial (VMH), el AHL, entre otros [153]. La ghrelina actúa principalmente sobre las ARC^{NPY} debido a que GHSR se expresa mayoritariamente en esta población neuronal [154]. Esto desencadena la activación de dichas neuronas y la consecuente liberación de AgRP y NPY a los sitios blanco, incluyendo la liberación de GABA a las ARC^{POMC}, produciendo en última instancia un aumento en las conductas orexigénicas [155].

En lo que respecta a las proyecciones neuronales que van desde el núcleo ARC al AHL se ha demostrado que las neuronas ARC^{NPY} proyectan al AHL [156, 157] y la activación optogenética de esta vía induce el consumo de alimentos en ratones [153, 158]. En el mismo sentido, la administración de NPY en el AHL de ratas estimula el consumo de alimentos con alto contenido en grasas y azúcares [159]. Respecto a las conexiones desde el AHL al núcleo ARC se reportaron proyecciones de neuronas AHL^{orex} hacia el ARC [149, 160] en particular a las ARC^{NPY} [161] pero no se encontraron conexiones entre las neuronas GABA del AHL y las ARC^{NPY} [162]. Al momento, el rol de GHSR en modular la actividad de las neuronas del AHL que proyectan ARC^{NPY} no se ha explorado.

Si bien el rol de GHSR se ha caracterizado ampliamente en el ARC, su estudio en el AHL no ha recibido la misma atención. Los trabajos que abordaron la expresión de GHSR en el AHL lo hicieron a través de diferentes métodos entre los que se incluyen la hibridación *in situ* (ISHH por sus siglas en inglés para *in situ hybridization histochemistry*) [64, 163] o la PCR cuantitativa (qPCR), ambos en ratas [164]. Sin embargo, otro trabajo en donde también se usó ISHH, no reportó señal de la presencia de la sonda del ARNm de GHSR en el AHL de ratones [65]. Así, determinar la presencia y las características anatómicas de las neuronas del AHL que expresan GHSR (AHL^{GHSR} de aquí en adelante) en ratones se vuelve de gran importancia para poder estudiar su funcionalidad, en particular debido al uso generalizado de los ratones genéticamente modificados en el estudio del control del apetito y el balance energético.

Algunos estudios abordaron el efecto de la administración de ghrelina en el AHL mostrando que esta induce el consumo de alimentos [165, 166] e incrementa el marcador de activación neuronal c-Fos [165, 167] en ratas. A su vez la señalización de GHSR media algunas conductas relacionadas a la recompensa del AHL, ya que ratas deficientes de GHSR no aumentan la estimulación eléctrica intracraneal en el AHL mientras que los ratos salvajes si lo hacen [168]. En el mismo sentido, la administración de ghrelina en el AHL también induce conductas vinculadas a la motivación y el consumo de alimentos con alta palatabilidad, en particular incrementa el esfuerzo realizado por ratas para obtener pellets de sucrosa [169]. Sin embargo, el bloqueo con el antagonista de GHSR YIL781 en el AHL reduce estos comportamientos operantes solo en ratas hembras [169]. También cabe destacar el rol de las neuronas AHL^{orex} como mediadoras de la acción de ghrelina en el AHL, ya que tanto la administración central como intra-AHL de ghrelina incrementan los niveles del marcador c-Fos en las neuronas AHL^{orex} [165, 170, 171]. Además, el bloqueo por antagonistas de los receptores de orexina en el AVT y el uso de ratones deficientes de orexina impiden comportamientos vinculados al sistema de recompensas evocados por ghrelina [106, 172, 173]. Por otro lado, la expresión de GHSR en las AHL^{orex} no ha sido fehacientemente demostrada hasta el momento, indicando que la acción de la ghrelina sobre las AHL^{orex} podría ser indirecta.

Lo expuesto anteriormente recapituló la evidencia acerca del efecto de la ghrelina sobre el AHL en el control del consumo de alimentos. A diferencia de la ghrelina, el efecto de LEAP2 sobre el hipotálamo en el control del apetito ha sido poco explorado. Evidencia reciente indica que LEAP2 actuaría a través de las neuronas ARC^{POMC} para disminuir el consumo de alimento y reducir el peso corporal [174]. Sin embargo, el efecto del LEAP2 sobre las AHL^{GHSR} aún no se conoce.

Lo expuesto hasta el momento indica que la ghrelina podría mediar conductas vinculadas al consumo de alimentos cuando actúa en el AHL, y que la presencia de GHSR en esta región es importante para el control del apetito. Ahora bien, estos resultados fueron reportados usando ratas como modelo experimental. Sin embargo, actualmente existe una amplia disponibilidad de ratones genéticamente modificados y su uso permite estudiar con mayor detalle las poblaciones y circuitos neuronales. Es por eso que en este trabajo de Tesis se evaluó la hipótesis de que **las neuronas AHL^{GHSR} modulan la conducta alimentaria en ratones**. Para esto se estudiaron las características anatómicas y funcionales de las neuronas AHL^{GHSR}, su respuesta a ghrelina y a LEAP2, y los circuitos neuronales que se reclutan consecuencia de su activación. El empleo de modelos murinos permite realizar intervenciones en los circuitos neuronales, evaluar conductas, realizar estudios histológicos y comparar los resultados obtenidos con trabajos previos. Una gran parte del conocimiento acerca de los circuitos neuronales y las señales hormonales que regulan el consumo de alimentos se construyó usando roedores como modelos experimentales, por lo que su empleo en este trabajo de Tesis es crucial para realizar entender el rol de las neuronas AHL^{GHSR} en el control de la alimentación.

OBJETIVOS

El objetivo general del presente trabajo de Tesis es **dilucidar aspectos neuroanatómicos y funcionales de la expresión de GHSR en el AHL**. Para esto, se llevarán a cabo los siguientes objetivos específicos:

Objetivo 1- Realizar una caracterización neuroanatómica de las neuronas AHL^{GHSR}.

- 1.1. Determinar la distribución neuroanatómica de las neuronas AHL^{GHSR}.
- 1.2. Determinar posibles agrupamientos diferenciales entre las AHL^{GHSR}.
- 1.3. Determinar el fenotipo neuroquímico de las neuronas AHL^{GHSR}.

Objetivo 2- Determinar la respuesta de las neuronas AHL^{GHSR} a ghrelina.

- 2.1. Determinar la accesibilidad de la ghrelina al AHL.
- 2.2. Determinar la respuesta de las neuronas del AHL a la ghrelina sistémica y central.
- 2.3. Determinar la respuesta de las neuronas AHL^{GHSR} a la ghrelina sistémica y central.

Objetivo 3- Determinar la respuesta de las neuronas AHL^{GHSR} a LEAP2 y realizar una caracterización funcional del péptido.

- 3.1. Determinar los segmentos bioactivos de LEAP2.
- 3.2. Determinar la accesibilidad del LEAP2 fluorescente (F-LEAP2) al AHL y a diversas regiones del encéfalo.
- 3.3. Determinar la respuesta de las neuronas del AHL al LEAP2.

Objetivo 4- Determinar el rol de las neuronas AHL^{GHSR} en la modulación de conductas alimentarias.

- 4.1. Determinar la respuesta de las neuronas AHL^{GHSR} a cambios endógenos de la relación ghrelina/LEAP2 plasmática.
- 4.2. Determinar los efectos conductuales de la expresión de GHSR exclusivamente en el AHL.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales experimentales

Todos los protocolos que incluyeron animales experimentales se realizaron en el bioterio del Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE) el cual cuenta con salas de alojamiento, reproducción y experimentación de animales. Para el desarrollo de esta tesis se usaron ratones machos adultos de entre 8 y 12 semanas de edad de la especie *Mus musculus* correspondientes a la cepa C57BL/6. Los animales se mantuvieron en condiciones estándar de alojamiento las cuales incluyen un ciclo de luz/oscuridad con un fotoperiodo controlado de 12hs/12hs (07:00 a.m. 19:00 p.m.), temperatura controlada en 22 ± 2 °C, cajas de vida de aluminio (26x16x15 cm), alimento estándar y agua *ad libitum* y viruta irradiada. A su vez, los animales usados en este trabajo de Tesis correspondieron a diferentes genotipos:

-Ratones WT: ratones de genotipo salvaje *wild type* (WT) de la cepa C57BL/6

-Ratones *GHSR^{n/n}*: estos ratones poseen un cassette de bloqueo de la transcripción (TBC por las siglas en inglés para *Transcriptional Blocking Cassette*) entre el exón 1 y el 2 del gen de GHSR [175]. El TBC está flanqueado por dos sitios *loxP* los cuales pueden ser reconocidos y clivados por una enzima recombinasa Cre, y restaurar la expresión normal del GHSR. Se usaron animales homocigotos para la mutación obtenidos a partir de la cruce de animales heterocigotos con un *background* en C57BL/6. Estos ratones fueron desarrollados y cedidos a nuestro laboratorio por el Dr. Jeffrey Zigman de la Southwestern Medical Center en la Universidad de Texas.

-Ratones *GHSR^{eGFP}*: estos ratones expresan la proteína verde fluorescente (eGFP por sus siglas en inglés) bajo el control del promotor de GHSR (Mutant Mouse Resource & Research Center, Tg(Ghsr)-EGFP KZ65Gsat; Stock #030942).

-Ratones *NPY^{hrGFP}*: estos ratones expresan la proteína hrGFP bajo el control del promotor de NPY. (Jackson Laboratory, Stock 006417).

-Ratones *GHSR^{eGFP}/Gad2^{cre/+}/Rosa26^{tdTomato}*: estos ratones expresan la eGFP en las células que expresan GHSR, y tdTomato en las células que expresan Gad2. Estos animales surgen de la cruce entre ratones *GHSR^{eGFP}* y *Gad2^{cre/+}/Rosa26^{tdTomato}*. A su vez, estos últimos se obtienen cruzando animales *Gad2-CreER* (Jackson Laboratory, *Gad2tm1(cre/ERT2)Zjh/J*; Stock 010702) y animales Ai14 (Allen Institute, 129S6-Gt(ROSA)26Sortm14(CAGtdTomato)Hze/J; Stock 007908). A los ratones adultos *GHSR^{eGFP}/Gad2^{cre/+}/Rosa26^{tdTomato}* se los inyectó por 3 días consecutivos con

tamoxifeno (Sigma-Aldrich, cat. T5648; 70 mg/kg peso corporal, IP) para inducir la recombinación con Cre, y se los usó 3 semanas después de la última inyección.

-Ratones WT con ARC-lesionado: a un subgrupo de ratones WT se los trató farmacológicamente en tiempos posnatales tempranos para lesionar específicamente el ARC del encéfalo. A este grupo experimental se lo denominó ARC-lesionado. Estos animales se generaron inyectando a crías en el día posnatal 4 (P4) con glutamato monosódico (MSG) a 2,5 mg/gr peso corporal. También se obtuvieron animales controles llamados ARC-intacto a los cuales, en lugar de MSG, se los inyectó con NaCl estéril al 0,9%.

Los protocolos experimentales de esta Tesis realizados con animales de laboratorio contaron la aprobación del Comité Interno Para el Uso y Cuidado de los Animales de Laboratorio (CICUAL) del IMBICE (Protocolo 20-3-21).

2. Genotipificado de los animales

La identificación genotípica de los animales se realizó a partir de ADN obtenido de biopsias de cola obtenidas al día postnatal 21 de los ratones. Para la extracción de ADN, a las muestras se las recogió en un tubo eppendorf de 200 μ l y se las procesó en un termociclador BioRad durante una hora a 98°C en 75 μ l de una solución de NaOH 25 mM con EDTA 0,2 mM. Luego, se llevó la solución a 15°C y se le agregó 75 μ l de Tris-HCl (pH 5,5) y se homogeneizó. Para la genotipificación se empleó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR de sus siglas en inglés para *Polymerase Chain Reaction*). La mezcla de reacción consta de: 1,25 μ l de buffer 10X; 0,625 μ l de MgCl₂ 50 mM; 0,25 μ l de dNTPs 10 mM; 0,0625 μ l de TAQ Pegasus ADN polimerasa 5 U/ μ l; 0,625 μ l de primer *forward* 10 μ M; 0,625 μ l de primer *reverse* 10 μ M; 1 μ l de la mezcla de extracción del ADN y 12,5 μ l de H₂O MQ. Los primers *forward* y *reverse* utilizados para cada genotipo de ratón se detallan en la **Tabla 1**. La mezcla se cicló durante 2 hs en un termociclador (Bio-Rad) con el siguiente protocolo: 4 min a 94°C; 35 ciclos de: 30s a 94°C, 30s a 59°C y 45s a 72°C; 7min a 72°C y finalmente se mantuvo a 10°C. Una vez terminado el ciclado, se agregó a cada tubo 2,1 μ l de una mezcla de buffer de carga con un colorante de ácidos nucleicos (GelRed) y se homogeneizó. Se sembró 6 μ l de esta mezcla en un gel de agarosa al 2% y se corrió en una cuba electroforética durante 1 hora a 90V. El gel se reveló en un transiluminador UV (Gel-Doc XR+, Bio-Rad) y se acuerdo al patrón de bandas observado, se determinó el genotipo de cada animal.

Cepa de ratón	Gen	Alelo	Secuencia primers	Tamaño del producto
GHSR ^{n/n}	GHSR	WT	Fwd 5'-GAGTGACAGGTAAGTGAGTGCG Rev 5'-GTGCGAACATTAGCGATGAAAGG	184 pb
		TBC	Fwd 5'-CCACTGCACGTCTCTCCCTATTT Rev 5'-AAGAGCTACAGGAAGGCAGGTCA	175 pb
Gad2 ^{cre}	Gad2	WT	Fwd 5'-ACGTTTCCTGTCCCTGTGTG Rev 5'-CAGACGCTGCAGTCTTTTCCAG	507 pb
		Cre	Fwd 5'-ACGTTTCCTGTCCCTGTGTG Rev 5'-AGGCAAATTTTGGTGTACGG	247 pb
Ai14	Rosa26	tdTomato	Fwd 5'-CGGCATGGACGAGCTGTAC Rev 5'-CAGGCGAGCAGCCAAGGAAA	500 pb
GHSR ^{eGFP}	eGFP	eGFP	Fwd 5'-GGACCTCCTCAGGGGACCAGAT Rev 5'-GGTCGGGGTAGCGGCTGAA	330 pb
NPY ^{hrGFP}	hrGFP	hrGFP	Fwd 5'-TATGTGGACGGGGCAGAAGATCCAGG Rev 5'-AGGTGCGGTTGCCGACTGGA	400 pb

Tabla 1. Primers usados en las PCR de genotipificación de los ratones transgénicos que fueron parte de este trabajo de Tesis.

3. Reactivos

- 3-3'-diaminobenzidina (DAB)/Solución de Níquel (Sigma Aldrich)
- AAV8/hSyn-mCherry-CRE (Vector Core de la Universidad de Carolina del Norte. Donado por el Dr. Juan Belforte)
- AAV9/U6-shsc-eGFP (generado en el laboratorio de la Dra. Verónica Baéz del Instituto de Biología Celular y Neurociencias "Prof. E. De Robertis")
- Aceite de sésamo (Farmacia local)
- Alcoholes (Biopack)
- Bálsamo de Canadá (Biopack)
- Buffer fosfato-salina (PBS, del inglés, *phosphate buffered saline*) 0,01 M pH 7,4: Na₂HPO₄ 1,9 g/L, NaH₂PO₄ 0,32 g/L y NaCl 8,16 g/L (Biopack)
- Colchicina (Sigma-Aldrich)
- DABCO (Sigma-Aldrich)
- Dietil-pirocarbonato (Sigma)
- dNTPs (Invitrogen)
- EDTA
- Formaldehído 40x (Biopack)

- Flunixin meglumina (Flumeg, Over)
- GelRed (Biotium)
- Heparina (Calciparine, Sanofi Aventis)
- Ketamina (Holliday Scott SA)
- Kit comercial de complejo avidina-biotina-peroxidasa "VectaStain Elite ABC" (Vector Laboratories)
- Microesferas fluorescentes (fluoresferas) rojas (Fluospheres, Molecular Probes)
- Sacarosa (Biopack)
- Solución fisiológica (NaCl 0,9%)
- Suero Normal de Burro (Equitech-Bio.INC)
- Tamoxifeno (Sigma, cat # T5648)
- TAQ Pegasus ADN polimerasa (EmbioTec)
- Transcriptasa reversa M-MLV (Promega)
- Tritón-X100 (Biopack)
- Xilacina (Richmond Vet Pharma)

4. Ligandos de GHSR utilizados

En este trabajo de Tesis se utilizaron tanto los ligandos endógenos de GHSR (ghrelina y LEAP2) como diferentes variantes moleculares de ellos. Estas variantes permitieron estudiar distintos aspectos de la fisiología del receptor. Los ligandos usados fueron:

-*Ghrelina nativa* (GSS-(octanoílo)-FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR): hormona peptídica en su estado nativo, esterificada con ácido n-octanoico (PM: 3315 Da; Global Peptide, cat # PI-G-03).

-*Ghrelina fluorescente roja* (F-ghrelina, GSD-(octanoílo)-FLSPEHQKAQQRKESC-(DY647)): análogo de la ghrelina que contiene 19 aminoácidos y está conjugado a un fluoróforo DY647-maleimida. Además, la serina en la posición 3 es reemplazada por ácido aspártico cuya cadena lateral se encuentra amidada con ácido amino-octanoico (PM: 3562 Da)

-*LEAP2(1-40)*: hormona peptídica en su estado nativo, con 40 aminoácidos y dos puentes disulfuro. (PM: 5586 Da). Su estructura se representa en la **Figura 1** de este capítulo.

-*LEAP2(1-12-NH2)*: variante del LEAP2 que contiene 12 aminoácidos del segmento N-terminal del LEAP2. No contiene los puentes disulfuro. (PM: 1769 Da). Su estructura se representa en la **Figura 1** de este capítulo.

-*LEAP2(15-40-OH)*: variante de LEAP2 que contiene 26 aminoácidos del segmento C-terminal del LEAP2. Contiene los puentes disulfuro. (PM: 3500 Da). Su estructura se representa en la **Figura 1** de este capítulo.

-*LEAP2 fluorescente rojo (F-LEAP2)*: variante de LEAP2 que contiene 17 aminoácidos del segmento N-terminal y está conjugado a un fluoróforo DY647-maleimida. (PM: 3010 Da). Su estructura se representa en la **Figura 2** de este capítulo.

A excepción de la ghrelina nativa, el resto de los péptidos fueron sintetizados por el laboratorio del Dr. Fehrentz del Instituto de Biomoléculas Max Mousseron, Montpellier, Francia.

5. Dietas utilizadas

En los experimentos que involucraron distintos tipos de dietas, se utilizaron dieta estándar y dieta de alto contenido graso (DACG), provistas por Gepsa (Grupo Pilar, Pilar, Buenos Aires, Argentina, www.gepsa.com). La dieta estándar posee un valor energético de 2,5 kcal/g y su composición, en porcentaje respecto del peso, es la siguiente: 28,8% de carbohidratos, 25,5% de proteínas, 3,6% de grasas, 27,4% de fibras, 8,1% de minerales y 6,7% de humedad. Por otro lado, la composición de la DACG es la siguiente: 22,5% de carbohidratos, 22,8% de proteínas, 21,1% de grasas, 23,0% de fibras, 5,6% de minerales y 5% de humedad. Los principales componentes lipídicos de la DACG son ácidos grasos monoinsaturados (44,7%), ácidos grasos saturados (29,8%) y ácidos grasos polinsaturados (20,9%), entre otros. Es importante remarcar que los pellets de dieta estándar y DACG son similares en su apariencia general (color, textura, etc.).

6. Cirugías estereotáxicas

Las cirugías estereotáxicas se realizaron en el bioterio del IMBICE haciendo uso de un estereotáxico para ratones y de material de cirugía con la asepsia apropiada. Estas cirugías se realizaron con el objetivo de implantar cánulas guía permanentes (PlasticOne) en el ventrículo lateral (2,3 mm de largo por debajo del cráneo, calibre 22) o en el AHL (2,5 mm de largo por debajo del cráneo, calibre 22) del encéfalo de ratones.

Los animales se anestesiaron usando una solución de ketamina (160 mg/kg de peso, IP) y xilacina en (16 mg/kg de peso, IP) en solución fisiológica. Una vez anestesiados, se les ubicó la cabeza en

un estereotáxico, se les hizo una incisión en la piel de la calota y se expuso el cráneo. Luego se determinó el punto correspondiente al bregma y se determinaron sus coordenadas estereotáxicas. A partir de allí se movió el brazo del estereotáxico en el sentido anteroposterior, lateral y ventral para realizar cualquiera de las siguientes implantaciones de cánulas:

-Intra-cerebro-ventriculares (ICV): se implantó una cánula guía en el cuarto ventrículo cerebral usando las siguientes coordenadas estereotáxicas: -0,34 mm anteroposterior, +1 mm lateral y -2,3 mm ventral.

-Intra-área hipotalámica lateral (intra-AHL): se implantó una cánula guía de manera bilateral en el AHL usando las siguientes coordenadas estereotáxicas: -1,58 mm anteroposterior, ± 1 mm lateral y -2,5 mm ventral.

Las coordenadas estereotáxicas se obtuvieron del Atlas del cerebro de ratón de Paxinos y Franklin [176]. Una vez ubicada la región de interés (cuarto ventrículo o AHL), se perforó el cráneo, se implantó la cánula guía y se la fijó al hueso con acrílico dental. Luego se cerró la herida, se sacó a los animales del estereotáxico y se los devolvió a su caja de vida dejándolos recuperarse por al menos cinco días. Finalizada la cirugía, se les administró un analgésico y antiinflamatorio (Flumeg 5%, SC) por tres días consecutivos una vez por día. La posición de la cánula se determinó *post-mortem* en cortes histológicos.

7. Procedimientos experimentales

7.1. Caracterización neuroanatómica de las neuronas AHL^{GHSR}

7.1.1. Estudio de la distribución neuroanatómica de GHSR en el AHL

Para estudiar las neuronas AHL^{GHSR} se usaron ratones GHSR^{eGFP} los cuales expresan la eGFP bajo el control del promotor de GHSR. Para conocer si este modelo animal es una herramienta válida para estudiar las neuronas AHL^{GHSR} se usaron muestras de encéfalo de estos animales (n=4) las cuales fueron sometidas a una ISHH contra el ARNm de GHSR, y una inmunomarcación cromogénica contra eGFP. A partir de allí, se cuantificó el número de neuronas AHL^{eGFP} y el número de gránulos de Ag⁺ depositados sobre cada una de estas neuronas. Para conocer qué número de gránulos de Ag⁺ depositados sobre una célula indican señal positiva, se calculó el número de gránulos en el área correspondiente a una célula en una región control del encéfalo que no posee expresión de GHSR. En esta región el número de gránulos de plata en el área

correspondiente a una célula fue de 0,49. Así se tomó como criterio que tres veces por arriba de este valor corresponde al número de gránulos de plata en una célula positiva para GHSR. Es de destacar que las muestras fueron generadas en el laboratorio del Dr. J. Zigman en la Universidad de Texas, USA.

Para conocer la distribución de neuronas GHSR en el AHL, se usaron ratones GHSR^{eGFP} (n=15) a los cuales se los perfundió, extrajo el cerebro, congeló y cortó en cuatro series coronales. A una de estas series se las sometió a una inmunotinción cromogénica contra eGFP para estabilizar la señal en el tiempo. Las secciones de la serie que contenían el AHL se montaron en un portaobjetos, se deshidrataron y finalmente se cubrieron con bálsamo de Canadá. Para obtener el número total de neuronas AHL^{eGFP} cuantificó al microscopio de campo claro el número de células positivas para eGFP+ en el AHL de cada corte de la serie, luego a ese número se lo multiplicó por el número de series en que se cortó el encéfalo y finalmente se multiplicó a dicho valor por el factor de Abercrombie para corregir por doble conteo. Los límites neuroanatómicos del AHL se delimitaron de acuerdo al Atlas del cerebro de ratón de Paxinos y Franklin [176].

Para conocer la distribución volumétrica de las AHL^{eGFP} se perfundieron animales GHSR^{eGFP} (n=2), se congelaron y cortaron sus encéfalos y se cortó en cuatro series coronales secuenciales. Luego se realizó sobre todas las series una inmunotinción cromogénica anti-eGFP y cada serie se montó por separado en un portaobjetos. Luego, en un microscopio de campo claro, se obtuvieron imágenes de magnificación baja (que incluyen la anatomía general de todo) y de magnificación intermedia (que incluyen la anatomía detallada del AHL) de todos los cortes. Las imágenes de los cortes de cada encéfalo se importaron secuencialmente como mosaicos a TrakEM2 respetando el orden antero-posterior de los mismos. Estos cortes luego se alinearon entre sí y se ajustó su posición anatómica de manera de obtener un volumen completo del AHL. En cada corte se delimitó manualmente el AHL y otras estructuras circundantes. En el AHL de cada corte se anotaron manualmente las posiciones de las células AHL^{eGFP} las cuales luego se usaron para obtener la reconstrucción volumétrica. La representación gráfica de dicha reconstrucción se realizó importando a Blender (<http://www.blender.org/>) todas las células y estructuras marcadas en TrakEM2.

La distribución espacial resultante de las AHL^{eGFP} se usó para evaluar posibles agrupamientos 3D. Para esto se utilizó el algoritmo DBSCAN (de las siglas en inglés para *Density-Based Spatial Clustering of Applications with Noise* [177]) el cual se basa en el agrupamiento de puntos (en este caso neuronas AHL^{eGFP}) mediante su clasificación entre las categorías de “puntos centrales”, “puntos borde” y “puntos ruido”. Esta clasificación y agrupamiento es alcanzado en

tres pasos: en primera instancia, el algoritmo calcula la densidad (número) de puntos que rodea a cada uno dentro de un cierto radio (“Eps”). Todos los puntos que estén rodeados por al menos una cantidad umbral de puntos vecinos (“minPts”) se clasifican como puntos centrales. Luego, se vuelve a revisar el conjunto de puntos remanentes. Si un punto se encuentra dentro de un radio Eps de un punto central (y viceversa, por simetría), se lo clasifica como punto borde. De lo contrario, pasa a ser un punto ruido. Finalmente, se establecen los subconjuntos mixtos de puntos centrales y borde que se hallan a menos de Eps unos de otros. Esto resulta en un cierto número de grupos de puntos contiguos asociados por su cercanía y densidad circundante, y un conjunto accesorio de puntos ruido que se encuentran aislados de estas agrupaciones. Una de las ventajas del algoritmo DBSCAN es que no es necesario establecer de antemano el número exacto de grupos de puntos esperados, además de ser muy robusto respecto de la geometría arbitraria que éstos puedan presentar. En nuestro caso, elegimos el valor estándar de 4 para el parámetro minPts y un valor de 60 μm para Eps, seleccionado luego de analizar la distribución del número de agrupaciones versus Eps, siguiendo las recomendaciones en la descripción original del algoritmo. Es importante notar que el valor de Eps supera la distancia rostro-caudal entre cortes para nuestro muestreo, asegurando de esta forma que los grupos de puntos puedan extenderse entre cortes contiguos.

Posteriormente, con el objetivo de comparar si la distribución espacial entre las AHL^{eGFP} estaba conservada entre ambos animales estudiados, se corregistraron las neuronas AHL^{eGFP} de los dos animales estudiados en un mismo sistema de coordenadas correspondiente al del *Allen Mouse Brain Common Coordinate Framework* (CCF). Para realizar una correcta alineación espacial de las neuronas AHL^{eGFP} en el sistema de coordenadas, cada set de datos fue importado a DeepSlice (una red neuronal artificial online) la cual ajusta la posición antero-posterior, la rotación, el ángulo y la escala del set de datos al CCF [178]. Una vez realizada esta alineación, se mapearon los sets de datos sobre un descriptor de la superficie del encéfalo también correspondiente al *Allen Brain Atlas* de manera de poder comparar la distribución de ambos sets en un mismo sistema de coordenadas anatómico.

7.1.2. Caracterización del fenotipo neuronal de las neuronas AHL^{GHSR}

Para conocer el fenotipo neuroquímico de las AHL^{GHSR} se usaron tres grupos independientes de ratones GHSR^{eGFP}: a) un grupo de ratones GHSR^{eGFP} naïve (n=6); b) un grupo de ratones GHSR^{eGFP} a los cuales se los inyectó con colchicina ICV (16 μg en 4 μl por ratón) 48 hs previo a la

perfusión (n=7); y c) un grupo de ratones $GHSR^{eGFP}/Gad2^{cre/+}/Rosa26^{tdTomato}$ (n=3). A estos ratones se los perfundi6, se extrajo su enc6falo y se los proces6 para inmunotinciones fluorescentes dobles contra eGFP y contra distintos marcadores neuroqu6micos (ver **Tabla 2 y 3**). Las secciones coronales de los ratones $GHSR^{eGFP}$ na6ve fueron usadas para inmunotinci6n contra orexina, nNOS, MCH o parvalb6mina. Las secciones coronales de los ratones $GHSR^{eGFP}$ inyectados con colchicina fueron usadas para inmunotinciones contra neurotensina, somatostatina, oxitocina, TRH o galanina. Por 6ltimo, las secciones de los ratones $GHSR^{eGFP}/Gad2^{cre/+}/Rosa26^{tdTomato}$ fueron usadas solo para inmunotinci6n contra eGFP. Todas las secciones se montaron y se prepararon para obtener im6genes por microscopia de fluorescencia. Sobre estas im6genes se cuantific6 el porcentaje de co-localizaciones de las dos marcas respecto al total de AHL^{eGFP} .

7.2. Respuesta de las neuronas AHL^{GHSR} a ghrelina

7.2.1. Efectos conductuales de ghrelina sobre las neuronas que expresan $GHSR$ del AHL

Para evaluar los efectos conductuales de la acci6n de ghrelina sobre las AHL^{GHSR} , se implantaron c6nulas intra-AHL en ratones WT. Luego del tiempo de recuperaci6n, se administr6 soluci6n veh6culo o ghrelina en el AHL y se evaluaron diversas conductas:

1. Ensayo de consumo de alimento. A ratones individualizados y previamente implantados con c6nulas intra-AHL, se les retir6 el alimento y se verific6 que no queden restos del mismo en la viruta. Luego de ser inyectados intra-AHL se les dej6 un pellet de comida pre-pesado (~1500 mg) el cual se volvi6 a pesar a los 30, 60 y 120 minutos post-inyecci6n para conocer la cin6tica del consumo de alimento. A los 120 minutos luego del pesado del pellet, los ratones se perfundieron y se proces6 el enc6falo para obtener secciones coronales. El consumo de alimento luego de inyecciones intra-AHL se evalu6 en tres ensayos:

- a) animales WT inyectados con veh6culo (n=5) o 60 pmol/rat6n de ghrelina (n=6);
- b) animales WT con el ARC-intacto o con el ARC-lesionado inyectados con veh6culo (n=4 y 5 respectivamente) o con 60 pmol/rat6n de ghrelina (n=4 y 6 respectivamente);
- c) animales NPY^{hrGFP} pretratados IP con soluci6n veh6culo o con un antagonista del receptor 1 de orexina (SB-334867, Tocris, cat6logo 1960) y 30 minutos despu6s, inyectados intra-AHL con

solución vehículo o 60 pmol/ratón de ghrelina (vehículo/vehículo n=4, vehículo/ghrelina n=4, SB-334867/vehículo n=4, SB-334867/ghrelina n=6).

2. Ensayo de actividad locomotora y conductas variadas. Aquí los ratones previamente implantados con la cánula intra-AHL se transfirieron a jaulas de registro (19x28x13 cm) asignadas exclusivamente para cada animal, y se colocaron en una caja de filmación (55x35x90 cm) ventilada y aislada acústicamente la cual cuenta tiene acoplada una cámara digital para el registro de las conductas. En las jaulas de registro los ratones no disponían de alimento ya que la interacción con el mismo, dada la acción orexigénica de la ghrelina, hubiera afectado su comportamiento. Antes de la medida de actividad locomotora, los animales se habituaron al ambiente de registro. Para ello, los ratones fueron transferidos de su jaula hogar a su jaula de registro exclusiva que, a su vez, se colocó dentro de la caja de filmación durante una hora por dos días consecutivos antes del día experimental. En el día experimental se les administró solución vehículo (n=7) o con 60 pmol/ratón de ghrelina (n=9) en el AHL y se registraron durante 30 minutos los videos de dos cajas en simultáneo. Luego de este tiempo, se devolvió a los ratones a su jaula hogar y a las dos horas de la inyección se los perfundió para obtener secciones coronales del encéfalo. Los videos fueron importados a ImageJ, se muestrearon a ocho cuadros por segundo y se usaron macros diseñados en el laboratorio para evaluar la distancia total recorrida, la cual se expresó en centímetros. También en ImageJ, se evaluó el tiempo en que cada animal realizó distintas conductas exploratorias, como: excavar, pararse sobre las patas traseras y saltar, y una conducta no-exploratoria, el acicalamiento. La conducta excavatoria se determinó cuando el animal removía la viruta con las patas delanteras mientras mantenía las patas traseras separadas. La conducta de acicalamiento se determinó cuando el animal se frotaba la cara y luego el lomo con las patas delanteras, por más de un segundo.

3. Ensayo de consumo de oxígeno. Aquí se evaluó si la administración de la ghrelina en el AHL inducía cambios en el metabolismo basal de los animales. El metabolismo basal se infirió a partir del consumo de oxígeno usando jaulas metabólicas CLAMS (*Comprehensive Lab Animal Monitoring System* - Oxymax, Columbus Instruments, Columbus, UH, USA). El experimento consistió en canular intra-AHL a ratones WT (n=10) y, luego de la recuperación post-quirúrgica, colocarlos en las CLAMS durante tres días. El primer día fue usado para que los animales se aclimaten al nuevo ambiente. En el segundo día se les inyectó solución vehículo intra-AHL, y el tercer día 60 pmol/ratón de ghrelina intra-AHL. Cada día, luego de las inyecciones, se monitoreó el consumo de oxígeno durante 30 minutos, tiempo durante el cual los animales no tuvieron acceso a alimento. El consumo de oxígeno se estimó cada 15 minutos y se expresó como

ml/kg/h. Este experimento fue realizado durante una estadía de investigación en el laboratorio del Dr. José Donato Jr. (Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad de Sao Paulo, Brasil).

En todos los ensayos, la solución de inyección con vehículo o con ghrelina contuvo LCRa y 0,25% de fluoro-esferas rojas (Red Fluorecent, Invitrogen, catálogo F8793) las cuales nos permitieron identificar el sitio de inyección en el tejido post-mortem. En el análisis se incluyeron solo aquellos animales en los que se haya observado el trazo de los inyectores hasta 500 μ m por arriba del AHL y que solo presenten señal de fluoro-esferas rojas en dicha región.

7.2.2. Estudio de la accesibilidad de la ghrelina fluorescente al AHL

Para estudiar la accesibilidad de la ghrelina al AHL, usamos una variante fluorescente de la hormona llamada F-ghrelina, la cual hemos usado y validado en trabajos previos del grupo [179]. La F-ghrelina es una variante de la ghrelina que está conjugada con el fluoróforo DY-647P a través de la Cys C-terminal. Se realizaron tanto administraciones subcutáneas (SC) como centrales (ICV) de F-ghrelina. Para las administraciones SC se inyectaron ratones con solución vehículo (n=4) o con 1200 pmol/gr de peso corporal de F-ghrelina (n=3). Para las administraciones ICV se inyectaron ratones con solución vehículo (n=3) o con 60 pmol/gr de F-ghrelina (n=6). La dosis elegida de F-ghrelina fueron la mínima dosis del trazador que pudo ser visualizada por fluorescencia directa [179]. Los ratones fueron perfundidos luego de 15 minutos de la inyección y los encéfalos fueron procesados para generar secciones coronales las cuales fueron observadas por fluorescencia directa.

7.2.3. Respuesta de las neuronas del AHL a la ghrelina sistémica y central

Para conocer las respuestas del AHL a la administración de ghrelina, se inyectaron ratones WT con solución vehículo o con ghrelina SC o ICV. Para las administraciones SC se inyectó solución vehículo (n=3) o 600 pmol/gr de peso corporal de ghrelina (n=4). Esta dosis induce el consumo de alimento e incrementa los niveles plasmáticos de ghrelina comparable a los alcanzados durante una restricción calórica. Para las administraciones ICV se inyectó solución vehículo (n=3) o 300 pmol/ratón de ghrelina (n=6). Todos los ratones fueron perfundidos dos horas luego de la inyección y los encéfalos fueron procesados para obtener secciones coronales. Las secciones de una serie que contenían al AHL fueron sometidas a una inmunotinción cromogénica contra c-Fos.

7.2.4. Respuesta de las neuronas que expresan GHSR del AHL a la ghrelina sistémica y central

Para conocer las respuestas de las AHL^{GHSR} a la administración de ghrelina, se inyectaron ratones GHSR^{eGFP} con solución vehículo o con ghrelina SC o ICV. Para las administraciones SC se inyectó solución vehículo (n=3) o 600 pmol/gr de peso corporal de ghrelina (n=6). Para las administraciones ICV se inyectó solución vehículo (n=3) o 300 pmol/ratón de ghrelina (n=8). Todos los ratones fueron perfundidos dos horas luego de la inyección y los encéfalos fueron procesados para obtener secciones coronales. Las secciones de una serie que contenían al AHL fueron sometidas a una inmunotinción cromogénica doble contra c-Fos/eGFP.

7.3. Respuesta de las neuronas AHL^{GHSR} a LEAP2 y caracterización funcional del péptido

7.3.1. Estudio de los segmentos bioactivos de LEAP2

El primer set de experimentos de esta sección se realizó con el objetivo de caracterizar que región de LEAP2 es bioactiva. Para esto se probaron diferentes variantes moleculares de LEAP2, y se evaluó su capacidad de inhibir la acción orexigénica de ghrelina en ratones. Se usaron tres variantes: una correspondiente al péptido maduro (LEAP2(1-40)), otra correspondiente a los primeros 12 residuos desde el extremo amino-terminal (LEAP2(1-12-NH₂)) y una tercera variante correspondiente a los últimos 26 residuos desde el extremo C-terminal del péptido (LEAP2(15-40-OH)) (**Fig. 3**). La variante LEAP2(1-12-NH₂) no posee los puentes disulfuro presentes en las otras dos variantes.

LEAP2(1-12-NH₂): NleTPFWRGVSLRP-NH₂

LEAP2(15-40-OH): ASCRDDSECTTRLCRKRRCSLSVAQE-OH

LEAP2(1-40): NleTPFWRGVSLRPiGASCRDDSECTTRLCRKRRCSLSVAQE-OH

Figura 3. Variantes moleculares de LEAP2 usadas. La figura indica la secuencia de aminoácidos de las tres variantes de LEAP2 usadas. Las líneas continuas sobre las secuencias indican los puentes disulfuro.

En particular, el experimento consistió en inyectar a ratones WT vía ICV con solución vehículo o con 600 pmoles de LEAP2(1-40), LEAP2(1-12-NH₂) o LEAP2(15-40-OH). Luego de 10 minutos, se les inyectó, también vía ICV, solución vehículo o 60 pmoles de ghrelina. De esta manera, quedaron delimitados los siguientes grupos experimentales: vehículo/vehículo (n=4), vehículo/ghrelina (n=9), LEAP2(1-40)/vehículo (n=4), LEAP2(1-40)/ghrelina (n=6), LEAP2(1-12-NH₂)/vehículo (n=5), LEAP2(1-12-NH₂)/ghrelina (n=12), LEAP2(15-40-OH)/vehículo (n=8) y LEAP2(15-40-OH)/ghrelina (n=8). Finalmente, se les dejó un pellet de comida pre-pesado (~1500 mg) y se evaluó el consumo de alimento a los 30, 60 y 120 minutos post-inyección de ghrelina o vehículo.

Debido a que las sustancias administradas vía ICV pueden acceder a mayores regiones del encéfalo respecto a las administradas a través de vías periféricas, se realizó el mismo diseño experimental anterior con la diferencia de que todas las inyecciones se realizaron vía SC. Las variantes de LEAP2 se inyectaron a una dosis de 600 pmol/gr peso corporal y la ghrelina a 60 pmol/gr peso corporal. De esta manera, quedaron delimitados los mismos grupos que en el experimento previo: vehículo/vehículo (n=7), vehículo/ghrelina (n=14), LEAP2(1-40)/vehículo (n=4), LEAP2(1-40)/ghrelina (n=5), LEAP2(1-12-NH₂)/vehículo (n=6), LEAP2(1-12-NH₂)/ghrelina (n=12), LEAP2(15-40-OH)/vehículo (n=5) y LEAP2(15-40-OH)/ghrelina (n=7). Aquí también se les dejó a los animales un pellet de comida pre-pesado y se evaluó la cinética del consumo de alimento durante los 30, 60 y 120 minutos post-inyección.

Para las variantes de LEAP2 y para la ghrelina se eligieron las dosis de 600 y 60 pmol respectivamente ya que estudios previos muestran que esta dosis de ghrelina induce el consumo de alimento en ratones y que la relación 1:10 entre ghrelina y LEAP2 es suficiente para poner en evidencia el efecto anorexigénico de LEAP2 [38, 180].

7.3.2. Estudio de la accesibilidad del LEAP2 fluorescente (F-LEAP2) al AHL y a diversas regiones del encéfalo

Para estudiar la accesibilidad del LEAP2 al AHL se usó una versión fluorescente de LEAP2 llamada F-LEAP2. Dicha versión fue producida por el laboratorio del Dr. Jacky Marie y consta de los primeros 17 residuos desde el extremo N-terminal de LEAP2, de manera de mantener la bioactividad de la molécula. Debido a que uno de los puentes disulfuro del LEAP2 se encuentra

entre la Cys¹⁷ y la Cys²⁸ se usó la estrategia de unir al fluoróforo DY-647P1-maleimida a la Cys¹⁷ de manera de obtener LEAP2(1-17)-DY-657P1 (F-LEAP2) (Fig. 4).

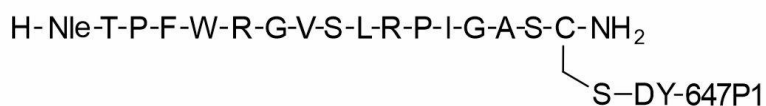


Figura 4. Estructura primaria del F-LEAP2. La figura indica la estructura del F-LEAP2 incluyendo los 17 residuos aminoacídicos y la posición del fluoróforo DY-647P1.

Debido a que el F-LEAP2 no se había usado hasta el momento *in vivo*, se validó su uso como trazador evaluando tanto su especificidad de unión a neuronas que expresan GHSR como su efecto inhibitorio del consumo de alimento. Para esto se realizaron tres ensayos:

1. Ensayo de unión de F-LEAP2 a distintas regiones del encéfalo incluyendo el AHL. En este ensayo se evaluaron las regiones del encéfalo en las que se une F-LEAP2. Para esto, se inyectaron ratones WT con solución vehículo (n=3) o 10 pmol de F-LEAP2 (n=7) vía ICV, y 30 minutos luego de la inyección se los perfundió, se les extrajo el encéfalo y se los procesó para microscopia de fluorescencia. Se obtuvieron imágenes de fluorescencia a baja y alta magnificación de 38 regiones del encéfalo y se realizó un análisis cualitativo del pegado de F-LEAP2 en dichas regiones. La estimación cualitativa de la marca fluorescente para cada región del encéfalo se realizó considerando tanto la intensidad de la señal en esa zona como el número de células marcadas, en comparación con los encéfalos de los animales control. Finalmente, a cada región analizada se le asignó un estado del siguiente código: +++ señal alta; ++ señal moderada; + señal baja; +/- señal inconsistente.

2. Ensayo de especificidad de unión del F-LEAP2 a neuronas que expresan GHSR. En este ensayo se evaluó la capacidad de F-LEAP2 de unirse a las neuronas que expresan GHSR a través de la inhibición de su unión por LEAP2(1-40) o por ghrelina. Para esto, se inyectaron ratones WT vía ICV con solución vehículo, 450 pmol de LEAP2(1-40) o 450 pmol de ghrelina e inmediatamente después se inyectaron con solución vehículo o 10 pmol de F-LEAP2. De esta manera, quedaron conformados los siguientes grupos experimentales: vehículo/vehículo (n=3), vehículo/F-LEAP2 (n=3), LEAP2(1-40)/F-LEAP2 (n=3) y ghrelina/F-LEAP2 (n=3). En este caso no se realizaron los grupos LEAP2(1-40)/vehículo y ghrelina/vehículo ya que se usó el grupo vehículo/vehículo como

control sin ningún marcador fluorescente. Luego de 30 minutos de las inyecciones, los ratones fueron perfundidos, se les extrajo el encéfalo y se los procesó para microscopia de fluorescencia en donde se evaluó la presencia o no de marca fluorescente en el núcleo ARC.

3. Ensayo de bioactividad de F-LEAP2. En este ensayo se evaluó la capacidad de F-LEAP2 de inhibir el efecto orexigénico de ghrelina. Para esto se inyectaron ratones WT vía ICV con solución vehículo, 10 pmol de LEAP2(1-40) o 10 pmol de F-LEAP2, e inmediatamente después con solución vehículo o 60 pmol de ghrelina. De esta manera, quedaron conformados los siguientes grupos experimentales: vehículo/vehículo (n=4), vehículo/ghrelina (n=8), LEAP2(1-40)/vehículo (n=4), LEAP2(1-40)/ghrelina (n=7), F-LEAP2/vehículo (n=3) y F-LEAP2/ghrelina (n=8). Luego de la última inyección, se le dejó a cada ratón un pellet de comida pre-pesado y se evaluó el consumo de alimento a los 30, 60 y 120 minutos post-inyección.

7.3.3 Estudio de la respuesta de las neuronas del AHL al LEAP2

Para conocer la respuesta del AHL al LEAP2 se administró vía ICV solución vehículo (n=5) o 600 pmol de LEAP2(1-40) (n=6) a ratones WT. Luego de esto se le dejó a cada ratón un pellet de comida pre-pesado y se evaluó el consumo de alimento a los 30, 60 y 120 minutos post-inyección. Finalizado este tiempo se los perfundió y se les extrajo el encéfalo al cual se los procesó para inmunotinción cromogénica contra c-Fos.

7.4. Estudio del rol de las neuronas AHL^{GHSR} en la modulación de conductas alimentarias

7.4.1. Estudio de la respuesta de las neuronas AHL^{GHSR} a cambios endógenos de la relación ghrelina/LEAP2 plasmática

Para conocer la respuesta de las neuronas AHL^{GHSR} a aumentos endógenos de ghrelina, se usaron GHSR^{eGFP} a los cuales a un grupo se los mantuvo alimentados (n=4) mientras que a otro se los expuso a una restricción calórica (n=7) de 60% por cinco días. Previo a la restricción calórica, se monitoreó el peso corporal y el consumo nocturno de alimento durante cuatro días. Luego se restringió a los animales con el 40% del consumo nocturno por cinco días consecutivos. A la mañana del quinto día, entre las 09:00 y las 11:00 am, se perfundieron todos los animales y

se extrajo su encéfalo, el cual fue usado para obtener secciones coronales y realizar inmunotinciones cromogénicas dobles contra c-Fos/eGFP.

7.4.2. Estudio de los efectos conductuales de la expresión de GHSR exclusivamente en el AHL

Se estudió el rol de las neuronas AHL^{GHSR} en la modulación de las conductas alimenticias de manera independiente a la administración de ghrelina y LEAP2. Para esto se indujo la expresión de GHSR exclusivamente en el AHL usando vectores virales adenoasociados (AAV). Este experimento consistió en inyectar ratones GHSR^{n/n} con AAV que expresan la recombinasa Cre. La expresión de GHSR en los animales GHSR^{n/n} es dependiente de la acción de Cre, de manera que la inyección de los AAV en el AHL de estos ratones permitirá la expresión del receptor exclusivamente en esta región del encéfalo. Para llevar a cabo este experimento se usaron dos AAV: un AAV8/hSyn-mCherry-CRE que expresa la Cre y el reportero rojo mCherry bajo el promotor de la sinapsina humana y un AAV9/U6-shsc-eGFP usado como AAV control, el cual solo expresa la eGFP bajo el promotor U6. Cada AAV se inyectó estereotáxicamente en el AHL tanto de ratones WT como de GHSR^{n/n} de manera que quedaron configurados los siguientes grupos experimentales: animales WT con AAV8/hSyn-mCherry-CRE (WT AAV-CRE) o AAV9/U6-shsc-eGFP (WT AAV-eGFP) y animales GHSR^{n/n} con AAV8/hSyn-mCherry-CRE (GHSR^{n/n} AAV-CRE) o AAV9/U6-shsc-eGFP (GHSR^{n/n} AAV-eGFP).

Las inyecciones de los AAV se realizaron con los ratón anestesiados y dispuestos en un estereotáxico. Allí se accedió al AHL y se inyectó de manera bilateral con jeringas Hamilton 1 µl de solución (0,5 µl por lado) conteniendo 4,6 x10⁸ de partículas virales en el caso de los AAV-CRE o 2x10⁶ en el caso de los AAV-eGFP. Luego de la cirugía, se dejó a los ratones descansar por una semana, tiempo suficiente para que los AAV expresen la Cre (y/o las proteínas reporteras correspondientes a cada AAV) y se produzca la recombinación que permita la expresión de GHSR. Luego de una semana de realizada la cirugía, se expuso a los ratones a uno de dos protocolos que evalúan conductas alimentarias moduladas por GHSR:

1. Protocolo de hiperfagia inducida por la exposición a dieta con alto contenido graso (DACG).

Aquí, los ratones (n= 8-16 por grupo) se mantuvieron individualizados y con alimento y bebida *ad libitum* durante todo el ensayo. En el día experimental y durante cuatro días consecutivos, se les dio acceso durante dos horas (de 09:00 a 11:00 a.m.) a un pellet de DACG pre-pesado.

Durante esas dos horas se les retiró el alimento usual dejando únicamente el pellet de DACG. Finalmente se controló la ingesta de DACG a los 30, 60 y 120 minutos cada día.

2. Protocolo de exposición a sacarina y restricción calórica. En el primer día del protocolo (**Fig. 5**), a los ratones (n= 9-15 por grupo) con comida y bebida *ad libitum*, se les adicionó una segunda botella con un volumen conocido de sacarina al 0,1%, además de la botella con agua de bebida. Ambas botellas se dejaron toda la noche y a la mañana del día siguiente se calculó el consumo nocturno de sacarina y de agua de bebida. Esta exposición nocturna se realizó con el objetivo de presentar la solución de sacarina a los ratones durante la fase del día donde naturalmente consumen el mayor volumen de líquido diario. Así, se esperó que durante la presentación nocturna consuman más sacarina que agua de manera de validar que la sacarina tiene un valor hedónico alto y que no es aversiva a las concentraciones de uso. Luego de esto y durante los siguientes tres días, durante cuatro horas (11:00 a 15:00 hs p.m.) se les sustrajo el alimento y se les añadió una botella con sacarina al 0,1%, además de la botella con agua de bebida que ya tenían. Luego de estas cuatro horas se les repuso el alimento y se calculó el volumen de agua y de sacarina consumidas. Durante estos tres días también se calculó el consumo nocturno de alimento. Al finalizar el tercer día del protocolo, en lugar de reponer el total del alimento, se restringió a los ratones al 40% del consumo nocturno promedio. En los siguientes cuatro días, se repitió la exposición de sacarina al 0,1% durante cuatro horas y luego de dicha exposición se les dejó únicamente el 40% del alimento. Al finalizar el cuarto día de restricción calórica todos los animales fueron realimentados. Durante todo el protocolo se registró diariamente el peso corporal y el consumo de agua de todos los animales.

Pasadas cuatro semanas de la administración de los AAV, los ratones fueron perfundidos, se extrajo su encéfalo y se procesó para microscopía de fluorescencia. Allí se chequeó el sitio de inyección de los AAV y la presencia de señal en el canal rojo (indicando marca de mCherry) o en el canal verde (indicando marca de eGFP) en el AHL según corresponda. Aquellos animales en los que el trazo del inyector se encontró 500 µm por arriba del AHL o sin marca fluorescente en el núcleo no fueron incluidos en el análisis.

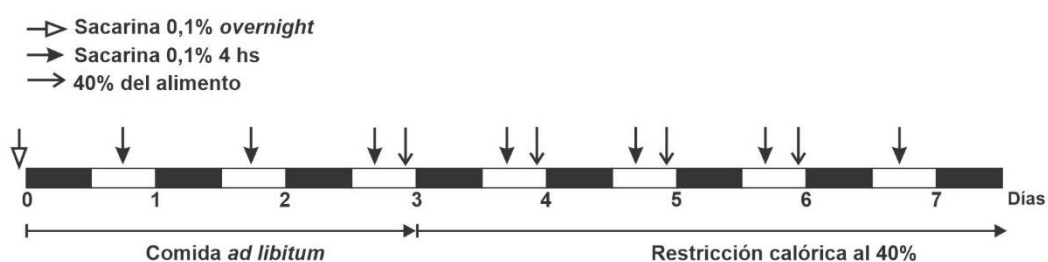


Figura 5. La figura indica el curso temporal del protocolo de consumo de sacarina y restricción calórica en los animales inyectados con AAV8/hSyn-mCherry-CRE o AAV9/U6-shsc-eGFP.

8. Perfusión y extracción del encéfalo

A los ratones se los anestesió y se los perfundió transcárdialmente con formaldehído al 4%. Para esto se dispuso a ratones previamente anestesiados sobre la mesa de cirugía en donde se los sujetó desde las extremidades exponiendo el abdomen hacia arriba. Allí se les realizó una incisión longitudinal sobre el abdomen hasta llegar a la cavidad torácica. A la altura de la cavidad, se realizaron dos incisiones laterales lo que permitió exponer el corazón y canular el ventrículo izquierdo con una aguja 22G conectada a una bomba de perfusión peristáltica. Posteriormente se realizó una corte en la aurícula derecha de manera que la sangre del retorno venoso pueda salir al exterior y no siga por el circuito pulmonar. Una vez canulado el ventrículo, se dió inicio a la perfusión la cual consta de dos pasos: primero se inyectó 30 ml de solución de lavado (PBS 0,01 M pH 7,4 conteniendo 10 UI/ml de heparina) y segundo se inyectó 45 ml de solución fijadora (formaldehído 4% en PBS). Una vez fijados, los cadáveres se decapitaron y se extrajeron los encéfalos los cual se post-fijaron en formaldehído al 4% durante 2hs. Luego, los encéfalos se crio-preservaron en una solución de sacarosa al 20% durante toda la noche. Al día siguiente, los encéfalos se congelaron en hielo seco y fueron cortados en 4 series de secciones coronales de 40 μm utilizando un crióstato (Leica, CM1860). Finalmente, cada serie se guardó en solución crio-preservante a -20°C para ser usadas con fines histológicos cuando sea necesario.

9. Inmunotinciones

En este trabajo de tesis se realizaron dos tipos de inmunotinciones sobre secciones coronales del encéfalo: inmunotinciones fluorescentes e inmunotinciones cromogénicas. Para ambos casos, se realizaron inmunotinciones simples (marcando un solo antígeno) o dobles (marcando dos antígenos). Todas las inmunotinciones se realizaron con los cortes de encéfalo en flotación.

9.1. Inmunotinciones fluorescentes

Para las *inmunotinciones fluorescentes simples*, una serie de secciones coronales de encéfalo se lavó tres veces con PBS 1X por 10 minutos, en agitación. Luego, se incubó a las secciones durante

1h en agitación con una solución de bloqueo compuesta por 3% de suero normal de burro y 0,25% de Tritón-X en PBS. Luego de esto, se incubó al tejido con el anticuerpo primario de interés durante 48hs a 4°C (**Tabla 2**). El anticuerpo primario se diluyó en la misma solución de bloqueo en la que ya se encontraba el tejido. Pasadas las 48hs de la incubación con el anticuerpo primario, las secciones de encéfalo se lavaron 3 veces en PBS 1X por 10 minutos, y luego se las incubó con una solución que contenía el anticuerpo secundario de interés durante 2hs (**Tabla 3**). Al anticuerpo secundario se lo diluyó en solución de bloqueo. Luego de esta incubación, se volvieron a lavar las secciones en PBS 1X y se montaron secuencialmente en portaobjetos positivados.

Las *inmunotinciones fluorescentes dobles* se realizaron de manera similar que las simples con la diferencia de que ambos anticuerpos primarios utilizados (generados en especies distintas) se incubaron al mismo tiempo con el tejido. Lo mismo sucedió con los dos anticuerpos secundarios utilizados.

9.2. Inmunotinciones cromogénicas

Para las *inmunotinciones cromogénicas simples*, una serie de secciones coronales de encéfalo fue lavada tres veces con PBS 1X por 10 minutos, en agitación. Luego se incubaron con H₂O₂ (0,5% en PBS) durante 30 minutos con el objetivo de disminuir la actividad de la peroxidasa endógena. A continuación, se realizaron 3 nuevos lavados por 10 minutos y se incubó el tejido en solución de bloqueo durante 1h. Pasada esa hora, se incubó el tejido con el anticuerpo primario de interés por 48hs a 4°C (**Tabla 2**). A las 48hs, se lavó el tejido 3 veces en PBS y luego se lo incubó por 1h en solución de bloqueo conteniendo el anticuerpo secundario biotinilado de interés (**Tabla 3**). Luego de esto, se realizaron nuevamente 3 lavados en PBS y se incubó el tejido con el complejo avidina-peroxidasa por una hora, Este complejo se unirá al anticuerpo secundario biotinilado a través de la unión entre las avidinas y la biotina. Finalmente, se revelará la reacción usando 3,3'-diaminobencidina comercial como sustrato obteniendo un precipitado marrón (o violeta en el caso que se use NiCl₂ durante la reacción).

Las *inmunotinciones cromogénicas dobles* se realizaron para evidencia la presencia de un antígeno nuclear y un antígeno citoplasmático. El procedimiento fue similar a realizar dos inmunotinciones simples consecutivas en donde en la primera parte se marcó el antígeno nuclear (c-Fos en este caso) y la solución de revelado contenía NiCl₂ para obtener la marca nuclear violeta. Luego de este revelado, se lavó el tejido con PBS y se lo incubó con el segundo

anticuerpo primario por 48hs a 4°C. Pasadas las 48hs se realizó el segundo revelado sin NiCl₂ obteniendo un precipitado citoplasmático de color marrón.

Anticuerpo 1 ^{ro}	Compañía, Catálogo	Especie hospedadora	Dilución usada
Anti-eGFP	Molecular Probes, A-6455	Conejo	1:5000 (c)
	Vector Lab., BA-0702	Cabra	1:1000 (f)
Anti-c-Fos	Santa Cruz, SC-7202	Conejo	1:20000 (c)
			1:2000 (f)
Anti-Orexina	Phoenix Pharm., H-003-30	Conejo	1:20000 (c)
			1:10000 (f)
Anti-TH	Santa Cruz, SC-14007	Conejo	1:20000 (c)
Anti-nNOS	Zymed Company, 61-7000	Conejo	1:3000 (f)
Anti-MCH	Phoenix Pharm., H-070-47	Conejo	1:2000 (f)
Anti-Parvalbúmina	Swant, PV27	Conejo	1:2000 (f)
Anti-Neurotensina	Immunostar, 20072	Conejo	1:1000 (f)
Anti-Somatostatina	Sigma Aldrich, MAB354	Rata	1:250 (f)
Anti-Oxitocina	Dr. Harold Gainer (NIH, Bethesda, USA)	Ratón	1:1000 (f)
Anti-TRH	Dr. Eduardo Nillni (Brown University, USA)	Conejo	1:1000 (f)
Anti-Galanina	Peninsula, T-4330	Conejo	1:1000 (f)

Tabla 2. Características generales de los anticuerpos primarios usados tanto para las inmunotinciones fluorescentes (f) como para las cromogénicas (c).

Anticuerpo 2 ^{rio}	Compañía, Catálogo	Especie hospedadora	Dilución usada
Anti-Conejo biotinilado	Vector Lab., BA-1000	Burro	1:3000
Anti-Rata conjugado a Alexa Fluor594	Invitrogen, A-21209	Burro	1:1000
Anti-Conejo conjugado a Alexa Fluor594	Invitrogen, A-21207	Burro	1:1000
Anti-Ratón conjugado a Alexa Fluor594	Molecular Probes, A21203	Burro	1:1000
Anti-Cabra conjugado a Alexa Fluor488	Life Technologies, A11055	Burro	1:1000

Tabla 3. Características generales de los anticuerpos secundarios usados tanto para las inmunotinciones fluorescentes como para las cromogénicas.

10. Montaje y procesamiento de las muestras

Luego de la inmunotinción cromogénica, las secciones coronales se montaron secuencialmente en portaobjetos positivados. Luego, estas secciones se deshidrataron en concentraciones crecientes etanol por 2 minutos cada una (70°, 96° y 100°) y posteriormente se incluyeron en xileno por 30 minutos. Finalmente, se colocó sobre las muestras un cubreobjetos con medio de montaje (Bálsamo de Canadá) para su posterior observación al microscopio óptico. En el caso de la inmunotinción fluorescente, a las muestras se las montó con una solución protectora ante el foto-blanqueamiento (DABCO + Hoescht) y se conservaron a 4°C con el mismo fin.

11. Obtención de imágenes

Para adquirir las imágenes de campo claro se empleó un microscopio Nikon Eclipse 50i el cual tiene acoplada una cámara digital Nikon DS-Ri1 y posee objetivos 10x/0,3 y 40x/0,95.

Las imágenes de fluorescencia se obtuvieron con un microscopio Zeiss Axio Observer D1 acoplado a un módulo de iluminación estructurada Apotome.2., una cámara monocromática Axiocam 506 y objetivos 10x/0,45 y 40x/0,95. Los filtros de emisión de fluorescencia usados fueron de 400-500 nm para el Alexa Fluor 488 (excitación a 450-490 nm), 665-715 nm para la F-

ghrelina o el F-LEAP2 (excitación 625-655 nm), 570-640 nm para el Alexa 594 o el tdTomato (excitación 533-558 nm) y 420-470 nm para el Hoechst (excitación 335-383 nm).

En todos los casos las imágenes fueron capturadas a baja y alta magnificación, en 16 bit y en formato tif. Todas las imágenes fueron analizadas mediante el software ImageJ.

12. Análisis neuroanatómico cuantitativo

Para los análisis neuroanatómicos cuantitativos se usó el Atlas del cerebro de ratón de Paxinos y Franklin [176] el cual se usó para marcar los límites neuroanatómicos de las regiones estudiadas e identificar la secuencia anteroposterior de las secciones de encéfalo.

12.1. Cuantificación de células inmunorreactivas

Las cuantificaciones se realizaron sobre células inmunorreactivas (IR) provenientes de las inmunotinciones y fueron de tres tipos:

-Cuantificación de células IR totales en toda la región estudiada: en ciertos casos se quiso conocer el número total de células en toda la región estudiada. Para esto se cuantificó el número de células IR en 1 de las 4 series de secciones coronales. A este valor se lo multiplicó por 4 para obtener el número total de células IR en todo el encéfalo y se corrigió por el factor de Abercrombie el cual se obtiene a partir de la fórmula $T/(T+h)$ en donde T es el espesor del corte y h es el diámetro medio de la célula o el núcleo. El diámetro se obtuvo a partir de promediar valores de al menos 30 células.

-Cuantificación de co-localizaciones entre dos marcas: en el caso de las inmunomarcaciones dobles, se calculó el número total de células IR para cada una de las marcas y el número total de células IR para ambas marcas (co-localizaciones). Luego se calculó porcentaje de co-localizaciones respecto al total de células IR para una de las marcas.

-Cuantificación de células IR promedio por sección coronal en la región estudiada: en este caso se cuantificó el número de células IR para la marca en la región de interés para todas las secciones, y luego se calculó el promedio de células IR por sección.

12.2. Cuantificación de intensidad de fluorescencia

En el caso del análisis de la intensidad de señal fluorescente en el encéfalo de los animales inyectados con F-ghrelina, se obtuvieron imágenes a color de 16-bit tanto del ARC como del AHL de animales inyectados con F-ghrelina o con solución vehículo, tanto por vía SC como ICV. Con el software ImageJ, se cuantificó la intensidad media de píxeles tanto en el ARC y como el AHL. A los valores obtenidos para el ARC y el AHL se los normalizó por la intensidad media obtenida en una región control sacada en la misma sección de tejido, y de esta manera se corrigió la contribución de la auto-fluorescencia del tejido.

13. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó con el software GraphPad Prism 9. En todos los casos se evaluó si los datos poseían distribución normal y varianzas homogéneas. La distribución normal de los datos se evaluó con el test de D'Agostino-Pearson y la homogeneidad de las varianzas se evaluó con el test de Barlett. En el caso de datos con distribuciones normales, se reportó la media \pm error estándar de la media (EEM) y se usó el test de ROUT (de *robust regression and outlier removal*) para la identificación de *outliers*. Para las pruebas de hipótesis, se realizó una prueba t de Student cuando se compararon dos grupos experimentales y un análisis de la varianza (ANOVA) cuando se compararon 3 o más grupos. Se usó el ANOVA de una vía cuando hubo una sola variable independiente (o factor) y el ANOVA de dos vías cuando hubo dos variables independientes. Como test *post hoc* de comparaciones múltiples del ANOVA se usaron el test de Tukey o el de Bonferroni.

En el caso de los datos con distribuciones no normales, se reportó la mediana \pm rango intercuartílico. Para las pruebas de hipótesis se realizó un test de Mann-Whitney cuando se compararon dos grupos y un test de Kruskal-Wallis cuando se compararon tres o más grupos.

Los valores de los parámetros, los grados de libertad y la significancia estadística de los test se indican en cada figura. Lo mismo se realizó con el valor de la interacción y cada uno de los factores en los ANOVA.

RESULTADOS

1. Caracterización neuroanatómica de las neuronas AHL^{GHSR}

1.1. Estudio de la distribución neuroanatómica de las células AHL^{GHSR}

En el laboratorio de Neurofisiología del IMBICE contamos con varias líneas de animales genéticamente modificados que nos permiten estudiar distintos aspectos de la fisiología de GHSR. Uno de estos modelos es el ratón GHSR^{eGFP} el cual expresa la eGFP bajo el control del promotor de GHSR (Mani et al., 2014). Este animal permite que las neuronas que expresan GHSR se vean de color verde en un microscopio de epifluorescencia. La eGFP se puede observar bajo fluorescencia directa o realizando una inmunotinción contra eGFP. El uso de una u otra estrategia no cambia el número de neuronas marcadas (Mani et al., 2014). El ratón GHSR^{eGFP} fue usado en diversos experimentos de esta tesis ya que nos permitió estudiar tanto aspectos morfológicos como funcionales de las neuronas que expresan GHSR del AHL.

Lo primero que se hizo fue estudiar la expresión de GHSR en el AHL a través de ISHH contra el ARNm de GHSR. Para esto se usaron muestras provenientes del laboratorio del Dr. Jeffrey Zigman, las cuales consisten en secciones de encéfalo que contienen el AHL de ratones WT, y que fueron sometidas a una ISHH contra el ARNm de GHSR y a una coloración de Nissl para identificar los núcleos celulares. En estas muestras se evidenció la presencia de marca positiva en el AHL (**Fig. 6A**). Por otro lado, se obtuvieron imágenes del *Allen Mouse Brain Atlas* correspondientes a una ISHH contra el ARNm de GHSR. Aquí también se evidenció la presencia del ARNm contra GHSR en el AHL (**Fig. 6B**).

Luego, se estudió la expresión de eGFP en los ratones GHSR^{eGFP}. Primero se evidenció la presencia de neuronas AHL^{eGFP} por fluorescencia directa (**Fig. 6C**) y una vez que se observó esto se validó que la expresión de eGFP en el AHL de los ratones GHSR^{eGFP} coincidiera con la expresión de GHSR. Para esto se analizaron muestras provenientes del laboratorio del Dr. Jeffrey Zigman las cuales corresponden a cortes de cerebro de ratones macho GHSR^{eGFP} que poseen una ISHH contra el ARNm de GHSR y una inmunotinción cromogénica contra eGFP (**Fig. 6D**). En estas muestras se cuantificó en el AHL el número de neuronas eGFP+ y el número de gránulos de plata depositados sobre cada célula eGFP+. Para conocer qué número de gránulos de plata depositados sobre una célula indican señal positiva, se calculó el número de gránulos de plata en el área correspondiente a una célula en una región control del encéfalo que no posee

expresión de GHSR. En esta región el número de gránulos de plata en el área correspondiente a una célula fue de 0,49. Así se tomó como criterio que tres veces por arriba de este valor corresponde al número de gránulos de plata en una célula positiva para GHSR. De esta manera, se encontró que el $78\pm 5\%$ de las neuronas eGFP+ del AHL resultaron positivas para la hibridación *in situ* contra GHSR indicando que un $\sim 22\%$ de las eGFP+ del AHL no expresan niveles de ARNm de GHSR en niveles detectables en nuestro ensayo.

Con el objetivo de conocer la morfología y distribución de estas neuronas a lo largo del núcleo, se realizaron inmunotinciones cromogénicas en cortes coronales de una serie de cerebros de animales GHSR^{eGFP}, y se cuantificó el número total de neuronas eGFP+ en el AHL. La mayoría de las células mostraron un soma ovoide de $10,0\pm 0,2\ \mu\text{m}$ con dos o tres ramificaciones de fibras, independiente del nivel rostro-caudal (**Fig. 6E**). Finalmente, el análisis cuantitativo reveló la presencia de 815 ± 177 células AHL^{eGFP} en todo el AHL de cada ratón (**Fig. 6F**).

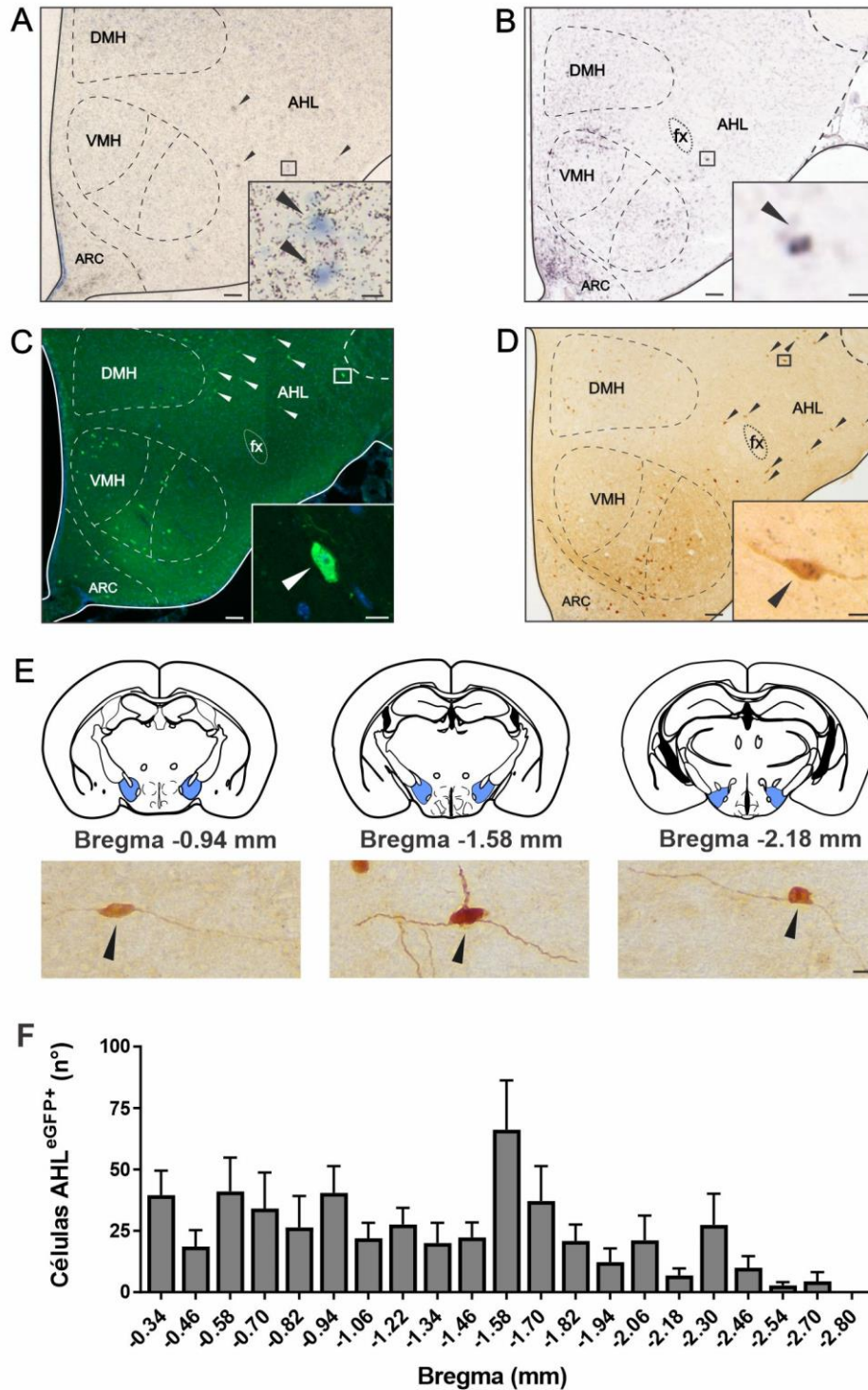


Figura 6. Análisis neuroanatómico de las neuronas AHL^{GHSR}. Los Paneles A-D representan secciones coronales del encéfalo que contienen un grupo de regiones hipotalámicas incluyendo el AHL. Cada panel muestra a células que expresan GHSR identificadas a través de diferentes técnicas: **A)** ISHH contra ARNm de GHSR y tinción de Nissl en ratones WT. **B)** ISHH contra ARNm de GHSR en ratones WT. Esta imagen fue obtenida del sitio web del *Allen Mouse Brain Atlas*. **C)** Inmunomarcación fluorescente contra eGFP en ratones GHSR^{eGFP}. **D)** ISHH contra ARNm de GHSR e inmunomarcación cromogénica contra eGFP en ratones GHSR^{eGFP}. El Panel E muestra tres imágenes representativas a alta magnificación de células AHL^{eGFP} pertenecientes a ratones GHSR^{eGFP} con dos o tres fibras ramificadas. El Panel F indica el análisis cuantitativo del número de células AHL^{eGFP} de ratones GHSR^{eGFP}. Los datos se muestran como la media ±

EEM. En todos los casos, las cuñas en las imágenes indican células AHL^{GHSR} detectadas por cada metodología. Los insertos muestran imágenes de alta magnificación correspondientes a las áreas indicadas en las imágenes de baja magnificación. Barras de escala: 100 μm en las imágenes de baja magnificación y 10 μm en las imágenes de alta magnificación.

1.2. Estudio del agrupamiento de las neuronas AHL^{GHSR}

Por otro lado, se estudió si existía algún tipo de agrupamiento espacial de las neuronas AHL^{eGFP} . Esto se realizó dado que algunas poblaciones neuronales del AHL poseen diferentes funciones y a su vez se encuentran espacialmente separadas entre sí [181, 182]. Para esto, se usó el algoritmo DBSCAN (**Fig. 7A-D**). Con dicho análisis no se encontraron evidencias de que las neuronas AHL^{eGFP} formen grupos dentro del AHL.

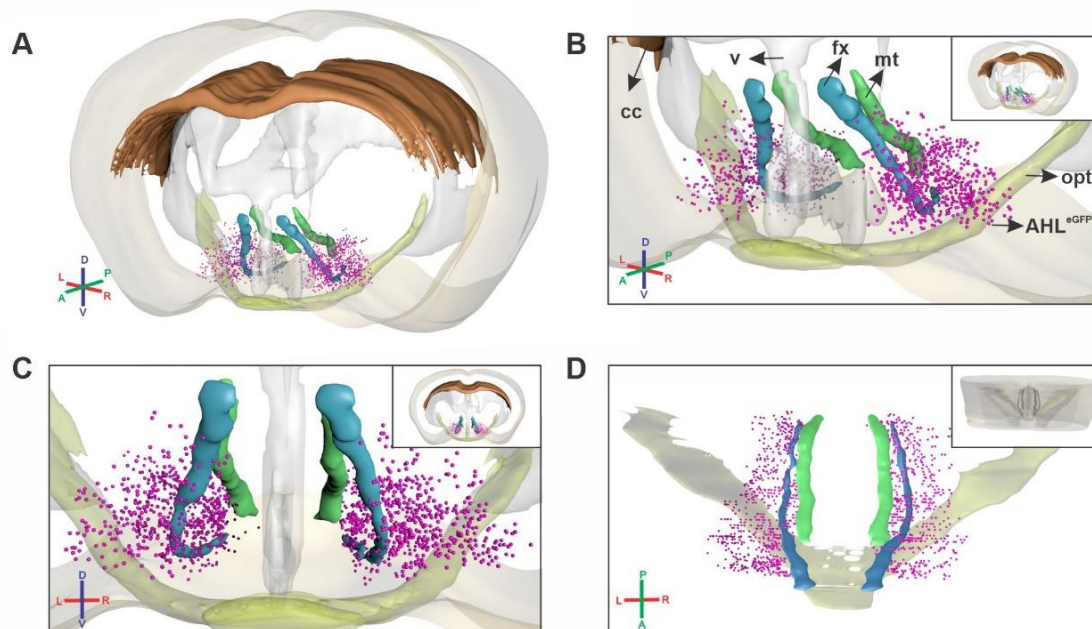


Figura 7. Distribución tridimensional de las neuronas que expresan GHSR del AHL. El **Panel A** muestra una representación tridimensional de la posición de todas las neuronas AHL^{eGFP} de un animal $GHSR^{eGFP}$ (indicadas como esferas violetas). Los **Paneles B, C y D** representan vistas de dicha representación desde diferentes ángulos. Los insertos en cada panel indican representaciones contextuales de menor magnificación de las imágenes principales. El **Panel B** muestra una vista inclinada frontal de la representación tridimensional. Las flechas indican cc: cuerpo calloso, fx: fórnix, mt: tractos mamilotalámicos, v: sistema ventricular, opt: tractos ópticos y AHL^{eGFP} : neuronas que expresan GHSR en el AHL. El **Panel C** muestra una vista frontal y el **Panel D** una vista en planta de la representación tridimensional.

Luego, se comparó cualitativamente si la distribución espacial entre las AHL^{eGFP} estaba conservada entre ambos animales estudiados. Para esto, se corregistraron las neuronas AHL^{eGFP}

de los dos animales estudiados en un mismo sistema de coordenadas correspondiente al del *Allen Mouse Brain Common Coordinate Framework* (CCF). Se observó que ambos sets de datos fueron congruentes tanto en el plano XY, XZ y YZ indicando que no hay diferencias en la distribución de neuronas AHL^{eGFP} entre ambos animales (**Fig. 8**).

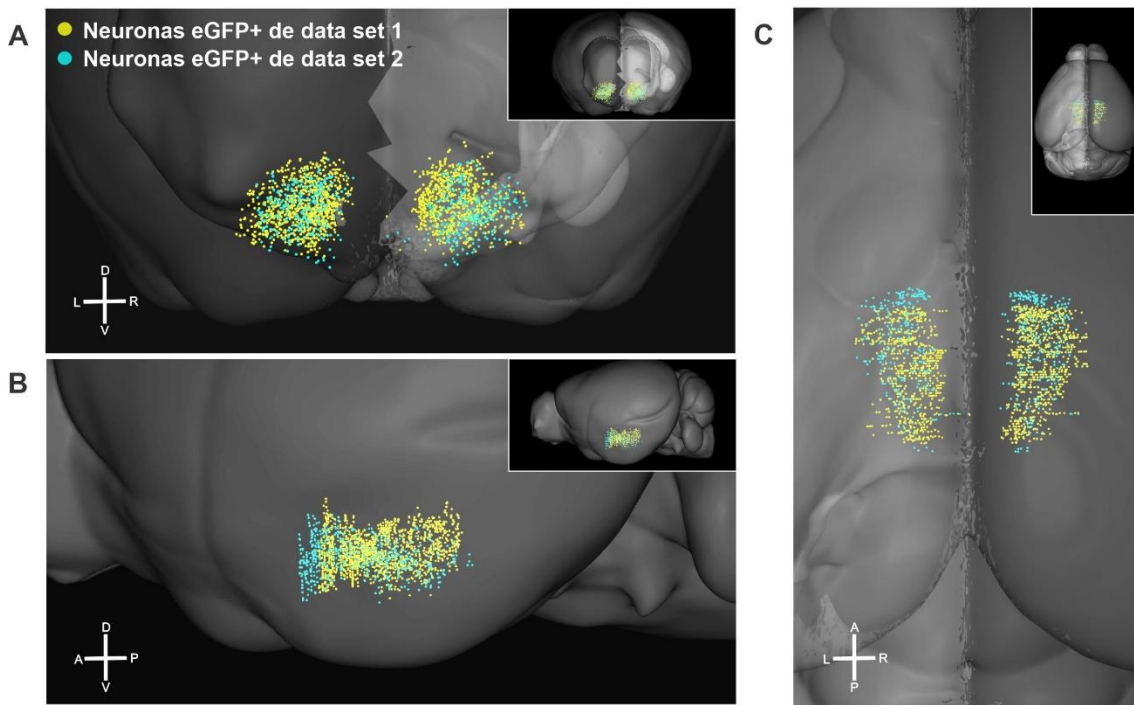


Figura 8. Comparación de la distribución tridimensional de las neuronas que expresan GHSR del AHL en dos animales GHSR^{eGFP} distintos. Se mapeó la distribución tridimensional de las neuronas que expresan el GHSR en el AHL de dos animales GHSR^{eGFP} distintos usando como coordenadas de referencia un descriptor de la superficie del encéfalo perteneciente al Allen Brain Atlas. Las esferas azules y amarillas representan las neuronas que expresan GHSR del AHL, perteneciendo cada color a neuronas de animales distintos. Los insertos en cada panel indican representaciones contextuales de menor magnificación de las imágenes principales. El **Panel A** muestra una vista frontal, el **Panel B** una lateral y el **Panel C** una vista en planta de la representación tridimensional. Las coordenadas espaciales se indican como L: izquierda, R: derecha, A: anterior, P: posterior, D: dorsal, V: ventral.

Estos resultados confirman la presencia de neuronas AHL^{GHSR}, validan el uso del animal GHSR^{eGFP} para estudiar las neuronas AHL^{GHSR} e indican que estas se ubican de manera uniforme en el AHL sin constituir subgrupos.

1.3. Caracterización fenotípica de las neuronas AHL^{GHSR}

Como fue comentado en la Introducción de esta Tesis, el AHL posee una gran diversidad de tipos celulares según los neurotransmisores, neuropéptidos y otros marcadores moleculares que estas células expresan. Con el objetivo de conocer cuál de estos tipos neuronales expresa GHSR, se anestesiaron y perfundieron ratones GHSR^{eGFP}, a los cuales luego se les extrajeron los cerebros, estos se congelaron y posteriormente cortaron en un criostato en cuatro series secuenciales. Luego, sobre distintas series, se realizaron inmunotinciones fluorescentes dobles contra eGFP y contra distintos marcadores neuronales del AHL.

Los marcadores usados fueron: orexina, MCH, somatostatina, TRH, parvalbúmina, galanina, oxitocina, neurotensina y la enzima óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS). Se observó que una subpoblación de las neuronas AHL^{eGFP} son positivas para neurotensina (2 ± 1 % de las neuronas eGFP+) (**Fig. 9A**) y para nNOS (8 ± 1 % de las neuronas eGFP+) (**Fig. 9B**). Las neuronas AHL^{eGFP} positivas para nNOS se distribuyeron un $79,7\pm 11,9$ % en el AHL tuberal y un $20,3\pm 11,9$ % en el AHL posterior, mientras que no se encontraron en el AHL anterior. Por otro lado, todas las neuronas AHL^{eGFP} positivas para neurotensina se ubicaron en el AHL tuberal.

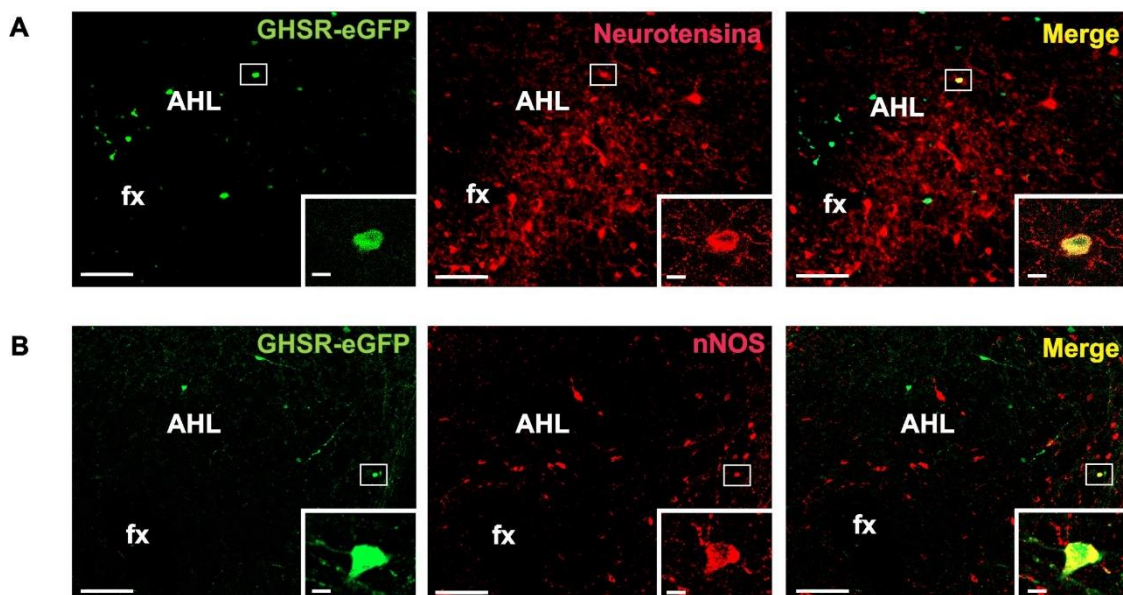


Figura 9. Una subpoblación de las neuronas que expresan GHSR en el AHL son neurotensina+ y nNOS+. Cada panel indica la marcación fluorescente doble contra eGFP y contra distintos neuropéptidos en el AHL de animales GHSR^{eGFP}. La figura izquierda en cada panel es una imagen representativa del AHL marcado con un anticuerpo anti-eGFP en verde. La figura central en cada panel es una imagen representativa del

AHL marcado con neurotensina (**Panel A**) o nNOS (**Panel B**). La figura derecha en cada panel es una imagen representativa del AHL mostrando el merge entre ambas señales. En los insertos se muestran imágenes de alta magnificación correspondientes a las regiones marcadas con un rectángulo en las imágenes de baja magnificación. El fórnix (fx) se indica en todos los paneles a modo de referencia neuroanatómica. Barras de escala: 100 μm en las imágenes de baja magnificación y 10 μm en las imágenes de alta magnificación.

A diferencia de neurotensina y nNOS, no se encontraron colocalizaciones entre eGFP y el resto de los marcadores estudiados por inmunotinción fluorescente, indicando que las neuronas que expresan GHSR del AHL no expresan ninguno de estos neuropéptidos (**Fig. 10**).

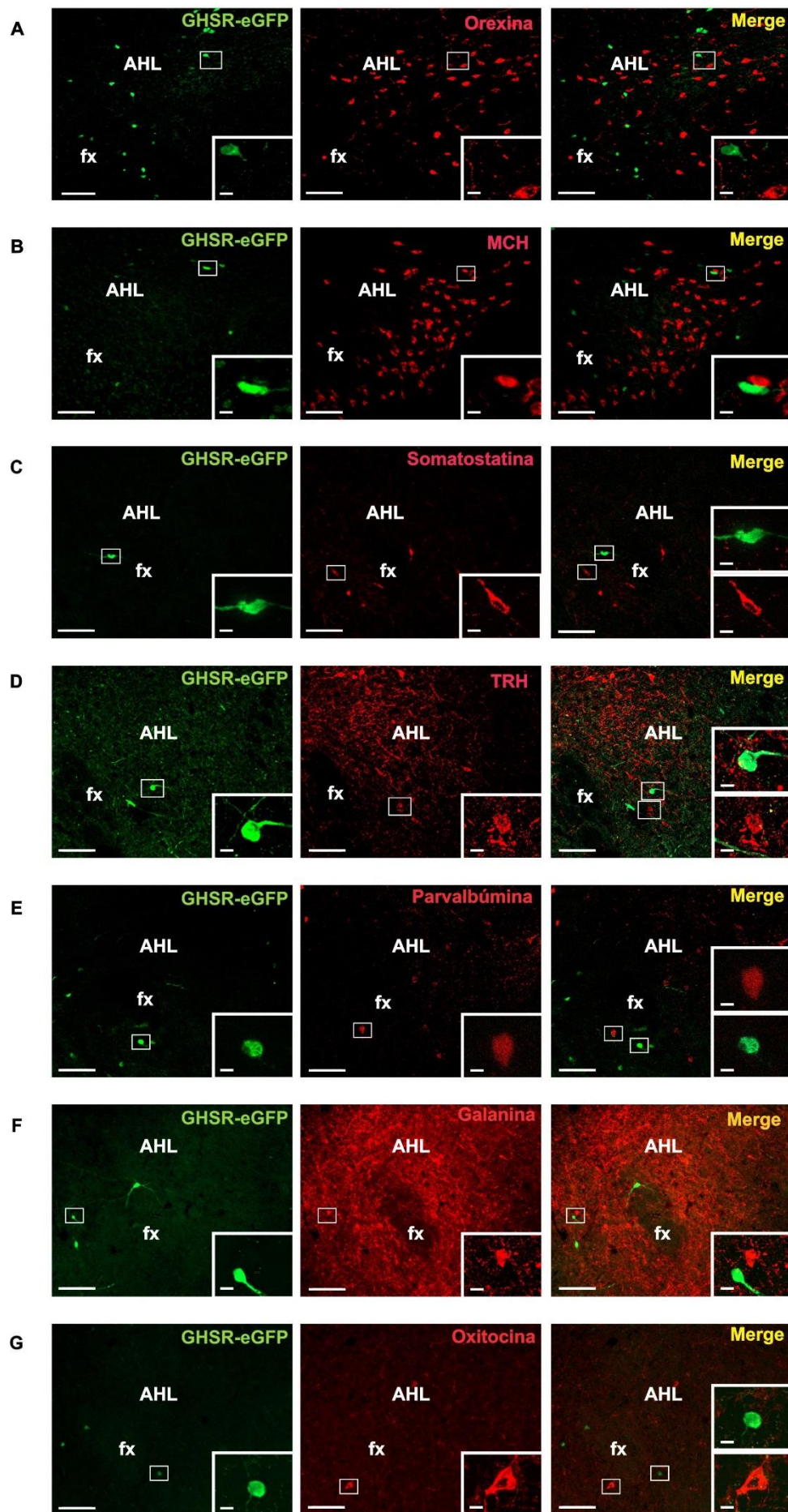


Figura 10. Caracterización fenotípica de las neuronas que expresan AHL^{GHSR}. Cada panel indica la marcación fluorescente doble contra eGFP y contra distintos neuropéptidos en el AHL de animales GHSR^{eGFP}. La figura izquierda en cada panel es una imagen representativa del AHL marcado con un anticuerpo anti-eGFP en verde. La figura central en cada panel es una imagen representativa del AHL marcado con distintos anticuerpos en rojo. La figura derecha en cada panel es una imagen representativa del AHL mostrando el merge entre ambas señales. En los insertos se muestran imágenes de alta magnificación correspondientes a las regiones marcadas con un rectángulo en las imágenes de baja magnificación. El fórnix (fx) se indica en todos los paneles a modo de referencia neuroanatómica. Barras de escala: 100 μ m en las imágenes de baja magnificación y 10 μ m en las imágenes de alta magnificación.

Por otro lado, con el objetivo de conocer si las neuronas AHL^{eGFP} son GABAérgicas se cruzó al ratón GHSR^{eGFP} con el Gad2^{cre/+}/Rosa26^{tdTomato} el cuál expresa la proteína fluorescente tdTomato bajo el control del promotor de Gad2, un marcador de una subpoblación de neuronas gabaérgicas. Los animales obtenidos de esta cruce son GHSR^{eGFP}/Gad2^{cre/+}/Rosa26^{tdTomato}, los cuales expresan eGFP en las neuronas positivas para GHSR y tdTomato en las neuronas positivas para Gad2. Los animales de este genotipo fueron anestesiados y perfundidos, se extrajo su encéfalo, se congeló y cortó en cuatro series coronales. En una de dichas series se realizó una inmunotinción fluorescente contra eGFP. Los cortes se montaron en portaobjetos y se observaron bajo un microscopio de fluorescencia. En este caso, tdTomato se visualizó por fluorescencia directa sin necesidad de inmunotinción. Finalmente, no se observaron colocalizaciones entre las neuronas que expresan Gad2 y las AHL^{eGFP} (**Figura 11**).

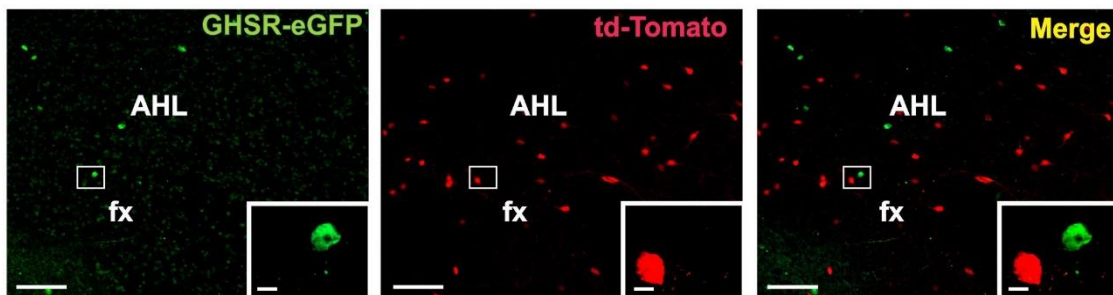


Figura 11. Las neuronas Gad2 del AHL de ratones GHSR^{eGFP}/Gad2^{cre/+}/Rosa26^{tdTomato} no expresan GHSR. La figura muestra una imagen representativa de un corte coronal del AHL de un animal GHSR^{eGFP}/Gad2^{cre/+}/Rosa26^{tdTomato} sometido a una inmunotinción fluorescente contra eGFP. La imagen de la izquierda muestra la señal correspondiente a la marcación contra eGFP en el AHL. La figura central muestra la señal correspondiente a tdTomato en el AHL. La figura de la derecha muestra la señal correspondiente al merge entre ambas señales. El fórnix (fx) se indica a modo de referencia neuroanatómica. Barras de escala: 100 μ m en las imágenes de baja magnificación y 10 μ m en las imágenes de alta magnificación.

Estos resultados indican que una fracción de las AHL^{eGFP} del GHSR^{eGFP} son neurotensina+ y otra fracción son nNOS+. A su vez las AHL^{eGFP} no resultaron positivas para otro conjunto de marcadores dentro del AHL.

2. Respuesta de las neuronas AHL^{GHSR} a ghrelina

2.1. Caracterización funcional de las neuronas AHL^{GHSR}

2.1.1. Estudio de la respuesta de las neuronas AHL^{GHSR} a la administración local de ghrelina

Luego de caracterizar anatómicamente a las células AHL^{GHSR}, decidimos estudiar las implicancias fisiológicas de la acción de la ghrelina en el AHL. Para esto se inyectó solución vehículo o ghrelina (30 pmol ghrelina/lado) de manera bilateral en el AHL de animales WT (**Fig. 12A**) y se evaluó el consumo de alimento durante 120 minutos post-inyección. Los animales de ambos grupos comenzaron el experimento con pesos corporales similares (23,70±1,27 gr. vehículo intra-AHL vs. 24,65±1,09 gr. ghrelina intra-AHL) (**Fig. 12B**). Se observó que la ghrelina intra-AHL indujo un pico de consumo de alimento a los 30 minutos post-inyección respecto al grupo vehículo (201,00±43,05 mg. ghrelina intra-AHL vs. 19,60±12,47 mg. vehículo intra-AHL) (**Fig. 12C**). Dicho consumo disminuyó progresivamente a los 60 y 120 minutos post-inyección, siendo las diferencias con el grupo control no significativas a estos tiempos. La sumatoria del consumo total de alimento durante los 120 minutos post-inyección indicó que la ghrelina indujo significativamente el consumo de alimento durante todo este tiempo respecto al grupo control (318,7±87,4 mg. ghrelina intra-AHL vs. 59,4±32,0 mg. vehículo intra-AHL) (**Fig. 12D**).

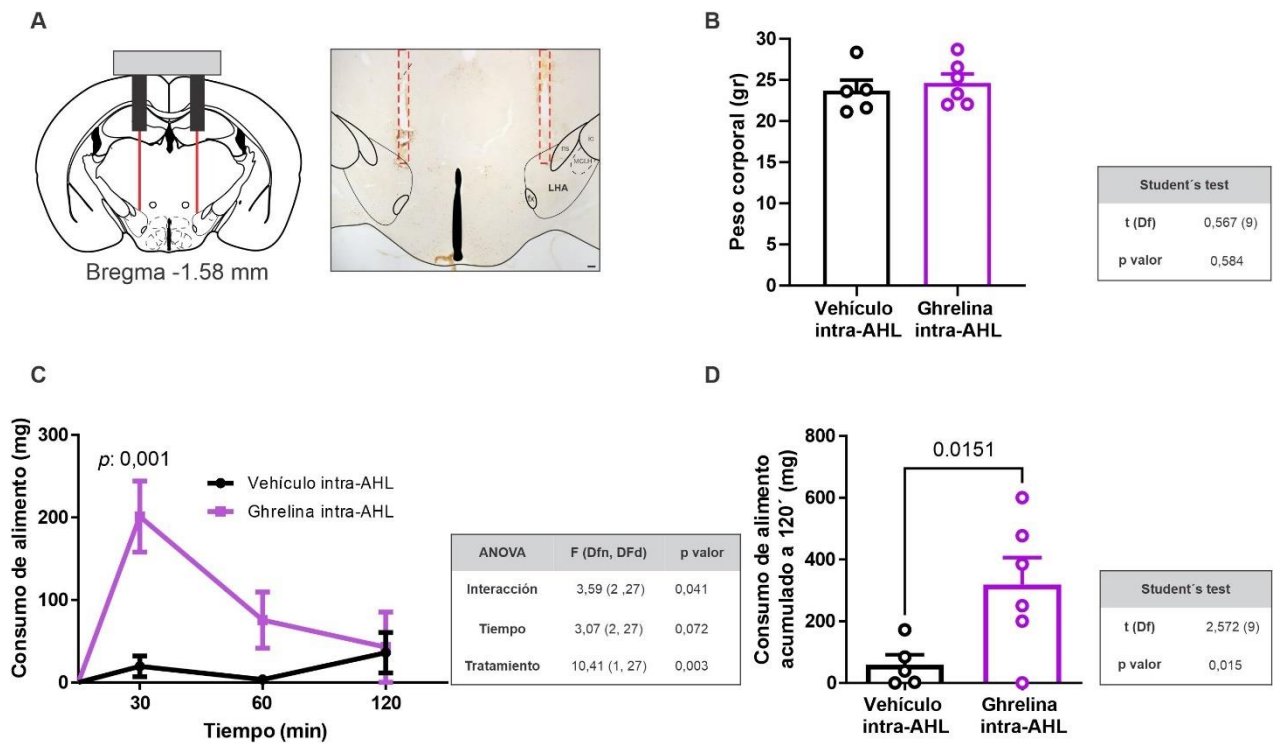


Figura 12. La administración de ghrelina en el AHL de animales alimentados *ad libitum* induce el consumo de alimento. El Panel A muestra una imagen representativa de un corte de encéfalo donde se indica con líneas rojas el trazo realizado por los inyectores hasta llegar al AHL. El Panel B indica los pesos corporales de los animales inyectados con solución vehículo (n=5) o con ghrelina (n=6) en el AHL. El Panel C indica el consumo de alimento a los 30, 60 y 120 minutos post-inyección de solución vehículo o ghrelina para cada grupo experimental. El test estadístico realizado fue un ANOVA de dos factores seguido por el post-test de Bonferroni. El recuadro ubicado abajo del gráfico indica el valor del F, los grados de libertad y el valor de p correspondientes a cada factor (tiempo y tratamientos) como también para la interacción entre ellos (tiempo x tratamiento). Sobre el gráfico de curvas se indica el valor de p del post-test correspondiente a la comparación entre ghrelina intra-AHL vs. vehículo intra-AHL. El Panel D indica el consumo de alimento acumulado durante los 120 minutos para cada grupo experimental. Tanto para el gráfico mostrado en el Panel A como para el del Panel C se realizó un test de Student no pareado. El recuadro ubicado debajo de ambos gráficos indica el valor de t, el grado de libertad y el valor de p correspondientes al test. Sobre el gráfico de barras del Panel C se indica el valor de p del post-test correspondiente a la comparación entre vehículo y ghrelina intra-AHL. Todos los valores se expresan como media \pm EEM.

Se ha reportado que la activación del AHL estimula diversas conductas entre las que se incluyen un aumento de la locomoción general, de conductas apetitivas y consumatorias, entre otras. Dichos comportamientos también han sido atribuidos a la acción de ghrelina tanto en el hipotálamo como sobre la vía mesolímbica. Debido a esto, se evaluó si la ghrelina administrada en el AHL era suficiente para inducir alguna de las conductas ya reportadas. Para esto se inyectó solución vehículo o ghrelina (30 pmol ghrelina/lado) de manera bilateral en el AHL de animales WT y se registraron sus conductas en videos que luego fueron analizados digitalmente. Los animales de ambos grupos comenzaron el experimento con pesos corporales similares ($25,95 \pm$

1,35 gr. vehículo intra-AHL vs. $24,73 \pm 0,99$ gr. ghrelina intra-AHL) (**Fig. 13A**). Se observó que la ghrelina intra-AHL indujo un aumento en la actividad locomotora durante el segundo (234 ± 42 cm. vehículo intra-AHL vs. 426 ± 78 cm. ghrelina intra-AHL) y el tercer (236 ± 34 cm. vehículo intra-AHL vs. 423 ± 72 cm. ghrelina intra-AHL) minuto post-administración en comparación con el grupo control (**Fig. 13B**). La sumatoria de la actividad locomotora total durante la sesión no mostró diferencias entre los grupos experimentales (4790 ± 343 cm. vehículo intra-AHL vs 5871 ± 731 cm. ghrelina intra-AHL) (**Fig. 13C**).

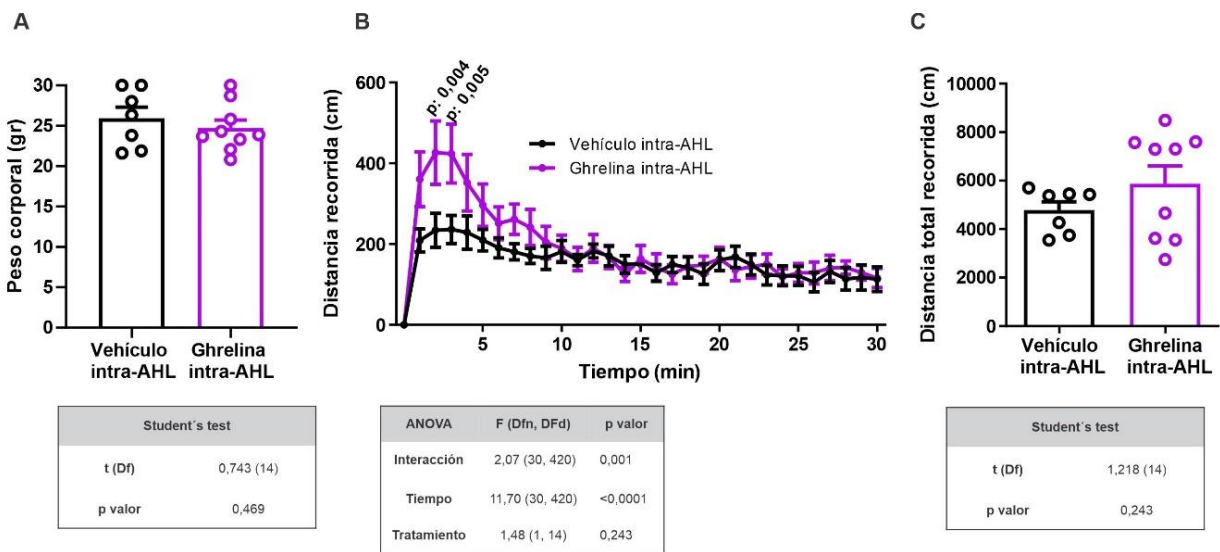


Figura 13. La ghrelina administrada en el AHL induce aumentos en la locomoción. El **Panel A** indica los pesos corporales de los animales inyectados con solución vehículo (n=7) o con ghrelina (n=9) en el AHL. El **Panel B** indica la distancia recorrida por los animales de ambos grupos experimentales a lo largo de 30 minutos post-inyección. El test estadístico realizado fue un ANOVA de dos factores seguido por el post-test de Bonferroni. El recuadro ubicado abajo del gráfico indica el valor del F, los grados de libertad y el valor de p correspondientes a cada factor (tiempo y tratamientos) como también para la interacción entre ellos (tiempo x tratamiento). Sobre el gráfico de curvas se indica el valor de p del post-test correspondiente a la comparación entre ghrelina intra-AHL vs. vehículo intra-AHL. El **Panel C** indica la distancia recorrida acumulada a los 30 minutos post-inyección de los animales de ambos grupos experimentales. Tanto para el gráfico mostrado en el Panel A como para el del Panel C se realizó un test de Student no pareado. El recuadro ubicado debajo de ambos gráficos indica el valor de t, el grado de libertad y el valor de p correspondientes al test. Todos los valores se expresan como media \pm EEM.

Además de la actividad locomotora, se cuantificó el tiempo que los animales excavaron en la viruta durante los 30 minutos post-inyección de vehículo o ghrelina intra-AHL. Esta conducta se evaluó para estudiar la magnitud de un comportamiento exploratorio en estos animales. La cuantificación indicó que no se encontraron diferencias significativas en el tiempo que los animales de ambos grupos experimentales excavaron en la viruta ($2,8 \pm 1,0$ vehículo intra-AHL vs.

5,7±1,5 ghrelina intra-AHL minutos) (**Fig. 14B**) como tampoco en la cinética de esta conducta a lo largo de los 30 minutos de sesión (**Fig. 14A**). En el mismo sentido, tampoco se encontraron diferencias en el tiempo que los animales realizaron el resto de los comportamientos registrados durante la exploración conductual, a saber: el tiempo de desplazamiento (11,61±0,90 vs. 13,50±1,08 minutos), de exploración vertical (8,43±1,76 vs. 6,47±0,95 minutos), de acicalamiento (4,77±1,33 vs. 2,18±0,71 minutos), de saltos (0,49±0,31 vs. 0,27±0,20 minutos) o de posición de alerta (2,43±1,57 vs. 2,57±0,79 minutos) entre los animales inyectados con vehículo intra-AHL y ghrelina intra-AHL respectivamente. En el mismo sentido, tampoco se encontraron diferencias significativas en el consumo de O₂ luego de la inyección de ghrelina o vehículo intra-AHL para ningún tiempo post-inyección (**Fig. 14C**).

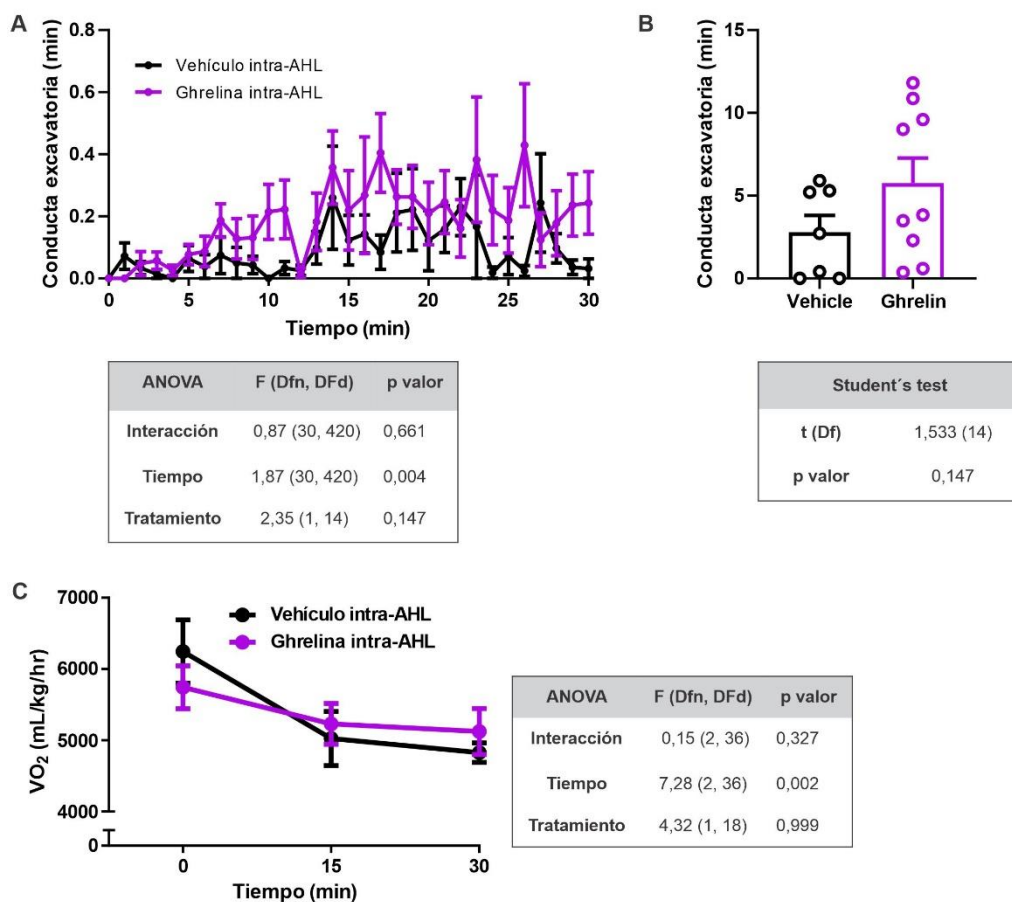


Figura 14. La administración de ghrelina en el AHL no induce cambios en las conductas de excavación ni en el consumo de oxígeno. El Panel A indica el tiempo que los animales inyectados con vehículo intra-AHL (n=7) o ghrelina intra-AHL (n=9) realizaron conductas asociadas a la búsqueda de alimento a largo de 30 minutos post-inyección. El test estadístico realizado fue un ANOVA de dos factores seguido por el post-

test de Bonferroni. El recuadro ubicado abajo del gráfico indica el valor del F , los grados de libertad y el valor de p correspondientes a cada factor (tiempo y tratamientos) como también para la interacción entre ellos (tiempo x tratamiento). El **Panel B** indica el tiempo acumulado de conductas de excavación. El test estadístico realizado fue un test de Student no pareado. El recuadro ubicado debajo de ambos gráficos indica el valor de t , el grado de libertad y el valor de p correspondientes al test. El **Panel C** indica el análisis cuantitativo del consumo de oxígeno a los 15 y 3^o minutos post-inyección de solución vehículo o ghrelina intra-AHL. El test estadístico realizado fue un ANOVA de dos factores seguido por el post-test de Bonferroni. El recuadro ubicado a la derecha del gráfico indica el valor del F , los grados de libertad y el valor de p correspondientes a cada factor (tiempo y tratamientos) como también para la interacción entre ellos (tiempo x tratamiento). Todos los valores se expresan como media \pm EEM.

Estos resultados indican que la administración de ghrelina en el AHL induce aumentos en el consumo de alimento y la locomoción general en ratones WT, pero no en otras conductas exploratorias ni en el consumo de O₂.

2.1.2. Circuito neuronal activado por la acción de ghrelina en el AHL

Posteriormente se decidió estudiar que regiones del encéfalo respondían a la administración de ghrelina intra-AHL. Para esto, se obtuvieron los encéfalos de los animales inyectados con vehículo o ghrelina intra-AHL, y se procesaron para inmunomarcación doble contra c-Fos y orexina o c-Fos y TH. Estas últimas dos marcaciones se realizaron con el objetivo de estudiar si existían aumentos de cFos en las neuronas orexina+ del AHL y/o en las neuronas TH+ de la vía mesolímbica, las cuales actúan como marcadoras de las neuronas dopaminérgicas pertenecientes al VTA. La cuantificación indicó que la ghrelina administrada intra-AHL indujo un aumento en la proporción de neuronas de orexina cFos+ en el AHL ($0,9 \pm 0,2$ % vehículo intra-AHL vs. $4,6 \pm 1,4$ % ghrelina intra-AHL) aunque no cambió el número de células cFos+ en dicha región ($57,5 \pm 5,6$ células/sección vehículo intra-AHL vs. $62,4 \pm 3,9$ células/sección ghrelina intra-AHL) (**Fig. 15**).

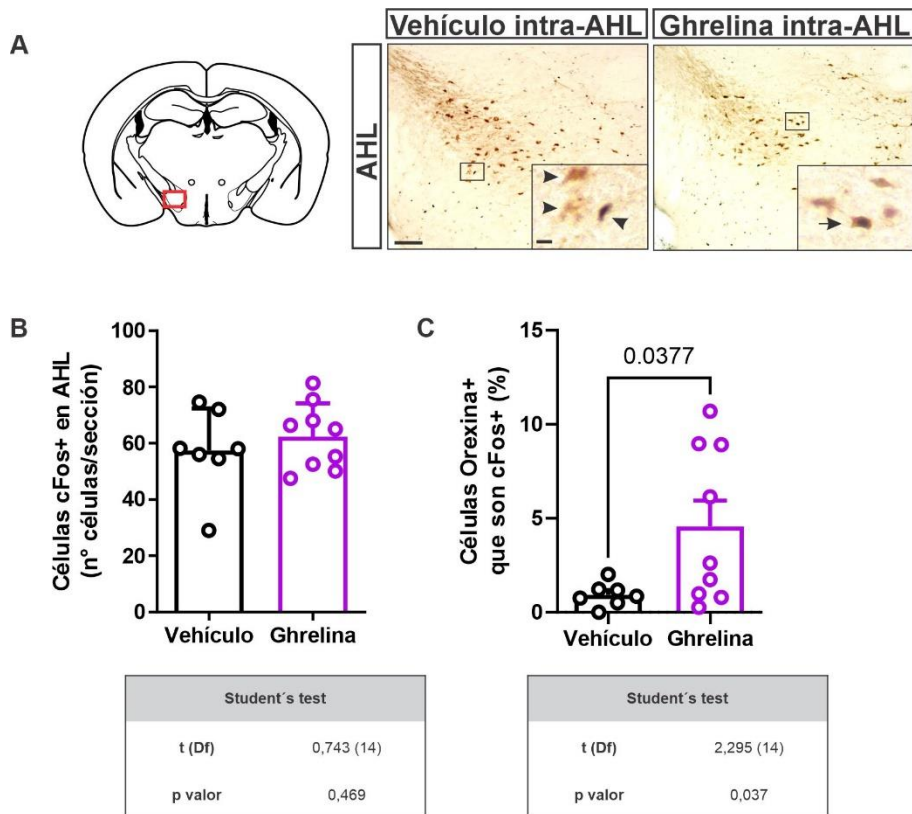


Figura 15. La administración de ghrelina en el AHL induce aumentos en porcentaje de células cFos+/orexina+ en el AHL. El **Panel A** muestra una imagen representativa de una sección coronal de encéfalo que contiene al AHL correspondiente a animales inyectados con vehículo (n=7) o con ghrelina (n=9) intra-AHL. Las imágenes a alta magnificación corresponden a los recuadros indicados en la imagen de baja magnificación. En las primeras se indican con cabezas de flecha células cFos+ (marcas negras) o células orexina+ (marcas marrones) y con flechas enteras células cFos+/orexina+. Barras de escala: 100 μ m en las imágenes de baja magnificación y 10 μ m en las imágenes de alta magnificación. El **Panel B** indica la cuantificación del número de células cFos+ por sección coronal en el AHL de animales pertenecientes a ambos grupos experimentales. El **Panel C** indica la cuantificación del porcentaje de células cFos+/orexina+ en el AHL de animales pertenecientes a ambos grupos experimentales. Tanto para el Panel B como para el C el test estadístico realizado fue un test de Student no pareado. El recuadro ubicado debajo de ambos gráficos indica el valor de *t*, el grado de libertad y el valor de *p* correspondientes al test. Sobre el gráfico de barras del Panel C se indica el valor de *p* del post-test correspondiente a la comparación entre grupos. Todos los valores se expresan como media \pm EEM.

Debido a que el AHL envía y recibe proyecciones de diversas regiones del encéfalo, se estudió si la administración de ghrelina en el AHL inducía cambios en el número de neuronas cFos+ en dichas zonas, muchas de las cuales están involucradas en el control del consumo de alimento [183]. Las regiones analizadas fueron el núcleo accumbens (Acb), el núcleo del lecho en la estría terminal (BNST), el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN), la habénula lateral (LHb), el núcleo paraventricular del tálamo (PVT), el núcleo arcuato (ARC), la amígdala central (CeA) y el área ventral tegmental (VTA). El análisis cuantitativo indicó que la ghrelina indujo un aumento

significativo de células cFos+ en el ARC ($25,4 \pm 5,0$ células/lado vehículo intra-AHL vs. $54,9 \pm 11,2$ células/lado ghrelina intra-AHL) pero no en las demás regiones del encéfalo analizadas (**Fig. 16**).

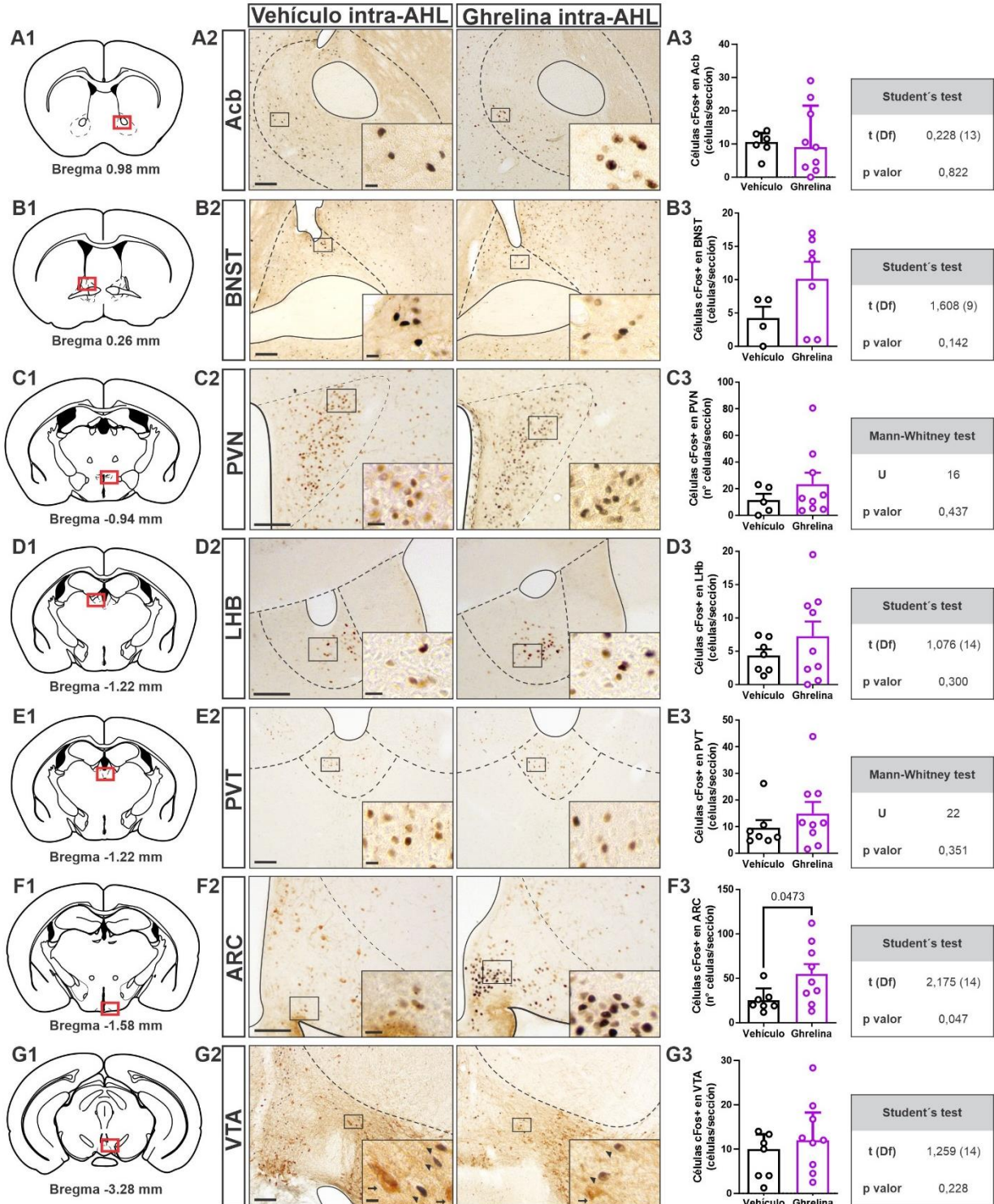


Figura 16. La administración de ghrelina en el AHL induce aumentos de células cFos+ en el ARC. Los paneles ubicados a la izquierda (**A1-G1**) indican esquemas representativos de las distintas regiones del encéfalo obtenidas del Atlas del cerebro de ratón de Paxinos y Franklin (2001). Los paneles centrales (**A2-G2**) muestran imágenes representativas de cortes coronales de distintas regiones del encéfalo con inmunohistoquímica cromogénica contra cFos, TH y orexina, de animales inyectados con vehículo o con ghrelina intra-AHL. Las imágenes a alta magnificación corresponden a los recuadros indicados en la imagen de baja magnificación. Barras de escala: 100 μm en las imágenes de baja magnificación y 10 μm en las imágenes de alta magnificación. Los paneles ubicados a la derecha (**A3-G3**) indican las cuantificaciones del número de células cFos+ por sección para ambos grupos experimentales. El test estadístico realizado fue un test de Student no pareado o un test de Mann-Whitney según corresponda. Los recuadros ubicados en la extrema derecha indican el valor de t (o de U), el grado de libertad y el valor de p correspondientes al test realizado. Los valores en los gráficos de barras se expresan como media \pm EEM (A3, B3, D3, F3 y G3) o mediana \pm rango intercuartílico (C3 y E3).

Estos resultados indican que la administración de ghrelina en el AHL aumenta el número de células c-Fos+ en el ARC y de la proporción de células de orexina c-Fos+ en el AHL.

2.1.3. Estudio de la respuesta de las neuronas AHL^{GHSR} a la administración local de ghrelina en animales con el ARC lesionado

Debido a que la ghrelina administrada intra-AHL induce un aumento de células c-Fos+ en el ARC, se decidió estudiar el rol de este núcleo en mediar el consumo de alimento inducido por la administración de ghrelina en el AHL. Para esto se realizaron experimentos en donde se inyectó solución vehículo o ghrelina en el AHL de animales naïve o con el ARC lesionado. Dicha lesión se realizó a través de la administración de MSG vía subcutánea en animales WT al 4to día de vida. Estos animales fueron incorporados al experimento entre las 8 y 9 semanas de vida. En el día experimental, no se encontraron diferencias entre los pesos ($22,2 \pm 0,6$ gr ARC-intacto vs. $21,0 \pm 0,5$ gr ARC-lesionado) o el consumo de alimento nocturno ($3,4 \pm 0,1$ gr ARC-intacto vs. $3,7 \pm 0,1$ gr ARC-lesionado) entre los animales con el ARC-intacto y con el ARC-lesionado (**Fig. 17A-B**). Finalmente, el experimento consistió en administrar ghrelina (30 pmol/lado) o solución vehículo intra-AHL en animales con el ARC-intacto y en animales con ARC-lesionado. Se observó que, en los animales con el ARC-intacto, la ghrelina intra-AHL indujo el consumo de alimento respecto a los animales inyectados con vehículo ($242,2 \pm 54,1$ gr ghrelina intra-AHL vs. $17,2 \pm 7,4$ gr vehículo intra-AHL) mientras que dicho aumento no se produjo en los animales con el ARC-lesionado ($79,0 \pm 21,0$ gr ghrelina intra-AHL vs. $45,4 \pm 22,0$ gr vehículo intra-AHL) (**Fig. 17C**).

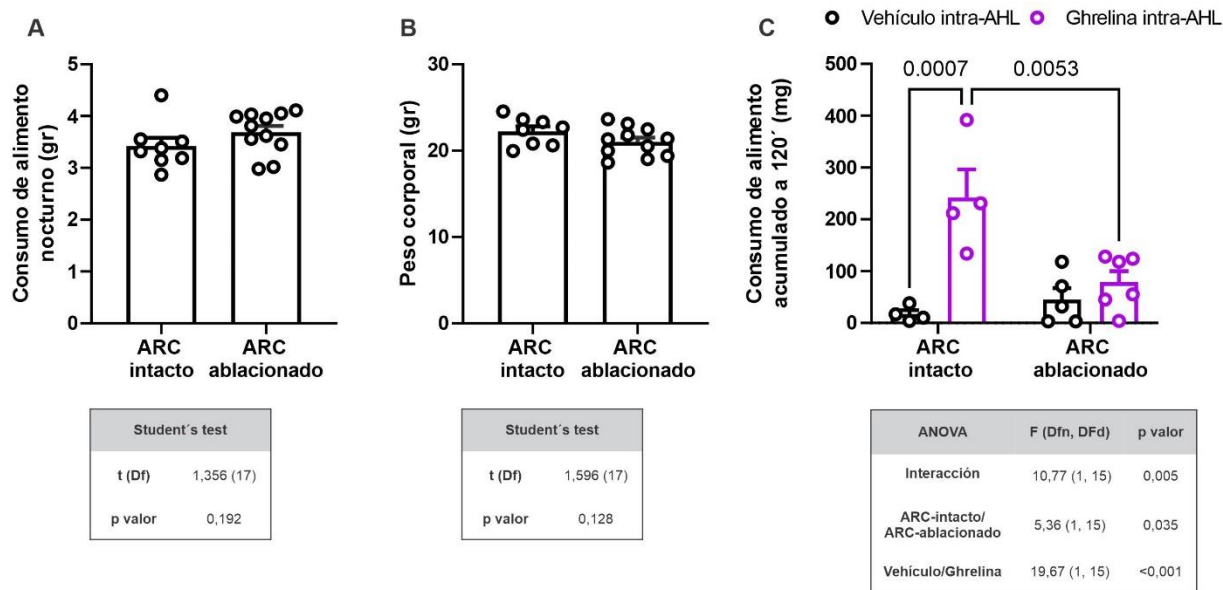


Figura 17. La integridad del ARC es necesaria para el aumento en el consumo de alimento inducido por ghrelina administrada intra-AHL. Los Paneles A y B indican el consumo de alimento nocturno y el peso corporal respectivamente para los animales con ARC-intacto y con ARC-lesionado. Para ambos paneles el test estadístico realizado fue un test de Student no pareado. El recuadro ubicado debajo de ambos gráficos de barras indica el valor de *t*, el grado de libertad y el valor de *p* correspondientes al test. El Panel C indica el consumo de alimento acumulado durante los 120 minutos para los animales con ARC-intacto con vehículo (*n*=4) o con ghrelina (*n*=4) y con ARC-lesionado con vehículo (*n*=5) o con ghrelina (*n*=6). El test estadístico realizado fue un ANOVA de dos factores seguido por el post-test de Bonferroni. El recuadro ubicado abajo del gráfico indica el valor del *F*, los grados de libertad y el valor de *p* correspondientes a cada factor (ARC-intacto/ARC-lesionado y vehículo/ghrelina) como también para la interacción entre ellos. Sobre el gráfico de barras del Panel C se indican los valores de *p* del post-test correspondiente a las comparaciones entre grupos que resultaron significativos. Todos los valores se expresan como la media ± EEM.

2.1.4. Estudio del rol de las neuronas de ARC^{NPY} en los efectos causados por la acción de ghrelina en el AHL

Estudios previos indican que el efecto orexigénico resultante de activar a las neuronas de orexina del AHL depende en parte de las ARC^{NPY} [160, 161, 184]. Debido a que encontramos que el ARC es requerido para el efecto orexigénico de la ghrelina intra-AHL, evaluamos si esta induce aumentos de c-Fos en las neuronas hrGFP de ratones NPY^{hrGFP}. Encontramos que la ghrelina intra-AHL aumenta el porcentaje de neuronas ARC^{NPY} c-Fos+ comparada con los animales inyectados con solución vehículo (58,8 ± 10 vs. 9,1 ± 2,7 % de células NPY^{hrGFP} c-Fos+, ghrelina y vehículo intra-AHL respectivamente) (Fig. 18A y C). Luego estudiamos si la señalización del receptor 1 de orexinas es necesaria para el efecto orexigénico de la ghrelina intra-AHL. Para esto, se inyectaron ratones NPY^{hrGFP} con un antagonista del receptor 1 de orexinas, SB-334867, y

subsecuentemente se los inyectó con solución vehículo o ghrelina intra-AHL. Se evaluó tanto el consumo de alimentos como la inducción de c-Fos en las células ARC^{NPY}. Aquí, tanto el consumo de alimento como la inducción de c-Fos mostraron interacción significativa entre el pretratamiento IP (con vehículo o SB-334867) y las inyecciones intra-AHL (con vehículo o ghrelina). En particular, el pretratamiento con SB-334867 redujo el consumo de alimento ($53,8 \pm 33,0$ vs. $431,5 \pm 123,8$ gr, SB-334867/ghrelina y vehículo/ghrelina respectivamente) (**Fig. 18B**) y el porcentaje de células NPY^{hrGFP} c-Fos+ ($22,5 \pm 5,3$ vs. $58,8 \pm 10,5$ células NPY^{hrGFP} c-Fos+, SB-334867/ghrelina y vehículo/ghrelina respectivamente) (**Fig. 18C**) en ratones inyectados con ghrelina intra-AHL comparados con ratones pretratados con solución vehículo y luego inyectados con ghrelina intra-AHL.

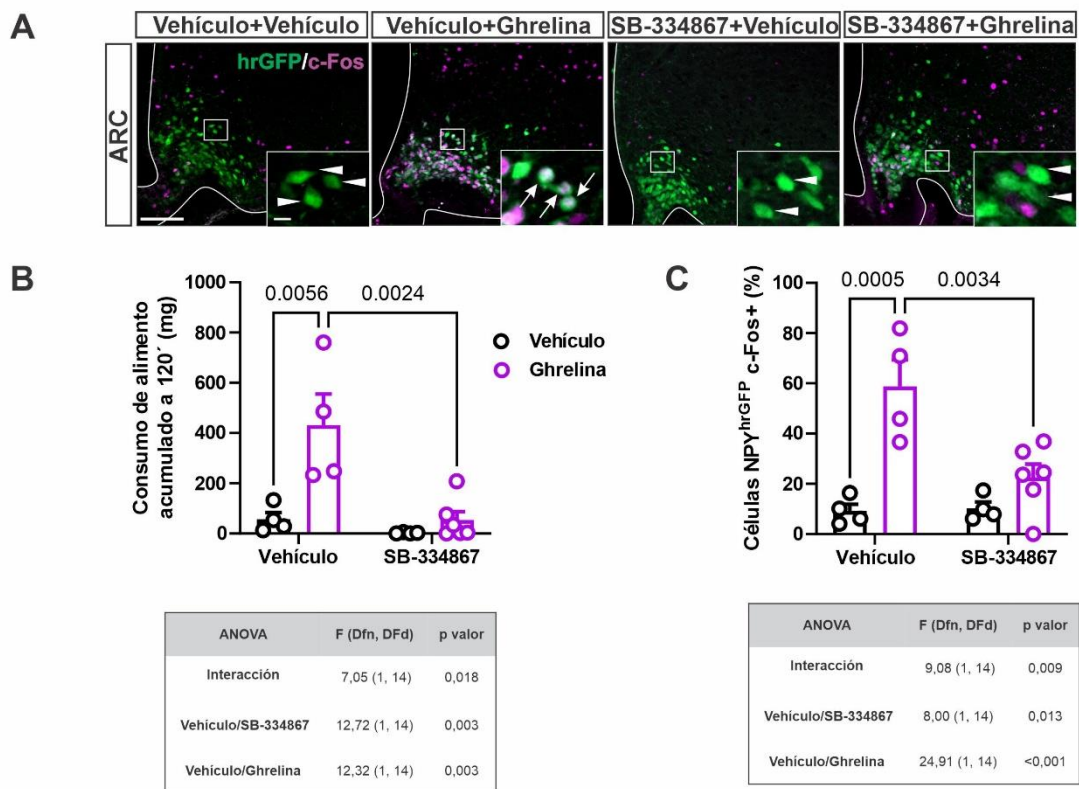


Figura 18. La administración de ghrelina intra-AHL induce el consumo de alimento y c-Fos en las neuronas ARC^{NPY} a través de mecanismos dependientes del receptor 1 de orexinas. El Panel A muestra imágenes representativas de cortes de encéfalo que incluyen el ARC sujetos a una inmunomarcación fluorescente contra c-Fos (magenta) y provenientes de ratones NPY^{hrGFP} a los cuales se los sometió a distintos tratamientos (los grupos experimentales están indicados en los recuadros arriba de las imágenes). Las imágenes a alta magnificación corresponden a los recuadros indicados en la imagen de baja magnificación. Las flechas apuntan a neuronas NPY^{hrGFP} c-Fos+ (blancas) y las cuñas a neuronas NPY^{hrGFP} c-Fos- (verdes). Barras de escala: 100 μ m en las imágenes de baja magnificación y 10 μ m en las imágenes de alta magnificación. El Panel B muestra el consumo de alimento acumulado a los 120 minutos para todos los grupos experimentales. El Panel C muestra el análisis cuantitativo de las células NPY^{hrGFP} c-

Fos+ en el ARC en todos los grupos experimentales. El recuadro ubicado abajo de los Paneles B y C indica el valor del F , los grados de libertad y el valor de p correspondientes a cada factor (pretratamiento con vehículo o SB-334867 y tratamiento intra-AHL con vehículo o ghrelina) como también para la interacción entre ellos. Sobre los gráficos de barras de cada panel se indican los valores de p del post-test correspondiente a las comparaciones entre grupos que resultaron significativos. Todos los valores se expresan como la media \pm EEM.

Estos resultados indican que el efecto orexigénico de la ghrelina administrada en el AHL depende del ARC, recluta a las ARC^{NPY} y depende de la señalización del receptor 1 de orexinas en el ARC.

Los resultados presentados hasta el momento pueden ser explicados bajo el siguiente modelo (Fig. 19) en donde la administración de la ghrelina en el AHL de ratones recluta indirectamente a las neuronas $AHL^{orexina}$ las cuales a su vez inducen la activación de las ARC^{NPY} promoviendo así el consumo de alimento.

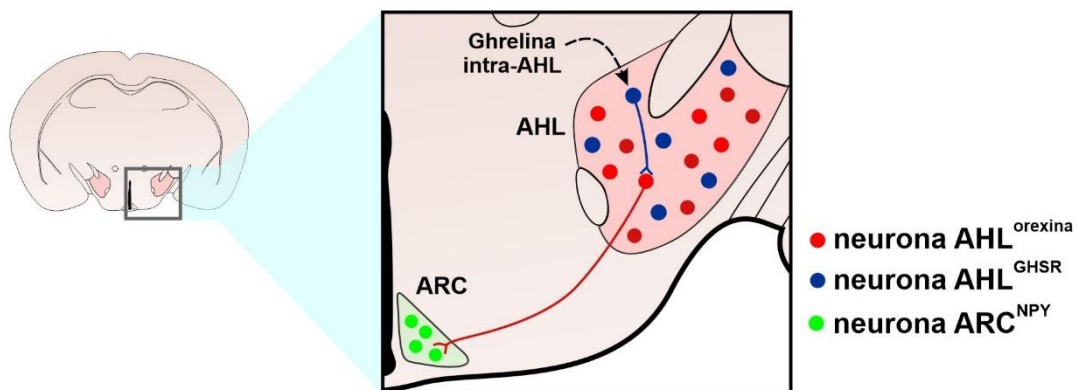


Figura 19. Modelo propuesto para el circuito neuronal reclutado luego de la administración de ghrelina en el AHL de ratones. La ilustración muestra una sección coronal del encéfalo de ratón, incluyendo el AHL y el núcleo ARC. Se indican con colores diferentes las poblaciones neuronales de interés en cada núcleo.

2.2. Estudio de la accesibilidad de la ghrelina fluorescente al AHL

Trabajos previos del laboratorio de Neurofisiología del IMBICE indican que la ghrelina accede a regiones limitadas del parénquima cerebral cuando está aumentada tanto en plasma como en líquido cefalorraquídeo [180, 185]. Siendo que GHSR se expresa en el AHL, pero esta región está relativamente alejada de las estructuras ventriculares y de las áreas con capilares fenestrados, se estudió si la ghrelina presente en el plasma o en el líquido cefalorraquídeo logra acceder al AHL.

Para esto se administró un análogo fluorescente de la ghrelina, F-ghrelina, la cual permite estudiar las regiones del encéfalo a las cuales accede la ghrelina. Este análogo mantiene características de la bioactividad en ratones WT induciendo el consumo de alimento y el aumento de c-Fos en el ARC de manera dependiente de la dosis [180]. Para estudiar la accesibilidad de la F-ghrelina al cerebro se inyectó solución vehículo sola o conteniendo dicho compuesto por dos vías de administración: una vía subcutánea (1200 pmoles/gr. peso de ratón) y una vía ICV (60 pmoles/ratón). Luego de 15 minutos del tratamiento, los animales se perfundieron y se extrajo el encéfalo. Como se indicó antes, el tejido se procesó para obtener secciones coronales y obtener imágenes al microscopio de fluorescencia. Como se esperaba, las cuantificaciones de intensidad de fluorescencia indicaron la presencia de marca fluorescente en el ARC de animales inyectados con F-ghrelina SC o ICV. En cambio, no se encontró marca fluorescente en el AHL de los animales inyectados con F-ghrelina por cualquiera de las vías de administración. En particular, no se encontraron diferencias significativas en el AHL entre los animales inyectados con F-ghrelina SC o ICV respecto a los animales inyectados con solución vehículo ($1,0 \pm 0,1$; $1,1 \pm 0,1$ y $1,0 \pm 0,1$ u.a., respectivamente) (**Fig. 20**). Estos resultados indican que la F-ghrelina no accede al AHL cuando es administrada tanto por vía periférica como por vía central.

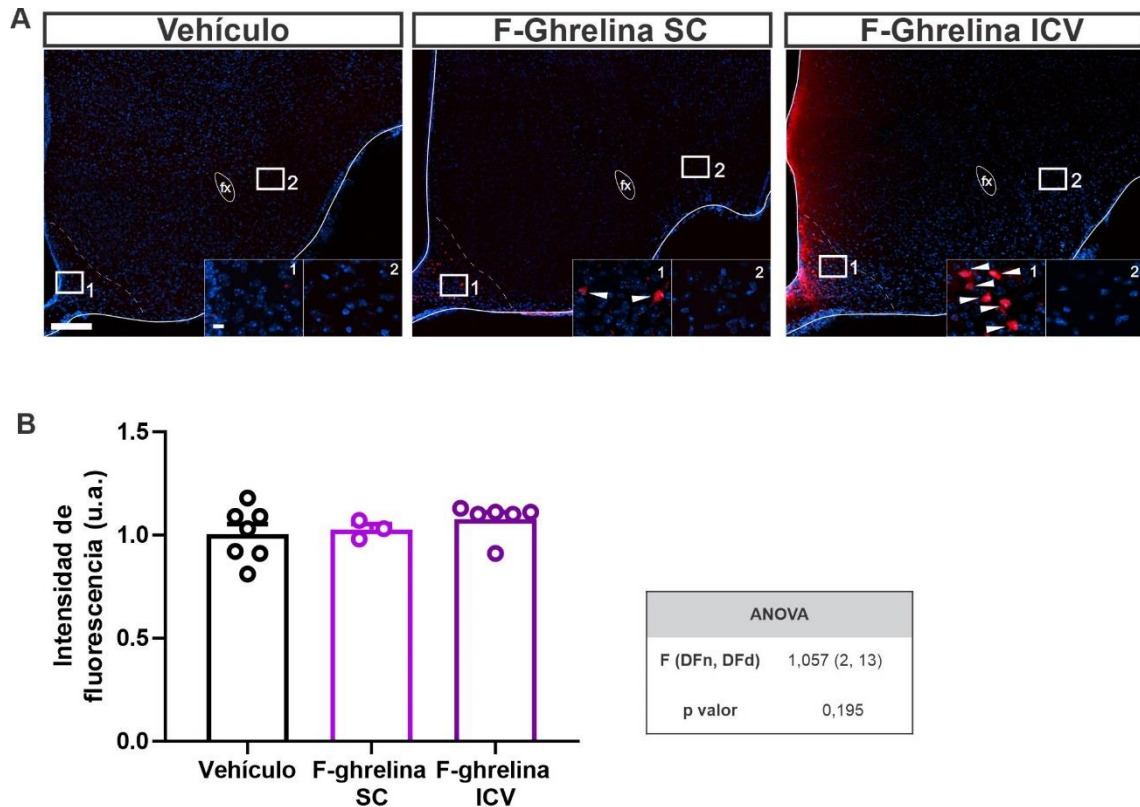


Figura 20. Accesibilidad de la ghrelina fluorescente al AHL. El **Panel A** muestra imágenes representativas de cortes coronales a la altura del AHL de animales inyectados con vehículo (izquierda), ghrelina fluorescente vía subcutánea (F-ghrelina SC, panel medio) o ghrelina fluorescente vía ICV (F-ghrelina ICV, panel derecho). Los insertos muestran imágenes a mayor magnificación del ARC (1) y del AHL (2). Barras de escala: 100 μ m en las imágenes de baja magnificación y 10 μ m en las imágenes de alta magnificación. El **Panel B** muestra la cuantificación de la densidad óptica en el AHL de los animales bajo los tres tratamientos. El test estadístico realizado fue un ANOVA de un factor seguido por el post-test de Bonferroni. El recuadro ubicado en la derecha indica el valor del F , los grados de libertad y el valor de p correspondientes al ANOVA. Todos los valores se expresan como la media \pm EEM.

Estos resultados indican que la ghrelina administrada tanto de manera periférica como central no accede al AHL.

2.3. Estudio de la respuesta de las neuronas del AHL a la ghrelina sistémica y central

Los resultados presentados anteriormente indicaron que GHSR se expresa en el AHL, pero la ghrelina no accedería a dicha región cuando es administrada tanto vía periférica como central. Ante esto, nos preguntamos si las neuronas del AHL respondían a la administración de ghrelina. Para esto se realizaron administraciones de ghrelina en animales WT por dos vías de

administración: una vía subcutánea (60 pmoles/gr. peso de ratón) y una vía ICV (60 pmoles/ratón). Además, se realizó un grupo control inyectando animales WT con solución vehículo vía SC o vía ICV. Dos horas post-inyección, se perfundió a los animales y se procesó su encéfalo para realizar una inmunomarcación cromogénica contra c-Fos. Los resultados indicaron que la ghrelina administrada vía subcutánea no indujo aumentos de c-Fos en el AHL (46 ± 13 células/sección) respecto al grupo control (58 ± 7 células/sección). Por otro lado, dicho aumento sí fue observado en los animales a los cuales se le administró ghrelina vía ICV (121 ± 23 células/sección) (**Figura 21**).

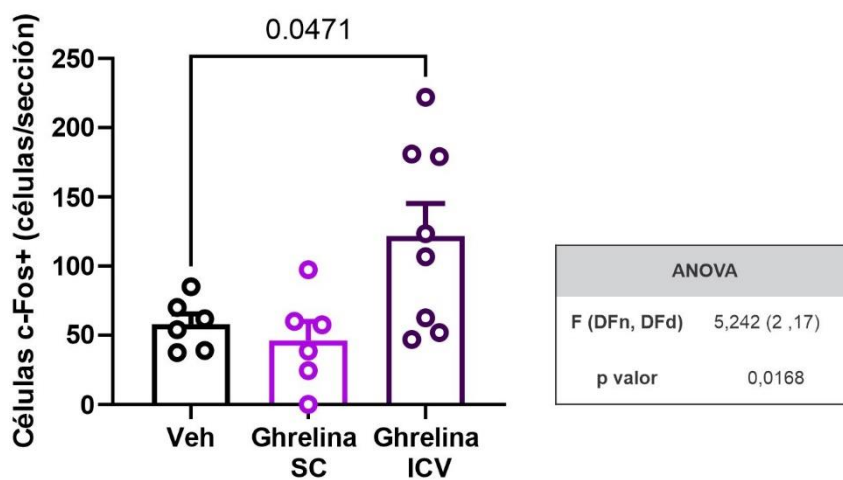


Figura 21. La ghrelina ICV induce c-Fos en el AHL. La figura indica el análisis cuantitativo del número de células cFos+ por sección en el AHL de animales WT inyectados con solución vehículo (n=6), con ghrelina subcutánea (n=6) o con ghrelina ICV (n=8). En el gráfico se indica la media y el error estándar de la media para cada grupo experimental. El test estadístico realizado fue un ANOVA de un factor seguido por el post-test de Bonferroni. El recuadro ubicado en la derecha indica el valor del *F*, los grados de libertad y el valor de *p* correspondientes al ANOVA. Sobre el gráfico de barras se indica el valor de *p* del post-test correspondiente a la comparación entre ghrelina ICV vs. vehículo. Todos los valores se expresan como la media \pm EEM.

Luego de observar que la ghrelina administrada centralmente aumentaba el número de células cFos+ en el AHL, se decidió estudiar qué población neuronal dentro del AHL es la que presentaba dicho aumento. Dado que las neuronas de orexina del AHL juegan un rol preponderante en el control del consumo de alimentos [186, 187], y que trabajos previos han vinculado la actividad de dichas neuronas y GHSR [171, 188, 189], se evaluó si el aumento de células c-Fos+ en el AHL de los animales inyectados con ghrelina ICV correspondía a una activación de las neuronas de orexina. Dicho estudio también se realizó en los animales inyectados con ghrelina subcutánea con el objetivo de corroborar si existía un aumento de células c-Fos+ específicamente en la

población de neuronas orexina+ del AHL. Para esto, se realizó una inmunomarcación cromogénica doble contra c-Fos y orexina en cortes coronales de encéfalo provenientes de animales inyectados con solución vehículo, con ghrelina subcutánea o con ghrelina ICV, y se cuantificó el porcentaje de neuronas que resultaron positivas tanto para orexina como para c-Fos. Los resultados indicaron que la ghrelina ICV aumentó el porcentaje de células de orexina c-Fos+ en el AHL respecto al total de neuronas de orexina en comparación con el grupo control (10 ± 13 vs. 2 ± 4 células de orexina c-Fos+, ghrelina ICV y solución vehículo respectivamente). Por otro lado, la ghrelina subcutánea no logró inducir dichos aumentos (1 ± 6 células de orexina c-Fos+, ghrelina SC) (Fig. 22).

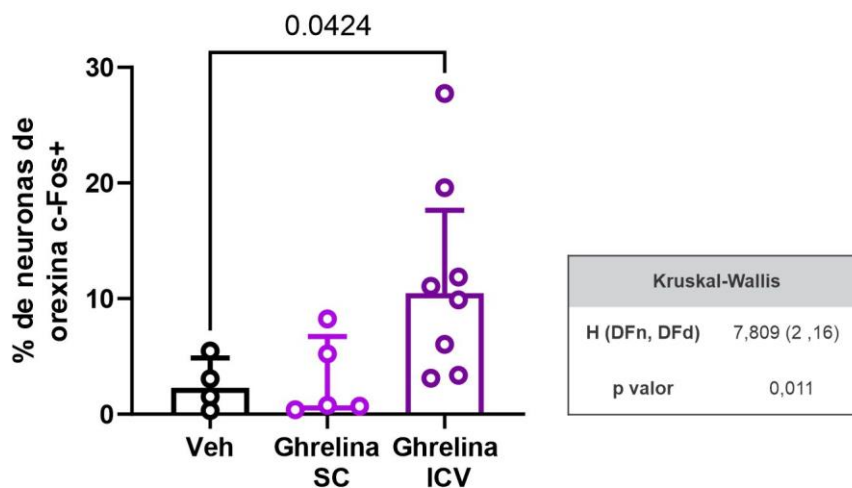


Figura 22. La ghrelina ICV induce c-Fos en las neuronas AHL^{orexina}. La figura indica el análisis cuantitativo del porcentaje de células de orexina c-Fos+ en el AHL, en animales WT inyectados con solución vehículo (n=4), ghrelina subcutánea (n=5) o ghrelina ICV (n=8). En el gráfico se indica la mediana y el rango intercuartílico para cada grupo experimental. El test estadístico realizado fue un test de Kruskal-Wallis seguido por el post-test de Dunn. El recuadro ubicado en la derecha indica el valor del *H*, los grados de libertad y el valor de *p* correspondientes al test de Kruskal-Wallis. Sobre el gráfico de barras se indica el valor de *p* del post-test correspondiente a la comparación entre ghrelina ICV vs. vehículo. Todos los valores se expresan como la mediana \pm rango intercuartílico.

2.4. Estudio de la respuesta de las neuronas AHL^{GHSR} a la ghrelina sistémica y central

Posteriormente decidimos evaluar si las neuronas que expresan AHL^{GHSR} respondían a la administración de ghrelina a través de distintas vías. Para esto se administró solución vehículo o ghrelina vía SC o vía ICV, en grupos independientes de ratones GHSR^{eGFP}. Dos horas post-inyección se los perfundió, se extrajo el encéfalo, se lo congeló y se lo cortó en cuatro series coronales secuenciales. Sobre una de estas series se realizó una inmunomarcación cromogénica

doble contra c-Fos y contra eGFP para evaluar la inducción de c-Fos en las células AHL^{eGFP}. Aquí se observó que la ghrelina ICV indujo aumentos de células AHL^{eGFP} c-Fos+ respecto al grupo control (10 ± 14 vs. 0 ± 1 células AHL^{eGFP} c-Fos+, ghrelina ICV y solución vehículo respectivamente). En cambio, la ghrelina subcutánea no logró inducir dichos aumentos (2 ± 2 células AHL^{eGFP} c-Fos+, ghrelina SC) (Fig. 23).

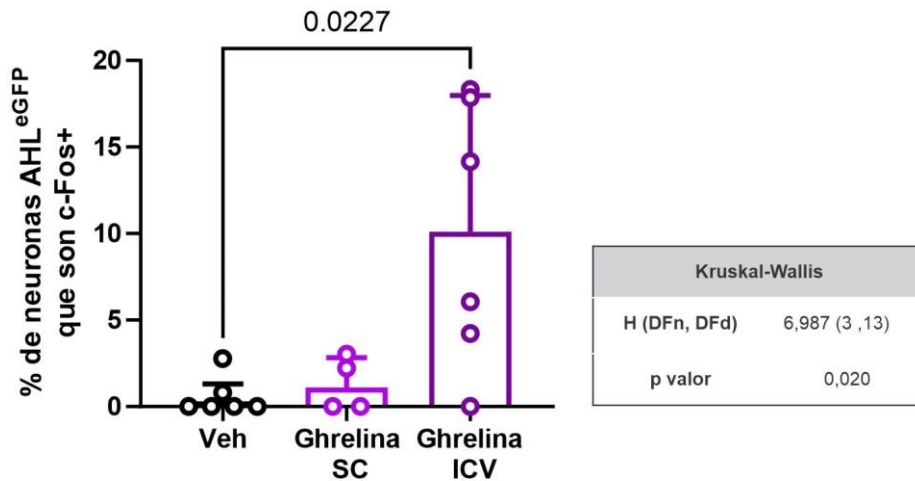


Figura 23. La ghrelina ICV induce c-Fos en las AHL^{eGFP}. La figura indica el análisis cuantitativo del porcentaje de células cFos+/eGFP+ en el AHL respecto al total de células eGFP+ del mismo núcleo, en animales GHSR^{eGFP} inyectados con solución vehículo (n=6), ghrelina subcutánea (n=4) o ghrelina ICV (n=6). En el gráfico se indica la mediana y el rango intercuartílico para cada grupo experimental. El test estadístico realizado fue un test de Kruskal-Wallis seguido por el post-test de Dunn. El recuadro ubicado en la derecha indica el valor del *H*, los grados de libertad y el valor de *p* correspondientes al test de Kruskal-Wallis. Sobre el gráfico de barras se indica el valor de *p* del post-test correspondiente a la comparación entre ghrelina ICV vs. vehículo. Todos los valores se expresan como la mediana ± rango intercuartílico.

Estos resultados indican que la ghrelina administrada en el LCR aumentó el número de células c-Fos+ en el AHL, en particular en las neuronas productoras de orexina. A su vez, la ghrelina administrada por la misma vía aumentó de la fracción de células AHL^{GHSR} c-Fos+.

3. Respuesta de las neuronas AHL^{GHSR} a LEAP2 y caracterización funcional del péptido

En la actualidad conocemos que GHSR puede ser modulado por dos ligandos endógenos: ghrelina y LEAP2. El objetivo de la presente sección fue estudiar el efecto de LEAP2 sobre el AHL de ratones. Dado el reciente descubrimiento de LEAP2 y previo a estudiar su efecto sobre el AHL,

realizamos diversas caracterizaciones de esta molécula en su rol de ligando de GHSR. Debido a esto se evaluaron los siguientes aspectos:

-Caracterización de la región de LEAP2 que mantiene bioactividad. Esto se evaluó a través del uso de variantes moleculares de LEAP2 y el estudio de la magnitud en que bloquean el efecto orexigénico de la ghrelina en ratones.

-Estudio de la accesibilidad de LEAP2 al encéfalo. Esto se evaluó a través del uso de una variante fluorescente de LEAP2 (F-LEAP2) y el estudio de su patrón de pegado en núcleos del encéfalo.

-Estudio de la especificidad de unión de LEAP2 a GHSR. Esto se realizó a través del uso de ligandos de GHSR como bloqueantes la unión de F-LEAP2 al núcleo ARC.

-Estudio de F-LEAP2 como variante bioactiva. Para esto se evaluó la magnitud en que F-LEAP2 bloquea el efecto orexigénico de la ghrelina en ratones.

Adicionalmente a estos estudios se evaluó la accesibilidad de F-LEAP2 al AHL y la inducción de c-Fos en dicha región luego de la administración de LEAP2 ICV.

3.1. Estudio de los segmentos bioactivos de LEAP2

Evaluamos la capacidad de LEAP2(1-12-NH₂) y LEAP2(15-40-OH) de inhibir el efecto orexigénico de ghrelina en ratones. Este experimento lo realizamos en condiciones similares a las usadas por Ge y colaboradores de manera que la relación ghrelina: segmentos-de-LEAP2 usada fue 1:10. Los ratones fueron inyectados vía ICV con solución vehículo sola o conteniendo las diferentes variantes de LEAP2, y 10 minutos después se les administró, también por vía ICV, solución vehículo sola o conteniendo ghrelina. Como era esperado, el pretratamiento con LEAP2(1-40) inhibió el consumo de alimento inducido por ghrelina y un efecto similar fue observado con LEAP2(1-12-NH₂) (**Fig. 24**). Por otro lado, el pretratamiento con LEAP2(15-40-OH) no afectó el consumo de alimento inducido por ghrelina (**Fig. 24**).

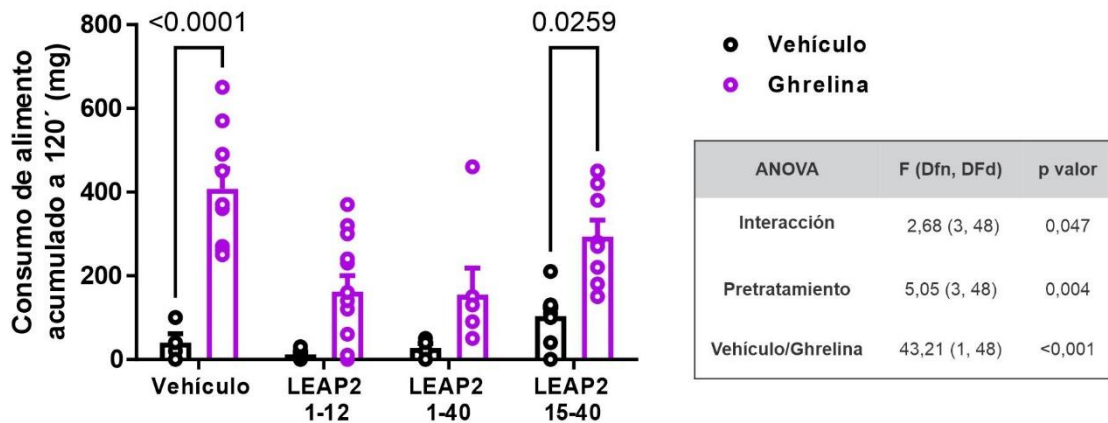


Figura 24. Los segmentos N-terminales de LEAP2 administrados vía ICV mantienen la bioactividad del péptido nativo. La figura indica el análisis cuantitativo del consumo de alimento inducido por ghrelina ICV en animales pretratados, también vía ICV, con solución vehículo sola o conteniendo distintas variantes moleculares de LEAP2: LEAP2(1-12-NH₂), LEAP2(1-40) y LEAP2(15-40-OH). Así se definieron los siguientes grupos experimentales: vehículo/vehículo, vehículo/ghrelina, LEAP2(1-12-NH₂)/vehículo, LEAP2(1-12-NH₂)/ghrelina, LEAP2(1-40)/vehículo, LEAP2(1-40)/ghrelina, LEAP2(15-40-OH)/vehículo y LEAP2(15-40-OH)/ghrelina. El recuadro ubicado a la derecha del gráfico indica el valor del *F*, los grados de libertad y el valor de *p* correspondientes a cada factor (Pretratamiento y vehículo/ghrelina) como también para la interacción entre ellos. Sobre el gráfico de barras se indican los valores de *p* del post-test correspondiente a las comparaciones entre grupos que resultaron significativos. Todos los valores se expresan como la media ± EEM.

Debido a que la accesibilidad al encéfalo de los péptidos vía ICV puede ser diferente a los inyectados vía SC, se repitió el mismo diseño experimental anterior, pero inyectando tanto los péptidos del pretratamiento como el vehículo/ghrelina vía SC. Se observaron resultados similares a los anteriores, en donde tanto el LEAP2(1-40) como el LEAP2(1-12-NH₂) inhibieron el consumo de alimento inducido por ghrelina. Por otro lado, el LEAP2(15-40-OH) no logró inhibir dicho consumo (**Fig. 25**).

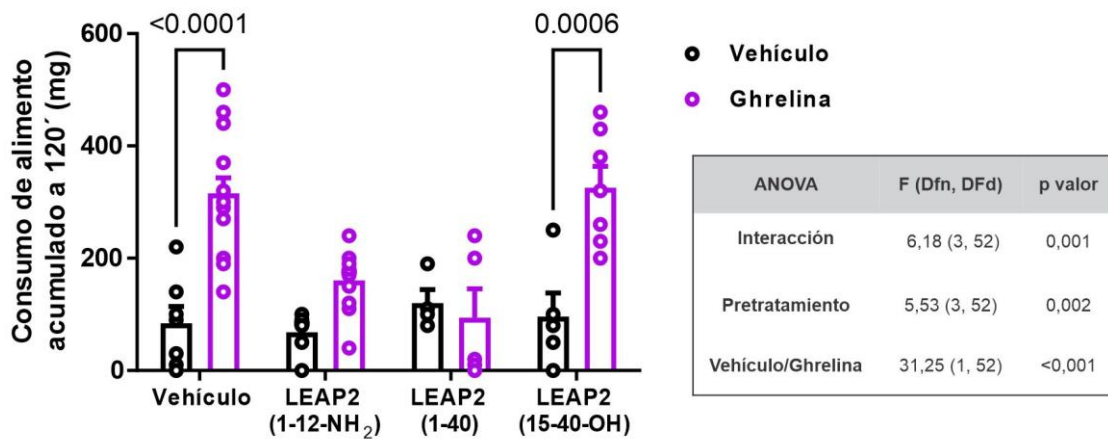


Figura 25. Los segmentos N-terminales de LEAP2 administrados vía SC mantienen la bioactividad del péptido nativo. La figura indica el análisis cuantitativo del consumo de alimento inducido por ghrelina SC en animales pretratados, también vía SC, con solución vehículo sola o conteniendo distintas variantes moleculares de LEAP2: LEAP2(1-12-NH₂), LEAP2(1-40) y LEAP2(15-40-OH). Así se definieron los siguientes grupos experimentales: vehículo/vehículo, vehículo/ghrelina, LEAP2(1-12-NH₂)/vehículo, LEAP2(1-12-NH₂)/ghrelina, LEAP2(1-40)/vehículo, LEAP2(1-40)/ghrelina, LEAP2(15-40-OH)/vehículo y LEAP2(15-40-OH)/ghrelina. El recuadro ubicado a la derecha del gráfico indica el valor del *F*, los grados de libertad y el valor de *p* correspondientes a cada factor (Pretratamiento y vehículo/ghrelina) como también para la interacción entre ellos. Sobre el gráfico de barras se indican los valores de *p* del post-test correspondiente a las comparaciones entre grupos que resultaron significativas. Todos los valores se expresan como la media ± EEM.

Estos resultados indican que los fragmentos N-terminales de LEAP2(1-40) mantienen la bioactividad del péptido al antagonizar el efecto orexigénico de ghrelina.

3.2. Estudio de la accesibilidad del LEAP2 fluorescente (F-LEAP2) al AHL y a diversas regiones del encéfalo

Para validar su uso como trazador, primero se estudió si el F-LEAP2 se unía a las regiones del encéfalo donde se expresa GHSR. Para esto, se administró solución vehículo o F-LEAP2 a ratones vía ICV y se los perfundió a los 15 minutos. Se extrajo el encéfalo y se procesó para microscopía de fluorescencia. Se realizó un análisis cualitativo de las áreas del encéfalo que presentaron una marca significativa de F-LEAP2, las cuales están resumidas en la **Tabla 5** y se muestran imágenes representativas de algunas de estas regiones en la **Figura 26**. En contraste con los ratones inyectados con solución vehículo, los inyectados con F-LEAP2 presentaron señal fluorescente en

diversas zonas del encéfalo. La mayor cantidad e intensidad de señal fue observada en el hipotálamo, siendo el ARC la región con mayor cantidad de células marcadas (**Fig. 26A**). Una cantidad relativamente alta de células marcadas fue encontrada en ciertos núcleos hipotalámicos como el VMH (**Fig. 26A**), VMPO (**Fig. 26B**), SCh (**Fig. 26C**), PVH (**Fig. 26D**) y el SuM (**Fig. 26E**), mientras que otras regiones del hipotálamo como el AHA, DMH, Pe y PMV presentaron una cantidad más moderada de células fluorescentes. Células fluorescentes también fueron encontradas en el DG y en los cuernos de Ammon del hipocampo (**Fig. 26F**) al igual que en el septum medial (**Fig. 26G**), el PVT y el SFO (**Fig. 26H**). Una cantidad relativamente alta de células marcadas con F-LEAP2 fueron encontradas en el LDTg (**Fig. 26I**) el cual se encuentra en la unión entre el mesencéfalo y el puente. En la medula oblonga, se observaron células marcadas con F-LEAP2 en los tres componentes del complejo dorsal del vago: el AP, el NTS y el DMV (**Fig. 26J**). El patrón de marca fluorescente de F-LEAP2 en las regiones del encéfalo es consistente con varios reportes previos de la distribución del ARNm de GHSR en ratones [152] como así también con el patrón de marca observado en ratones inyectados con F-ghrelina ICV [190]. También es interesante mencionar que se observó marca de F-LEAP2 en los procesos celulares de los tanicitos hipotalámicos, los cuales se encuentran el piso del tercer ventrículo (**Fig. 26Ac**) y en células epiteliales de los plexos coroideos (**Fig. 26Fc**). Estas regiones forman parte de la barrera sangre-líquido cefalorraquídeo y han sido propuestos como compartimentos que pueden transportar hormonas, incluyendo a la ghrelina y el LEAP2.

Hipocampo y Septum	
Cuerno de Ammon, CA1	+/-
Cuerno de Ammon, CA2	+
Cuerno de Ammon, CA3	+++
Giro dentado, DG	++
Núcleo septal lateral, LS	+
Núcleo septal medial, MS	+
Tálamo	
Núcleo paraventricular del tálamo, PVT	+
Hipotálamo	
Área hipotalámica anterior, AHA	+
Núcleo arcuato, ARC	+++
Núcleo dorsomedial del hipotálamo, DMH	+
Núcleo paraventricular del hipotálamo, PVH	++
Núcleo periventricular del hipotálamo, Pe	+
Núcleo premamilar ventral, PMV	+
Núcleo supramamilar, SuM	++
Núcleo supraquiasmático, Sch	++
Núcleo ventromedial, VMH	++
Núcleo preóptico ventromedial, VMPO	++
Órgano subfornical, SFO	++
Mesencéfalo, puente y médula oblonga	
Área postrema, AP	++
Núcleo motor dorsal del vago, DMV	++
Núcleo dorsal de rafe, DR	+/-
Núcleo dorsal tegmental, DTg	+/-
Núcleo Edinger Westphal	+/-
Núcleo laterodorsal tegmental, LDTg	+
Locus coeruleus, LC	+/-
Núcleo magnocelular de la comisura posterior, MCPC	+/-
Núcleo del tracto solitario, NTS	+
Substancia nigra, SN	+/-
Área ventral tegmental, AVT	+/-

Tabla 5. Análisis cualitativo de las áreas encefálicas con señal fluorescente en ratones inyectados con F-LEAP2 ICV. La estimación cualitativa se realizó considerando tanto la intensidad de la señal como el número de células marcadas. +++ señal alta; ++ señal moderada; + señal baja; +/- señal inconsistente.

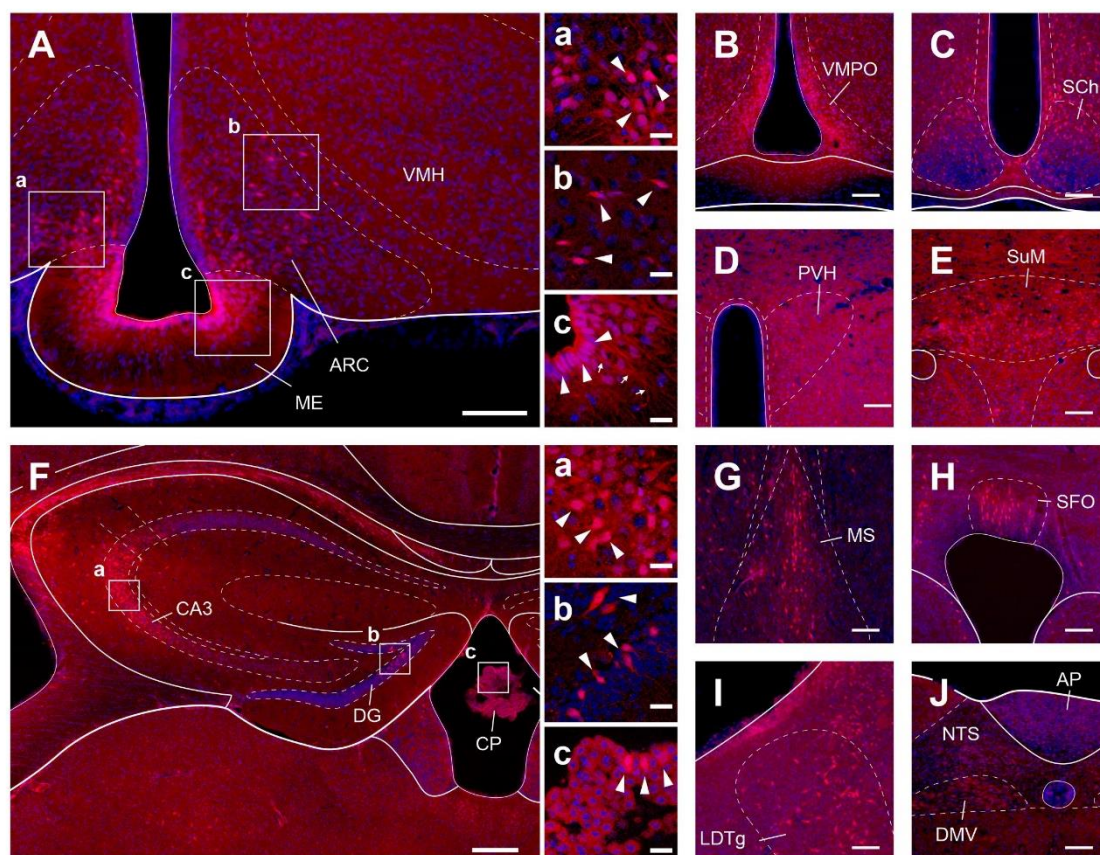


Figura 26. F-LEAP2 se une a regiones del encéfalo en las cuales se conoce que expresan GHSR. La figura muestra imágenes representativas de secciones coronales de encéfalos de animales inyectados con F-LEAP2 ICV. Los insertos muestran imágenes a alta magnificación de las regiones indicadas a baja magnificación. Las cuñas indican células marcadas con F-LEAP2 y las flechas indican procesos correspondientes a tunicos marcados. Barras de escala: A 100 μm , A a-c 20 μm , B-E 100 μm , F 200 μm , F a-c 20 μm , G-J 100 μm . Todas las abreviaturas usadas para nombrar a las regiones encefálicas están listadas en la **Tabla 4**.

Consistente con lo observado con la F-ghrelina, no se encontró un número significativo de células con marca fluorescente en el AHL de los animales inyectados con F-LEAP2 ICV (**Fig. 27**) indicando que el péptido no accedería a esta región.

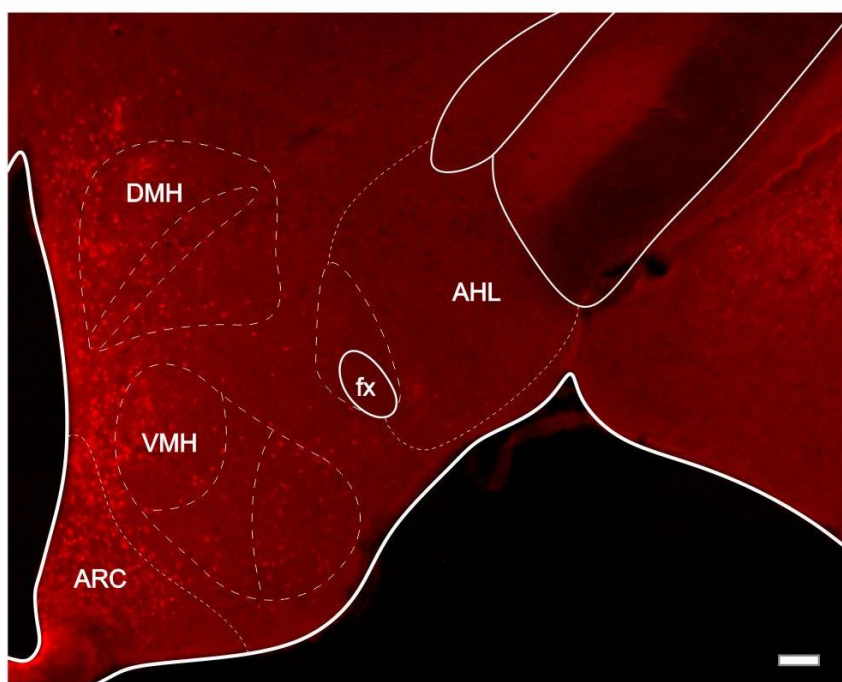


Figura 27. Accesibilidad del F-LEAP2 al AHL. La figura muestra una imagen representativa de una sección coronal de encéfalo de un animal inyectado con F-LEAP2 ICV. La sección abarca núcleos hipotalámicos incluyendo el AHL. Barra de escala: 100 μ m. Las abreviaturas para usadas para nombrar regiones encefálicas están listadas en la **Tabla 5**.

Estos resultados indican que diversas regiones del encéfalo en donde se expresa GHSR se marcan con F-LEAP2 cuando es administrado en el LCR. Sin embargo, dicha marca no se encontró en el AHL, similar a lo observado con la F-ghrelina.

Para conocer la especificidad de la unión de F-LEAP2 *in vivo*, se trató a ratones WT con F-LEAP2 y se los pre-inyectó con ligandos conocidos de GHSR. Así, si F-LEAP2 posee unión específica a GHSR, se esperó no observar pegado del trazador en el encéfalo de los animales pre-tratados con los ligandos de GHSR. En particular, el experimento consistió en pre-inyectar a los ratones con solución vehículo, LEAP2(1-40) o ghrelina ICV y luego inyectados con F-LEAP2 ICV. Pasados 15 minutos, se perfundieron y se procesó su encéfalo para microscopía de fluorescencia. La estimación de la presencia o no de señal fluorescente se realizó en el núcleo ARC ya que es la región con mayor expresión de GHSR. Se observó que el ARC de los ratones pretratados con LEAP2(1-40) o ghrelina y luego inyectados con F-LEAP2 no presentó marca fluorescente roja en comparación con el ARC de los animales pretratados con solución vehículo y luego inyectados

con F-LEAP2 (**Fig. 28**). De esta manera, se confirmó que F-LEAP2 mantiene especificidad de unión a GHSR.

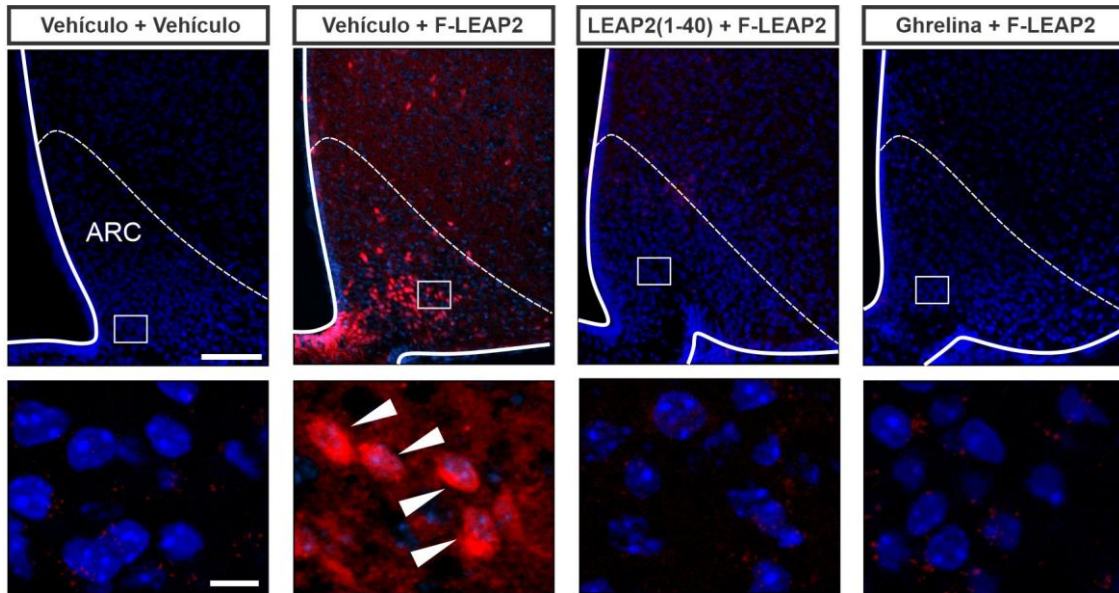


Figura 28. La unión de F-LEAP2 en el ARC se impide por el pretratamiento con LEAP2(1-40) o ghrelina. La primera y segunda columna de la figura muestran imágenes representativas de secciones coronales del encéfalo incluyendo el ARC, correspondiente a ratones inyectados solo con solución vehículo o F-LEAP2 ICV. La tercera y cuarta columna muestran imágenes representativas de secciones coronales del encéfalo incluyendo el ARC, correspondiente a ratones pre-inyectados respectivamente con LEAP2(1-40) o ghrelina ICV, y luego inyectados con F-LEAP2 ICV. Los insertos muestran imágenes a alta magnificación de las regiones indicadas a baja magnificación. Las cuñas indican células marcadas con F-LEAP2. Los recuadros ubicados arriba de las columnas indican la pre-inyección + inyección realizadas en cada caso. Barras de escala: 100 μ m en las imágenes de baja magnificación y 10 μ m en las de alta magnificación.

Por otro lado, se evaluó la especificidad del F-LEAP2 en bloquear el efecto orexigénico inducido por ghrelina. Para esto se pre-inyectaron ratones WT con solución vehículo, LEAP2(1-40) o F-LEAP2 ICV, y luego se inyectaron con solución vehículo o ghrelina ICV. Se evaluó el consumo de alimento por dos horas posterior a la última administración ICV. Se observó que la ghrelina indujo el consumo de alimento en los animales pre-inyectados con solución vehículo, mientras que no así en los pre-inyectados con LEAP2(1-40) o F-LEAP2, indicando que el F-LEAP2 mantiene la especificidad de unión al GHSR bloqueando el efecto orexigénico de la ghrelina (**Fig. 29**).

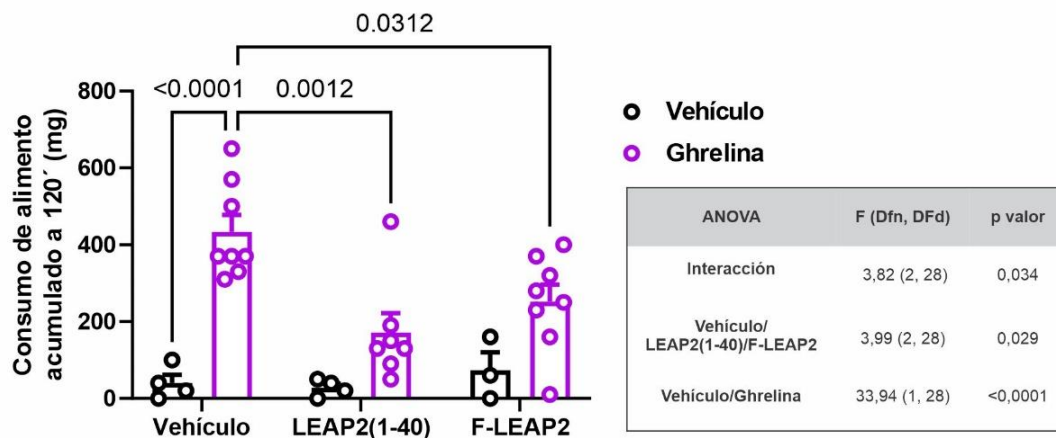


Figura 29. F-LEAP2 inhibe el consumo de alimento inducido por ghrelina al igual que LEAP2(1-40). La figura muestra el análisis cuantitativo del consumo de alimento en animales pre-inyectados ICV con solución vehículo, LEAP2(1-40) o F-LEAP2, y luego inyectados con solución vehículo o ghrelina ICV. El recuadro ubicado a la derecha del gráfico indica el valor de F , los grados de libertad y el valor de p correspondientes a cada factor (vehículo/LEAP2(1-40)/F-LEAP2 y vehículo/ghrelina) como también para la interacción entre ellos. Sobre el gráfico de barras se indican los valores de p del post-test correspondiente a las comparaciones entre grupos que resultaron significativas. Todos los valores se expresan como la media \pm EEM.

Estos resultados indican que la unión de F-LEAP2 al ARC es bloqueada por la preinyección de ghrelina o LEAP2(1-40). En el mismo sentido, F-LEAP2 mantiene las propiedades bioactivas del LEAP2 intacto al inhibir el efecto orexigénico de ghrelina.

3.2 Respuesta de las neuronas del AHL al LEAP2

Para conocer si el LEAP2 induce cambios en la actividad del AHL se inyectó solución vehículo o LEAP2(1-40) vía ICV en ratones WT, se les extrajo el encéfalo y se los procesó para inmunotinción contra c-Fos. Las cuantificaciones no mostraron diferencias significativas en el número de neuronas c-Fos+ en el AHL entre ambos grupos experimentales ($34,6 \pm 2,0$ vs. $29,8 \pm 2,8$ células c-Fos+, solución vehículo y LEAP2 ICV respectivamente) (**Fig. 30**).

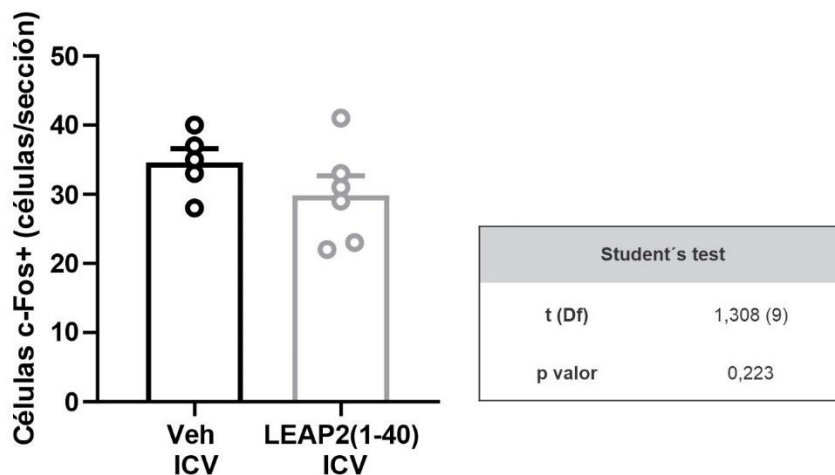


Figura 30. El LEAP2(1-40) ICV no modifica el número de células c-Fos+ en el AHL. La figura muestra la cuantificación de células c-Fos+ por sección en el AHL de animales inyectados con solución vehículo o 600 pmol de LEAP2(1-40) vía ICV. Los datos se indican como la media \pm EEM.

Estos resultados indican que la administración de LEAP2(1-40) no induce aumentos de células c-Fos+ en el AHL.

4. Estudio del rol de las neuronas AHL^{GHSR} en la modulación de conductas alimentarias

Los experimentos realizados hasta el momento se enfocaron en el estudio de las administraciones de ghrelina y LEAP2 sobre las neuronas AHL^{GHSR}. Por otro lado, tanto la relación de ghrelina/LEAP2 como la señalización de GHSR puede verse afectada en distintas condiciones metabólicas y experimentales e impactar en la actividad de las neuronas AHL^{GHSR}. Es por lo mencionado anteriormente que en esta sección se evaluó la actividad de las AHL^{GHSR} en condiciones experimentales donde no se realizaron administraciones exógenas de ghrelina o LEAP2. Para llevar esto a cabo se diseñaron dos experimentos desarrollados a continuación.

4.1. Estudio de la respuesta de las neuronas AHL^{GHSR} a cambios endógenos de la relación ghrelina/LEAP2 plasmática

El primer experimento consistió en exponer a ratones $GHSR^{eGFP}$ a un protocolo de restricción calórica, en donde la relación ghrelina/LEAP2 en plasma se encuentra aumentada. De manera de evaluar si estos cambios plasmáticos impactan en la actividad de las neuronas AHL^{GHSR} se evaluó la activación de las neuronas AHL^{eGFP} consecuencia de la restricción de alimento. Brevemente, el protocolo consistió en alimentar a los ratones con el 40% de la masa promedio de alimento que consumen diariamente en condiciones *ad libitum*. Al mismo tiempo, se realizó un grupo control con ratones $GHSR^{eGFP}$ alimentados *ad libitum* durante todo el experimento (**Fig. 31A**). Al quinto día de la restricción calórica, los animales ambos grupos experimentales fueron perfundidos y su encéfalo se procesó para inmunomarcación cromogénica doble contra c-Fos y contra eGFP. Al día de la perfusión los animales restringidos calóricamente mostraron una reducción del $22,2 \pm 1,7 \%$ del peso corporal respecto a su peso basal previo a la restricción, en cambio, los animales alimentados no mostraron cambios en el peso corporal respecto a los días basales ($0,97 \pm 0,50 \%$) (**Fig. 31B**). El análisis cuantitativo de las inmunohistoquímicas indicó que los animales $GHSR^{eGFP}$ bajo restricción calórica no mostraron diferencias en el porcentaje de células cFos+/eGFP+ en el AHL respecto a las eGFP+ totales del AHL en comparación con el grupo control alimentado *ad libitum* ($2,3 \pm 1,0 \%$ restricción calórica vs. $1,1 \pm 0,4 \%$ grupo control) (**Fig. 31C**).

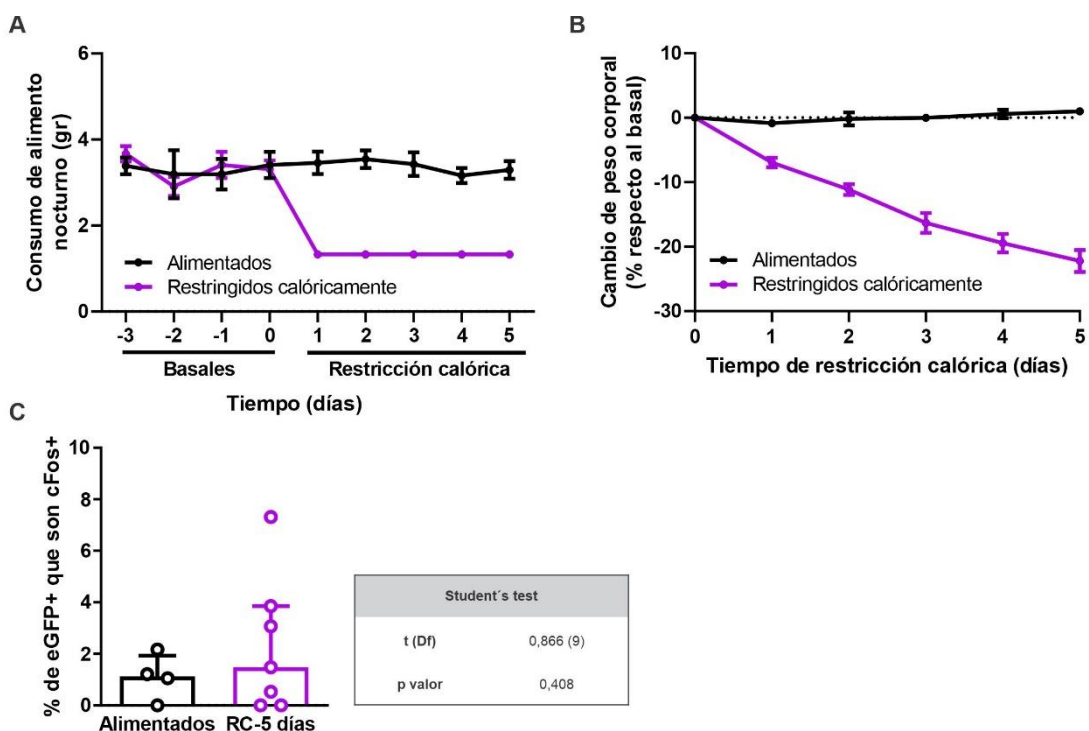


Figura 31. Inducción de cFos en las neuronas que expresan GHSR en el AHL de animales GHSR^{eGFP} sometidos a restricción calórica. El **Panel A** muestra el consumo de alimento nocturno durante los días de mediciones basales y durante la restricción calórica para los animales alimentados (n=4) y para los restringidos calóricamente (n=6). El **Panel B** muestra el porcentaje de cambio de peso corporal durante los días de restricción calórica respecto al peso corporal del último día de medición basal para ambos grupos experimentales. El **Panel C** muestra el análisis cuantitativo del porcentaje de células eGFP⁺ del AHL que resultaron cFos⁺ para ambos grupos experimentales. El test estadístico realizado fue un test de Student no pareado. El recuadro ubicado en la derecha indica el valor de *t*, el grado de libertad y el valor de *p* correspondientes al test. Todos los valores se expresan como media ± EEM.

Estos resultados indican que la restricción calórica no aumenta la fracción de células AHL^{eGFP} c-Fos⁺.

4.2. Estudio de los efectos conductuales de la expresión de GHSR exclusivamente en el AHL

El segundo experimento llevado a cabo consistió en estudiar el rol de la actividad independiente de ligandos de las neuronas AHL^{GHSR}. Para esto, se usaron AAV para expresar GHSR exclusivamente en las neuronas del AHL de ratones y a continuación evaluar su rol en la conducta alimentaria. En particular, el experimento consistió en administrar un AAV que expresa la recombinasa Cre y la proteína reportera mCherry (AAV8/hSyn-mCherry-CRE) o un AAV control que solo expresa la proteína reportera eGFP (AAV9/U6-shsc-eGFP) en el AHL de ratones WT y ratones deficientes de GHSR (GHSR^{n/n}) en los cuales la expresión de GHSR se encuentra bloqueada y es dependiente de la presencia de Cre. Por lo tanto, con las inyecciones de estos AAV se indujo la expresión de GHSR y mCherry, o únicamente de eGFP en el AHL (**Fig. 32A**). La observación del tejido al microscopio de fluorescencia reveló la presencia de mCherry en el AHL en los niveles anteroposteriores esperados. La señal de eGFP se observó en el AHL y en regiones adyacentes en el sentido coronal, como en parte del DMH (**Fig. 32B**).

Luego de la administración de los AAV quedaron establecidos cuatro grupos experimentales: animales WT con AAV8/hSyn-mCherry-CRE (WT AAV-CRE) o AAV9/U6-shsc-eGFP (WT AAV-eGFP) y animales GHSR^{n/n} con AAV8/hSyn-mCherry-CRE (GHSR^{n/n} AAV-CRE) o AAV9/U6-shsc-eGFP (GHSR^{n/n} AAV-eGFP).

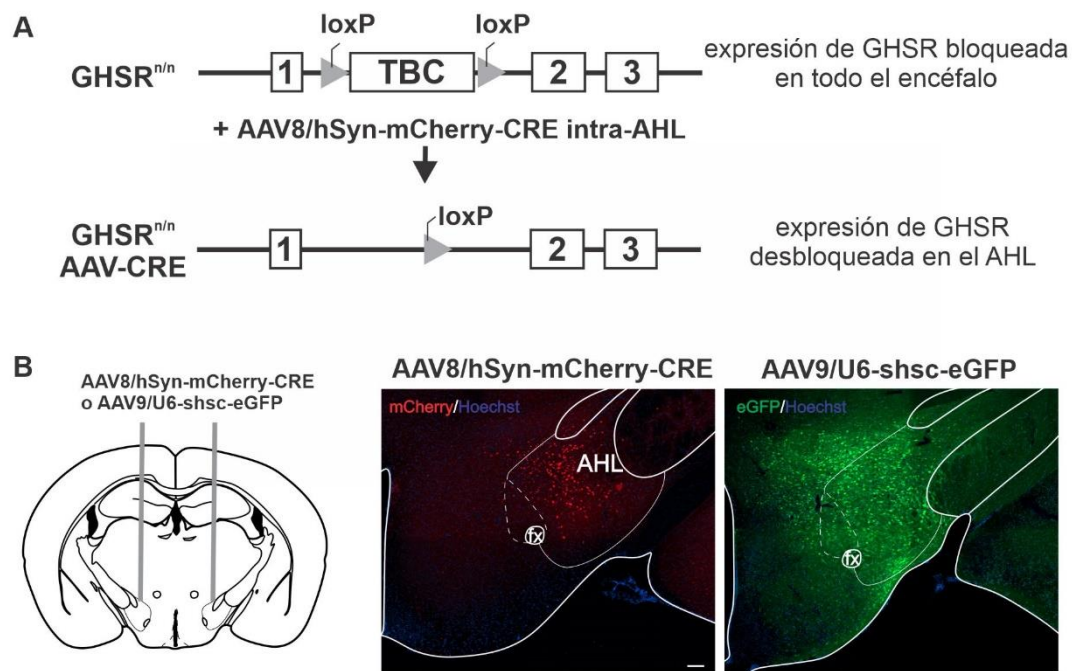


Figura 32. Expresión de GHSR exclusivamente en el AHL. El **Panel A** indica la construcción genética del animal $GHSR^{n/n}$ con el cassette de bloqueo de la transcripción (TBC) flanqueado por dos sitios *LoxP* (*esquema superior del panel*). La administración del AAV8/hSyn-mCherry-CRE en el AHL produce la escisión del TBC y restablece la expresión de GHSR en el AHL (*esquema inferior del panel*). El **Panel B** muestra cortes representativos de secciones coronales de encéfalo que incluyen el AHL correspondientes a animales $GHSR^{n/n}$ inyectados con AAV8/hSyn-mCherry-CRE (*centro*) y animales $GHSR^{n/n}$ inyectados con AAV9/U6-shsc-eGFP (*derecha*). La marca roja en la imagen del centro corresponde al mCherry en y la marca verde de la derecha corresponde al eGFP. Barra de escala: 100 μ m.

Luego de siete días de descanso postquirúrgico, los ratones fueron expuestos a dos protocolos conductuales. El primero de ellos fue un protocolo de atracción de por dieta con alto contenido en grasa (DACG) durante cuatro días descrito previamente por nuestro grupo de trabajo [191]. Para el análisis estadístico del consumo diario y del consumo acumulado de DACG, se juntaron los grupos correspondientes a los WT AAV-eGFP y los WT AAV-CRE debido a que no se encontraron diferencias en el consumo de DACG entre ambos grupos (**Fig. 33A**). Al comparar el consumo de DACG para los tres grupos experimentales con un ANOVA de dos vías de medidas repetidas, no observó interacción estadística entre el factor condición (*niveles de factor*: WT, $GHSR^{n/n}$ AAV-eGFP y $GHSR^{n/n}$ AAV-CRE) y el factor tiempo (*niveles de factor*: día 1, 2, 3 y 4), lo que no permitió comparar las medias de los factores. Por lo tanto, se compararon las medias de los niveles de cada factor (por ej.: WT día1 vs. WT día4). Este análisis mostró que tanto los animales WT como los $GHSR^{n/n}$ AAV-CRE aumentaron el consumo de DACG durante el segundo, tercer y cuarto día del protocolo respecto al primer día. Este aumento no se observó en los

animales $GHSR^{n/n}$ AAV-eGFP (**Fig. 33B**). Dichas diferencias no se observaron cuando se analizó el consumo de DACG acumulado durante todo el protocolo (**Fig. 33C**).

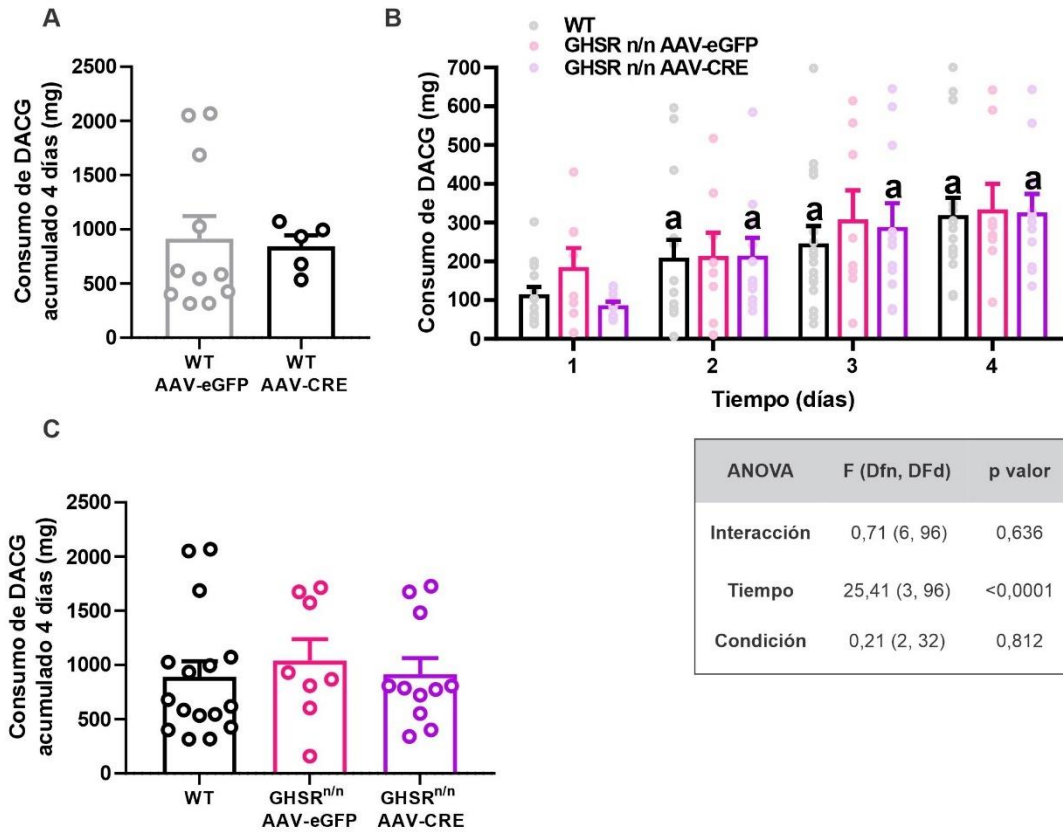


Figura 33. La figura muestra el análisis cuantitativo del consumo de DACG de animales WT, $GHSR^{n/n}$ AAV-CRE y $GHSR^{n/n}$ AAV-eGFP. El **Panel A** muestra el consumo de DACG diario para los WT AAV-CRE y los WT AAV-eGFP. El **Panel B** muestra el consumo de DACG en mg durante cada día del protocolo. El recuadro ubicado abajo del gráfico indica el valor del F , los grados de libertad y el valor de p correspondientes a cada factor (condición y tiempo) como también para la interacción entre ellos. a, $p > 0,05$ respecto a la media del mismo grupo experimental del día 1. El **Panel C** muestra el consumo de DACG acumulado durante todo el protocolo.

El segundo protocolo consistió en evaluar el consumo de una solución de sacarina en ratones expuestos a una restricción calórica del 60% de su consumo nocturno. En este experimento se incluyeron los grupos experimentales anteriormente mencionados: animales WT, $GHSR^{n/n}$ AAV-CRE y animales $GHSR^{n/n}$ AAV-eGFP. El porcentaje de pérdida de peso en los tres grupos experimentales fue similar durante los cuatro días de la RC (**Fig. 34A**). Para el análisis estadístico del consumo diario y del consumo acumulado de sacarina, se juntaron los grupos correspondientes a los WT AAV-eGFP y los WT AAV-CRE debido a que no se encontraron

diferencias en el consumo de sacarina entre ambos grupos (**Fig. 34B**). Se observó que los animales WT aumentaron el consumo de sacarina en el segundo, tercer y cuarto día de RC respecto al último día de consumo basal. Los animales GHSR^{n/n} AAV-CRE aumentaron su consumo respecto al día basal únicamente en segundo día de RC. Por otro lado, los animales GHSR^{n/n} AAV-eGFP no modificaron su consumo de sacarina en ningún momento de la RC (**Fig. 34C**). Al evaluar el consumo acumulado de sacarina durante los cuatro días de RC se observó que los animales WT consumieron más sacarina que los GHSR^{n/n} AAV-eGFP. Sin embargo, el consumo acumulado de los animales GHSR^{n/n} AAV-CRE no difirió de ninguno de los demás grupos experimentales (**Fig. 34D**).

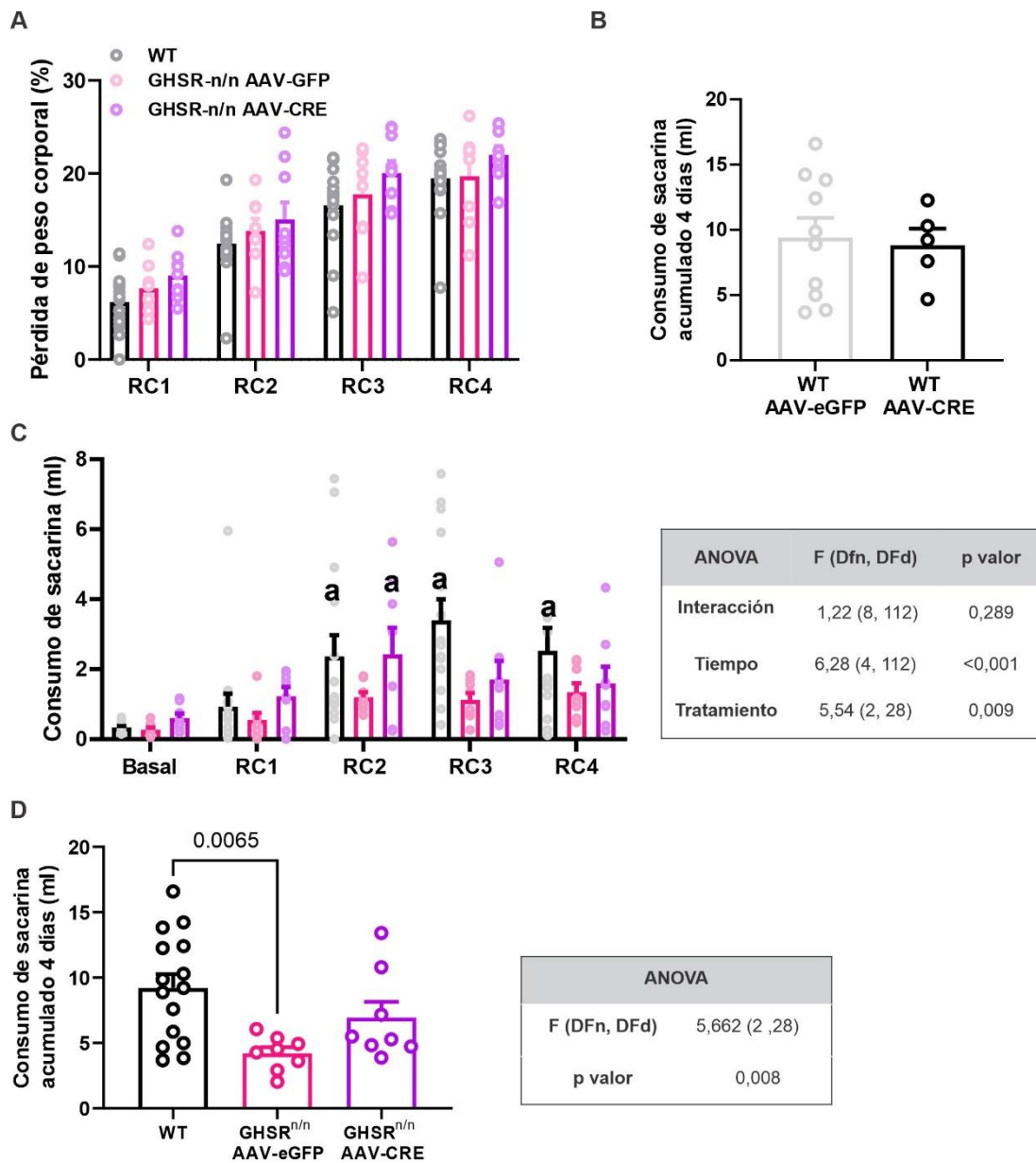


Figura 34. La figura muestra el análisis cuantitativo del consumo de sacarina de animales WT, GHSR^{n/n} AAV-CRE y GHSR^{n/n} AAV-eGFP. El **Panel A** muestra el porcentaje de pérdida de peso corporal durante la RC respecto al peso en el día basal, para los tres grupos experimentales. El **Panel B** muestra el consumo de sacarina acumulado en los cuatro días de RC para los WT AAV-eGFP y los WT AAV-CRE. El **Panel C** muestra el consumo de sacarina durante el último día de consumo basal y durante los cuatro días de restricción calórica (RC). El recuadro ubicado a la derecha del gráfico indica el valor del *F*, los grados de libertad y el valor de *p* correspondientes a cada factor (tratamiento y tiempo) como también para la interacción entre ellos. a, $p > 0,05$ respecto a la media del mismo grupo experimental del día basal. El **Panel D** muestra el consumo de sacarina acumulado durante los cuatro días de RC. El recuadro ubicado a la derecha del gráfico indica el valor del *F*, los grados de libertad y el valor de *p* correspondientes al ANOVA. Sobre el gráfico de barras se indica el valor de *p* del post-test correspondiente a la comparación entre WT vs. GHSR^{n/n} AAV-eGFP.

Estos resultados indican que los animales WT y los GHSR^{n/n} AAV-CRE aumentan su consumo de DACG y de sacarina durante la RC respecto a sus valores basales, pero no difieren significativamente de los animales GHSR^{n/n} AAV-eGFP, en los cuales no se observa dicho aumento.

DISCUSIÓN

En este trabajo de Tesis se estudiaron aspectos neuroanatómicos y fisiológicos de la expresión de GHSR en el AHL de ratones. Primero caracterizamos la distribución del fenotipo neuroquímico de las neuronas AHL^{GHSR} en un modelo animal reportero de GHSR. Luego estudiamos el efecto de la ghrelina sobre las neuronas AHL^{GHSR} en el desarrollo de conductas orexigénicas y el circuito neuronal que se recluta. En tercer lugar, caracterizamos la especificidad de LEAP2 como ligando de GHSR y comenzamos a abordar su acción sobre el AHL. Finalmente, estudiamos el rol de las neuronas AHL^{GHSR} en la modulación de conductas vinculadas al consumo de alimentos, sin la administración exógena de sus ligandos. Es relevante destacar que hasta el momento los estudios de las neuronas AHL^{GHSR} fueron realizados en ratas siendo este trabajo de Tesis el primero en realizarse en ratones. Estos estudios permitieron aumentar la comprensión acerca de cómo el AHL modula el consumo de alimentos, que circuitos neuronales están involucrados, y cuál es el rol de GHSR en dichos procesos.

En esta sección se discutirán distintos aspectos relacionados a los resultados y al marco teórico que conforma este trabajo de Tesis. La discusión estará conformada por dos subsecciones: en la primera de ellas se discutirán ciertos aspectos metodológicos del trabajo de Tesis mientras que en la segunda se abordarán algunos aspectos conceptuales.

Consideraciones metodológicas

Una herramienta metodológica que atravesó todo el trabajo fue el uso de ratones, tanto WT como genéticamente modificados, que permitieron abordar diferentes aspectos de la fisiología de GHSR. Como se comentó anteriormente, no existe bibliografía previa en nuestro conocimiento que haya estudiado las neuronas AHL^{GHSR} en ratones. El uso de ratones como modelo experimental posee numerosas ventajas incluyendo la rápida obtención de camadas, el bajo costo de mantenimiento y cortos tiempos de gestación. Otro aspecto beneficioso del uso de ratones es la gran variedad de modelos modificados genéticamente, que requieren bajo costo de mantenimiento y cuyos aspectos neuroanatómicos, fisiológicos y conductuales están ampliamente caracterizados. En este trabajo de Tesis se usaron distintas líneas de ratones genéticamente modificados, a saber: ratones GHSR^{eGFP}, ratones NPY^{hrGFP}, ratones GHSR^{n/n} y

ratones $GHSR^{eGFP}/Gad2^{cre/+}/Rosa26^{tdTomato}$. A continuación, discutiremos ciertos aspectos relevantes al uso de cada modelo animal.

Los ratones $GHSR^{eGFP}$ fueron generados a partir de la inserción de un cromosoma artificial bacteriano conteniendo la secuencia de eGFP bajo el promotor de GHSR, en el genoma del ratón [152]. Esta inserción sucede en forma azarosa, de manera que no se conocen cuantas copias funcionales de esta secuencia existen en el genoma, así como tampoco si dicha construcción afecta la función de genes que se encuentren en la región de inserción. Es importante destacar que este modelo animal no se comporta de la misma manera para cualquier región del encéfalo. Ciertos núcleos del hipotálamo, del mesencéfalo y de diferentes regiones corticales no poseen buena congruencia entre el ARNm de GHSR y la expresión de eGFP [152]. Es por esto que es importante la correcta validación del modelo animal para el objetivo del estudio, en este caso la identificación de las neuronas AHL^{GHSR} . En este trabajo de Tesis se realizó la validación de la expresión de eGFP en las AHL^{GHSR} a través del uso de una ISHH contra el ARNm de GHSR (ver más adelante), observando que el ~80% de las AHL^{eGFP} son AHL^{GHSR} , indicando que este animal es un modelo robusto de estudio de dicha población neuronal.

Otro modelo usado en esta Tesis fue el animal NPY^{hrGFP} el cual nos permitió visualizar las neuronas NPY mediante microscopía de fluorescencia ya que estos ratones expresan la hrGFP bajo el control del promotor de NPY. Este modelo animal fue de utilidad al momento de estudiar ciertos aspectos del circuito neuronal reclutado por la acción de la ghrelina en el AHL. En estos ratones la inserción de la construcción genética se realizó usando un cromosoma artificial bacteriano el cual fue insertado en el genoma del ratón de manera azarosa. La validación de este modelo indicó que hay altos niveles de congruencia entre la expresión de hrGFP y la expresión de NPY en el encéfalo [192]. Para marcar las neuronas que expresan los neuropéptidos NPY o AgRP en animales WT se precisa administrar colchicina ICV de manera de concentrar los péptidos en el cuerpo neuronal y así realizar posteriormente una inmunomarcación. Debido a esta complejidad de detección de NPY y AgRP, tener el modelo animal NPY^{hrGFP} disponible es de suma utilidad para estudiar dichas poblaciones neuronales [193].

En este trabajo se usaron ratones $GHSR^{n/n}$ los cuales tienen bloqueada la expresión de GHSR y permiten estudiar aspectos fisiológicos consecuencia de la ausencia de este receptor. En estos ratones la expresión de GHSR en diferentes núcleos del encéfalo de los animales es muy baja e incluso la administración de ghrelina no induce su efecto orexigénico ni la activación de las neuronas hipotálamicas, lo que indica que este animal es un buen modelo de deficiencia de expresión de GHSR [175, 194, 195]. Estos ratones poseen un cassette del bloqueo de la

transcripción (TBC del inglés para *transcription blocking cassette*) del gen de GHSR el cual dificulta la acción de la ARN polimerasa sobre la secuencia del gen de GHSR inhibiendo así la producción de su ARNm [175]. El TBC está flanqueado por sitios loxP los cuales son sensibles a la acción de la recombinasa Cre. Esta enzima reconoce los sitios loxP y actúa sobre ellos escindiendo así el TBC, lo que permite restaurar la expresión del gen de GHSR. Este sistema permite reactivar la expresión de GHSR de manera tejida específica dependiendo de la población celular en donde se exprese la Cre. Así, estos ratones se pueden cruzar con cepas de ratones que expresen la Cre en poblaciones celulares determinadas o pueden ser inyectados con vectores virales que expresen la Cre en las células de la región del encéfalo que infectan. Este último fue el caso usado en este trabajo de Tesis en donde se administró AAV que expresan la Cre junto al reportero fluorescente mCherry en el AHL de ratones $GHSR^{n/n}$ de manera de restaurar la expresión de GHSR únicamente en esta región. Algo a tener en cuenta en estos modelos animales es que, debido a que no expresan GHSR en ningún momento de su vida, podrían generar cambios durante el desarrollo a nivel de los circuitos neuronales que compensen la falta del receptor, de manera que no se observen diferencias fenotípicas con animales WT durante la adultez. De esta manera, los resultados obtenidos con estos modelos animales deben analizarse con cuidado, considerando posibles cambios compensatorios que se puedan darse durante la ontogenia del organismo [196, 197].

Para estudiar si las neuronas AHL^{GHSR} del ratón $GHSR^{eGFP}$ son $Gad2$ se usó el animal $GHSR^{eGFP}/Gad2^{cre/+}/Rosa26^{tdTomato}$, el cual proviene de la cruce de ratones $GHSR^{eGFP}$ y ratones $Gad2^{cre/+}/Rosa26^{tdTom}$. Estos últimos a su vez se generaron a partir de la cruce de ratones $Gad2^{cre/+}$ y ratones Ai14 los cuales expresan la proteína fluorescente roja tdTomato en el locus constitutivo de Rosa26 [198]. La expresión de la tdTomato depende de la acción de la Cre ya que estos ratones poseen en su genoma un TBC corriente arriba del gen de tdTomato. De esta manera, en el ratón $Gad2^{cre/+}/Rosa26^{tdTom}$ se expresará la tdTomato exclusivamente en las neuronas $Gad2$. La expresión de la tdTomato se puede visualizar directamente por microscopía de fluorescencia observándose células con gran intensidad de marcación roja, indicando alta expresión de la proteína [198]. Si bien esta expresión alta de la tdTomato podría producir toxicidad, no se encontraron cambios fenotípicos en los ratones así como tampoco en la morfología de las células que la expresan [198].

Otro modelo animal usado en esta Tesis fueron los ratones con el ARC-lesionado que se obtuvieron administrando MSG vía intraperitoneal al cuarto día postnatal. Este modelo animal ha sido ampliamente caracterizado en el pasado de manera de obtener una lesión específica en

las neuronas del ARC, sin lesionar otras regiones hipotalámicas o del resto del encéfalo [180, 193, 199–201]. Esta especificidad de la lesión está dada por el día postnatal en que se administra el MSG, la dosis usada y el hecho de que dicha inyección sea realizada por única vez. El MSG consiste básicamente en glutamato, el cual a altas concentraciones se vuelve excito-tóxico [202] lesionando así las poblaciones neuronales del ARC. Al día P4 la barrera hematoencefálica es más permeable al paso de sustancias de manera que aumenta la accesibilidad del MSG al ARC [202]. Si bien este modelo animal es de amplio uso y muy simple de obtener, es importante tener en cuenta que la lesión del ARC no posee especificidad en las poblaciones celulares que se ablationan, dañando así tanto las ARC^{NPY} como las ARC^{POMC}. El uso de animales genéticamente modificados, como los *knock out* para AgRP o NPY, o modelos en donde se inhibe farmacogenéticamente a ciertas poblaciones del ARC a través del uso de receptores DREADD (del inglés para *designer receptors exclusively activated by designer drugs*), podrían ayudar a obtener resultados más específicos y mejorar el entendimiento del circuito neuronal estudiado. De todas maneras, al menos los modelos genéticos, también suelen tener compensaciones en los circuitos neuronales durante el desarrollo del organismo [197]. Así, si bien el modelo de MSG tiene sus desventajas, resultó de mucha utilidad al momento del estudio de los circuitos inducidos por la acción de la ghrelina en el AHL.

En relación a los estudios funcionales, en este trabajo de Tesis se usó a la proteína c-Fos como marcadora de activación neuronal. Si bien esta proteína tiene un uso sumamente extendido en el campo de las neurociencias, hay ciertos aspectos a tener en cuenta al momento de usarla como herramienta de estudio. c-Fos es una proteína nuclear producto de la expresión del gen de *c-Fos*, un protooncogén correspondiente a la familia de genes de expresión temprana (IEGs de las siglas en inglés para *immediate and early expression genes*) ya que su expresión se produce inmediatamente en respuesta a un estímulo. c-Fos dimeriza con la proteína c-Jun formando el complejo AP1, el cual es un factor de transcripción que activa la expresión de numerosos genes relacionados a la proliferación y diferenciación celular, el control motor, la recepción de estímulos, procesos cognitivos, entre otros [203–205]. La vida media de c-Fos es de aproximadamente 2 hs, siendo el pico de expresión entre los 20 y 90 min post estimulación [206, 207]. Es por eso que en este trabajo las perfusiones de los animales para evaluar la expresión de c-Fos por inmunomarcación, se realizaron a los 2 hs post estimulación. Por otro lado, c-Fos también posee ciertos niveles de expresión en células de la glía [203], de manera que la interpretación de los resultados concernientes a c-Fos debe ser cuidadosa. La expresión de c-Fos se sitúa principalmente en el núcleo celular lo que permite que, mediante inmunotinciones,

se pueda realizar otra marcación citoplasmática en el tejido permitiendo así evaluar la activación transcripcional en una población neuronal específica [205]. En este trabajo se usó ampliamente c-Fos como marcador de activación transcripcional, el cual ha sido empleado previamente para estudiar la acción de ghrelina en el AHL [165, 189] como en otras regiones del encéfalo [166, 180, 201, 208, 209]. En este sentido, trabajos previos caracterizaron la inducción de c-Fos inducida por ghrelina [180, 210–212], mostrando que las administraciones periféricas de la hormona aumentan las células c-Fos+ en el ARC y en el área postrema del tallo encefálico, mientras que administraciones ICV inducen estos aumentos también en otros núcleos encefálicos, incluyendo al AHL [180, 208]. Estas diferencias entre las regiones en las que se induce c-Fos con diferentes vías de administración de la ghrelina, indican que las administraciones ICV de la hormona producen cambios en la actividad de las neuronas que no se observan con las administraciones periféricas.

Otro aspecto técnico a tener en cuenta es la determinación de la presencia o no de ciertos marcadores a través de inmunomarcaciones. Las inmunomarcaciones de este trabajo de Tesis se realizaron para detectar c-Fos o para detectar la presencia de neuropéptidos en soma de neuronas. Algunos de estos neuropéptidos precisan concentrarse en el soma para poder ser detectados ya que los anticuerpos comerciales reconocen el neuropéptido maduro, el cual suele ubicarse en las fibras y terminales axónicas. Así, para concentrar el neuropéptido, se inyectaron animales con colchicina ICV y se los perfundió luego de 48hs. La colchicina actúa inhibiendo el transporte axonal evitando la polimerización de los microtúbulos e impidiendo así el tráfico de los neuropéptidos desde el soma hasta las terminales axónicas [213, 214]. La administración de colchicina en el ventrículo cerebral agrega un grado de variabilidad en los experimentos, lo cual debe tenerse en cuenta al momento de realizarlos. Sumado a esto, la colchicina por sí sola induce aumentos de c-Fos en la región del encéfalo donde se administra, de manera que el tejido de animales inyectados con esta solución no fue usado luego para determinar activación neuronal por c-Fos.

En el último apartado de resultados de este trabajo de Tesis se usaron AAV con el fin de restaurar la expresión de GHSR en animales GHSR^{n/n}. El empleo de vectores virales que expresen la Cre recombinasa ha sido de gran utilidad durante las últimas décadas en el campo de las neurociencias [215–219]. En particular el uso de AAV como vectores génicos tiene grandes ventajas como la baja inmunogenicidad y baja toxicidad que provocan en el tejido huésped, así como la expresión de los transgenes por largos períodos de tiempo [215, 220]. Además, existen múltiples serotipos los cuales han sido caracterizados para distintas regiones hipotalámicas, entre ellas el AHL [221]. Aquí se usó un AAV que exprese la recombinasa Cre y un reportero

fluorescente rojo (mCherry), y un AAV control que solo expresa el reportero fluorescente verde (eGFP). La validación de la re-expresión de GHSR en el AHL de los animales GHSR^{n/n} AAV-CRE se realizó a través de la visualización de la marca de mCherry en el AHL por microscopía de fluorescencia. Otra aproximación posible para realizar dicha validación podría haber sido la inmunomarcación contra GHSR en el AHL, de manera de detectar directamente la presencia del receptor en el tejido. Lamentablemente, la detección de GHSR por inmunomarcación es especialmente difícil y en la actualidad no existen anticuerpos comerciales confiables para detectarlo [152, 222].

Por otra parte, en esta sección de resultados se usaron distintos protocolos conductuales para evaluar el efecto de la re-expresión de GHSR en el AHL. Estos protocolos incluyeron la exposición a DACG, la restricción calórica y la exposición a una solución de sacarina.

El modelo animal de atracón con DACG ha sido empleado en previamente por nuestro grupo de trabajo [44, 191, 195]. Dicho modelo consiste de tres aspectos relevantes en los episodios de atracón: la gran cantidad de alimentos consumida, el corto período de tiempo en que se consume, y la pérdida de control sobre la ingesta [223, 224]. La gran cantidad de alimento consumida está asociada al contenido energéticamente denso de los alimentos, mientras que el corto período de tiempo está asignado en el diseño experimental en donde los ratones poseen disponible el pellet de DACG solo durante dos horas [223, 224]. Por otro lado, la pérdida de control sobre la ingesta de DACG está representada en el escalado en la hiperfagia a lo largo de los días en donde cada día los ratones consumen más DACG que el día previo [224, 225]. Así, el protocolo de consumo de DACG usado en este trabajo fue de utilidad para modelar la conducta de atracón en ratones.

Otro protocolo conductual llevado a cabo fue el de restricción calórica al 60%. Este protocolo fue empleado con el objetivo de aumentar la relación ghrelina/LEAP2 en plasma como ha sido reportado previamente [38, 226]. A su vez, datos aún no publicados de nuestro laboratorio indican que la expresión de GHSR se encuentra aumentada en los animales restringidos respecto a los animales alimentados *ad libitum*. Así, la restricción calórica nos permitió estudiar el rol de las neuronas AHL^{GHSR} en una situación metabólica en donde el sistema ghrelina/LEAP2/GHSR cobra relevancia funcional. Para realizar la restricción calórica se midieron los consumos nocturnos de alimento para cada animal durante cuatro días previo al comienzo de la restricción. De esta manera, el alimento que se le otorgó a cada ratón durante la restricción corresponde al 40% de la cantidad diaria que consumió durante las mediciones basales, permitiendo así realizar una restricción más precisa acorde al consumo nocturno de cada animal.

En otro grupo de experimentos, a los animales restringidos calóricamente e inyectados con AAV se los expuso diariamente a una solución del 0,1% de sacarina y se evaluó su consumo durante un período de cuatro horas. Esto se realizó con el objetivo de estudiar si el sistema ghrelina/LEAP2/GHSR modula el consumo de sustancias con alto valor hedónico como la sacarina. La concentración de sacarina usada en estos experimentos ha mostrado ser apetecible en ratones [227, 228] y, al no poseer contenido calórico, es de utilidad para estudiar conductas alimenticias vinculadas a los circuitos neuronales hedónicos y sin intervenir los circuitos homeostáticos [228].

Consideraciones conceptuales

Caracterización neuroanatómica de las neuronas AHL^{GHSR} y respuesta de las mismas a ghrelina

Como fue comentado anteriormente, el modelo $GHSR^{eGFP}$ fue de especial interés en este trabajo de Tesis para poder estudiar distintos aspectos de las neuronas AHL^{GHSR} . Dentro de los estudios anatómicos en los cuales se usó el $GHSR^{eGFP}$, las cuantificaciones de neuronas AHL^{eGFP} marcadas con inmunotinción cromogénica indicaron que hay un total de ~800 neuronas AHL^{GHSR} en el encéfalo de cada ratón. Trabajos previos mostraron que la estimulación de algunos cientos de neuronas ARC^{NPY} alcanza para inducir vorazmente el consumo de alimento [229], lo que indica que el número de neuronas AHL^{GHSR} encontrado podría ser suficiente para mediar efectos en la conducta alimentaria. Estas 800 neuronas se distribuyen a lo largo de 20 de los 21 bregmas que corresponden al AHL según el Atlas del cerebro del ratón de Paxinos & Franklin. Esta distribución es homogénea en todo el núcleo ya que no se encontraron agrupamientos diferenciales entre las AHL^{GHSR} , en contraste a lo observado con neuronas que expresan GHSR en otras regiones del encéfalo, como el núcleo del tracto solitario [209]. La inmunotinción cromogénica contra eGFP en estos animales también permitió estudiar la morfología de las AHL^{GHSR} . Aquí se encontró que la mayoría de las AHL^{GHSR} posee características citoarquitectónicas similares lo que sugiere que podrían constituir un único grupo de neuronas en el sentido funcional.

La administración de ghrelina en el AHL de ratones evocó aumentos en el consumo de alimento respecto al grupo inyectado con solución vehículo. La magnitud del alimento consumido (~10 veces más que los consumido por el grupo vehículo) y la relativa baja dosis de ghrelina administrada (30 pmol/lado comparado con la dosis de 300 pmol/lado usada en estudios en rata [165, 166]) indican que el efecto orexigénico de la ghrelina en el AHL es muy potente. A su vez,

este efecto parecería ser selectivo al consumo de alimento y no a otras conductas ya que no se observaron cambios en el tiempo de excavación, de exploración vertical, de saltos o de acicalamiento. La selectividad de poblaciones neuronales de un mismo núcleo hacia diferentes conductas ha sido reportada previamente para el AHL, dentro de las neuronas AHL^{GABA} como de las AHL^{Nts} [93, 119]. La administración de ghrelina intra-AHL tampoco produjo cambios en el consumo de O₂ lo cual coincide con resultados previos usando inyecciones centrales de ghrelina tanto en ratas como en ratones, mostrando también que la administración central de ghrelina no aumenta el gasto energético en ausencia de ingesta de alimentos [230, 231]. Un aspecto a tener en cuenta al estudiar los efectos evocados por la administración de ghrelina intra-AHL, es que estos pueden deberse en parte a la activación de GHSR presente en terminales axónicos de neuronas que proyectan hacia el AHL, y no solo por la activación de las AHL^{GHSR} en sí. Este fenómeno ha sido observado previamente en otras regiones del encéfalo como el PVN o el NTS [201, 232]. En particular, las neuronas glutamatérgicas del hipocampo ventral que expresan GHSR y que inervan a las AHL^{orex} inducen el consumo de alimento, aunque resta saber si GHSR se expresa en las terminales de dichas neuronas hipocampales [233].

En esta sección de resultados se clarifican algunos aspectos neurobiológicos que median el efecto orexigénico de la ghrelina en el AHL. El mapeo de la inducción de c-Fos en las diferentes regiones del encéfalo mostró un aumento de células c-Fos+ en el ARC, indicando que este núcleo podría estar “río abajo” de la acción de ghrelina en el AHL. Además, la ghrelina administrada en el AHL no indujo el consumo de alimento en ratones con el ARC-lesionado, indicando que el ARC es requerido para la que la ghrelina induzca dicho efecto orexigénico cuando actúa en el AHL. En el mismo sentido, la ghrelina intra-AHL estimuló c-Fos en las AHL^{orex} y en las ARC^{NPY}, ambas poblaciones conocidas por inducir fuertemente el consumo de alimentos [229]. Sorprendentemente, encontramos que GHSR no se expresa en las AHL^{orex}, pero el bloqueo farmacológico del receptor 1 de orexina en animales inyectados con ghrelina intra-AHL bloqueó el consumo de alimento y la inducción de c-Fos en las ARC^{NPY}. Trabajos previos mostraron que las neuronas AHL^{orex} inervan a las neuronas ARC^{NPY} [149] y que la inyección central de orexina induce la activación de las ARC^{NPY} de manera dependiente del receptor 1 de orexina [161, 184]. Por lo tanto, se podría hipotetizar que la ghrelina actúa a través de las neuronas AHL^{GHSR} las cuales, a través de algún mecanismo desconocido, activan a las neuronas AHL^{orex} las cuales a su vez reclutan a las neuronas ARC^{NPY} induciendo así el consumo de alimento. Como fue comentado anteriormente, no se puede descartar la posibilidad que el efecto orexigénico de la ghrelina intra-AHL sea, en parte, por la acción de la hormona sobre GHSR ubicado en las terminales

axónicas de las neuronas ARC^{NPY} que inervan al AHL [156]. Esta hipótesis debe ser abordada en estudios futuros para clarificar la relación entre el ARC y el AHL en cuanto a la señalización de GHSR.

Inesperadamente, los resultados indicaron que las neuronas AHL^{orex} no expresan GHSR. Esta observación está en línea con reportes de análisis transcriptómicos de las AHL^{orex} del AHL en donde no se encontró expresión significativa de GHSR en ratones [181]. Por otro lado, reportes previos mostraron que la ghrelina despolariza e incrementa la frecuencia de disparos de potenciales de acción en 6 de 9 neuronas aisladas de AHL^{orex} de ratón [234]. Este número de neuronas parecería ser pequeño considerando las ~2800 neuronas AHL^{orex} presentes en el encéfalo [149, 235]. Debido a la diferencia entre las aproximaciones experimentales, es difícil identificar las razones que subyacen a la aparente discrepancia entre ambos resultados. A su vez, la observación de que la administración de ghrelina en el AHL recluta indirectamente a las AHL^{orex} está en consonancia con la idea de que las AHL^{orex} están fuertemente reguladas por conexiones locales [236, 237].

Los resultados también indicaron que las AHL^{GHSR} no expresan MCH, parvalbúmina, somatostatina, oxitocina, TRH o galanina, algunas de las cuales median la activación de las AHL^{orex} inducida por ghrelina [236]. Además, se encontró que las AHL^{GHSR} tampoco expresan GAD65, un marcador de una subpoblación de neuronas GABAérgicas. Debido a que la herramienta metodológica solo nos permitió marcar las neuronas GAD65, no podemos descartar que GHSR se exprese en otras poblaciones de neuronas GABA como aquellas que expresan la isoforma GAD67 o el transportador vGat [238]. La población de neuronas GAD67 no es particularmente abundante en el AHL [238] contrario a la población de neuronas que expresan vGat, cuya activación induce de manera potente conductas tanto apetitivas como consumatorias relacionadas a la alimentación [93]. Por otro lado, se observó que el ~8% de las neuronas AHL^{GHSR} expresan nNOS, la cual produce óxido nítrico que actúa, en parte, de manera local inhibiendo a las neuronas AHL^{orex} [130]. Además, se encontró que el 2% de las AHL^{GHSR} expresan neurotensina. Estudios previos indican que la ghrelina no induce aumentos de c-Fos en las neuronas AHL^{Nts} las cuales poseen un fuerte rol anorexigénico [239], lo que indica que la ghrelina no estaría ejerciendo su rol orexigénico actuando a través de esta población neuronal. Así, a pesar de los esfuerzos realizados, no se logró develar el fenotipo neuroquímico de mayoría de las AHL^{GHSR}. En este sentido, una posibilidad latente es que las AHL^{GHSR} sean neuronas glutamatérgicas, fenotipo que no hemos evaluado. Si bien las AHL^{orex} expresan glutamato, existen poblaciones de neuronas AHL^{Glut} que forman una población independiente de las AHL^{orex}

y que modulan conductas alimentarias [240]. La activación de las AHL^{Glut} induce conductas aversivas y la administración periférica de ghrelina induce la activación de proyecciones de estas neuronas hacia la LHb [241, 242]. Esto parecería indicar que esta población neuronal no media los efectos orexigénicos de la administración de la ghrelina en el AHL. De todas maneras, se precisan futuros experimentos para dilucidar el rol de estas neuronas en la acción de ghrelina sobre el AHL.

Luego, encontramos que la administración de ghrelina en el AHL de ratones aumenta de manera transitoria su locomoción. Esto podría ser una evidencia funcional de la acción de la ghrelina en el AHL ya que se ha demostrado que la estimulación eléctrica de esta región estimula el inicio de la locomoción en ratas [243, 244]. El sustrato neurobiológico involucrado en la estimulación de la locomoción por la acción de la ghrelina en el AHL no ha sido abordado en esta Tesis, pero podría implicar el reclutamiento de la vía mesolímbica ya que estudios previos mostraron que la administración de ghrelina en el AHL potencia la liberación de dopamina en el NAcb [245]. Además, esta locomoción inducida por ghrelina probablemente involucre a las AHL^{orex} ya que estas inervan múltiples áreas vinculadas con la locomoción como la sustancia nigra, el AVT, el NAcb, la corteza motora, el locus coeruleus y ciertos núcleos de la médula espinal [149, 183, 246]. En particular, en los animales inyectados con ghrelina en el AHL no se observó inducción de c-Fos en las áreas correspondientes a la vía mesolímbica como tampoco en las neuronas TH+ de dicha región. Sin embargo, el uso de c-Fos como marcador de activación de la vía mesolímbica está en debate ya que posee una inducción débil ante la activación eléctrica de las neuronas dopaminérgicas del AVT [247, 248]. Además, la administración de ghrelina en el AHL de ratas induce el estado de vigilia [249], por lo que el grado en que este estado afecta el consumo de alimento y la locomoción inducida por ghrelina, es incierto. De todas maneras, disociar estos efectos del AHL, muchas veces producidos por las mismas poblaciones neuronales, es una tarea muy difícil de llevar a cabo experimentalmente [250].

Los estudios en los que se usó ghrelina fluorescente indican que tanto la ghrelina presente en el plasma como en el líquido cefalorraquídeo no acceden al AHL de manera aguda. Estas observaciones se condicen con estudios tanto de nuestro grupo de trabajo [185, 251] como de otros [252], en donde elevaciones rápidas de la ghrelina circulante no impactan en regiones encefálicas que estén localizadas lejos de zonas con capilares fenestrados o de los ventrículos cerebrales, estructuras a través de las cuales la ghrelina podría acceder al encéfalo [185]. En el experimento donde se evaluó la accesibilidad al AHL, se usó una versión de ghrelina unida al fluoróforo DY-647P el cual emite fluorescencia en la longitud de onda correspondiente al rojo lejano, visible con fluorescencia directa. En trabajos anteriores de nuestro laboratorio [180], se

realizaron ensayos similares usando una versión de la ghrelina unida a fluoresceína la cual se visualizó a través de inmunotinciones cromogénicas [253]. En estos trabajos se detectó señal de ghrelina fluorescente en el AHL de ratones solo cuando la hormona se administró en el líquido cefalorraquídeo. En cambio, en los experimentos presentados en esta Tesis, una delimitación neuroanatómica más precisa del AHL y administraciones de concentraciones menores de ghrelina fluorescente permitieron determinar que la hormona no accede a dicha región. También, se encontró que la administración central de ghrelina induce aumentos de c-Fos en ~10% de las neuronas AHL^{GHSR} lo cual podría suceder a través de mecanismos indirectos dado los resultados previos que indican que la ghrelina no accede al AHL. Es de destacar que, dado que la ghrelina no se produce en el cerebro, la hormona precisa acceder al encéfalo a desde la periferia [35, 185]. Así, es probable que la acción de GHSR en el AHL sea a través de mecanismos independientes de su unión a ghrelina, los cuales comprenden tanto la actividad constitutiva del receptor como la actividad dependiente de la heterodimerización con otros receptores acoplados a proteína G [254–256].

Respuesta de las neuronas AHL^{GHSR} a LEAP2 y caracterización funcional del péptido

En el año 2018 Ge y colaboradores encontraron un nuevo ligando endógeno para GHSR: LEAP2 [38]. Dado su reciente descubrimiento, inicialmente debimos caracterizar ciertos aspectos fisiológicos del LEAP2 y del trazador desarrollado para su estudio, previo a evaluar sus efectos sobre el AHL. Dicha caracterización consistió en estudiar qué región del péptido mantiene la bioactividad, la especificidad del trazador F-LEAP2 hacia GHSR y su accesibilidad a diferentes núcleos del encéfalo.

El péptido maduro de LEAP2 contiene 40 aminoácidos y dos puentes disulfuro en el extremo C-terminal. Debido a que no se conocía qué región del péptido es la que une a GHSR y por lo tanto es bioactiva, se trabajó con una variante de LEAP2 que mantiene los primeros 12 residuos de la región N-terminal (LEAP2 1-12-NH₂), una variante que mantiene los últimos 20 residuos de la región C-terminal (LEAP2 15-40-OH) y una variante correspondiente al péptido maduro (LEAP2 1-40). Los resultados indicaron que la región N-terminal del péptido mantiene la bioactividad al inhibir el efecto orexigénico de la ghrelina. Esto se observó administrando las variantes de LEAP2 tanto por vía subcutánea como ICV. Estudios complementarios de nuestro grupo [45] y de otros [257, 258] mostraron resultados similares a los nuestros a través de modelos *in vitro* en donde se usaron variantes mutadas tanto de LEAP2 como de GHSR, permitiendo así identificar con

precisión que residuos del péptido son relevantes para la unión con el receptor. En particular estos trabajos identificaron los primeros aminoácidos de LEAP2 desde el extremo N-terminal como residuos clave en su unión con el receptor, en línea con lo observado en este trabajo de Tesis.

Con el objetivo de caracterizar aspectos neuroanatómicos de la acción de LEAP2 en el encéfalo, usamos el trazador F-LEAP2 el cual consiste en los primeros 17 residuos de LEAP2 desde el extremo N-terminal unidos al fluoróforo DY-647-PI el cual puede ser observado en el microscopio de fluorescencia en el rango del rojo lejano. Al inyectar F-LEAP2 vía ICV en ratones WT observamos que el patrón de pegado y los núcleos del encéfalo que poseían marca del fluoróforo tenían una correspondencia muy grande con aquellos marcados en el pasado con versiones fluorescentes de la ghrelina [185, 190] y no se observó marca de F-LEAP2 en regiones en donde no se haya reportado la presencia de GHSR. Esto indicó que LEAP2 mantiene especificidad de unión a GHSR y en particular a las regiones del encéfalo que lo expresan. Posteriormente, esta especificidad fue confirmada realizando un ensayo de competencia en donde primero se administró ghrelina nativa o LEAP2(1-40) vía ICV y luego F-LEAP2 en ratones WT. Así, luego se evaluó la presencia de señal fluorescente en el ARC y se observó que la unión de F-LEAP2 es bloqueada por ghrelina o LEAP2, indicando que su unión al ARC es específica. En el mismo sentido observamos que F-LEAP2 mantiene la bioactividad al inhibir el efecto orexigénico de la ghrelina, indicando nuevamente que esta molécula es un trazador confiable para estudiar la fisiología de LEAP2.

Es interesante destacar que en el mapeo neuroanatómico realizado con F-LEAP2 no se encontró marca fluorescente en el AHL, similar a lo observado con la F-ghrelina. Estos resultados indicarían que la accesibilidad de ciertas moléculas, incluso cuando son administradas en el LCR, es limitada a ciertas regiones del parénquima, generalmente aquellas cercanas al sistema ventricular [185, 253, 259, 260]. En el mismo sentido, la inyección de LEAP2(1-40) ICV no indujo aumentos del número de células c-Fos+ en el AHL, contrario a lo observado con la administración de ghrelina por la misma vía, indicando que el AHL se activa en respuesta a la ghrelina, pero no a LEAP2. Esta combinación de resultados podría parecer paradójica ya que, si bien ni la ghrelina ni LEAP2 ICV acceden al AHL, la primera induce su activación mientras que el segundo no. Ahora bien, la ghrelina ICV podría actuar a través de vías indirectas reclutando poblaciones de neuronas periventriculares que inerven al AHL y actúen induciendo c-Fos en esta región. También, la inyección de LEAP2 ICV podría inducir c-Fos en un grupo de neuronas del AHL e inhibirlo en otro grupo de manera que el número de células c-Fos+ para todo el AHL no difiera

entre los grupos experimentales, explicando así los resultados obtenidos. De todas maneras, nuevos experimentos se necesitarían para abordar estas hipótesis.

En concordancia con los resultados que indican que ni ghrelina ni LEAP2 acceden al AHL, GHSR podría actuar en las AHL^{GHSR} a través de su actividad independiente de ligandos, como fue comentado en el apartado anterior. Esta actividad de GHSR ha sido observada previamente tanto en estudios *in vitro* [58, 62, 255] como *in vivo* [66, 261]. De todas maneras, se precisan realizar nuevos experimentos para estudiar el grado en que la señalización de GHSR en las neuronas AHL^{GHSR} está dada por su actividad independiente de ligandos.

Estudio del rol de las neuronas AHL^{GHSR} en la modulación de conductas alimentarias

En esta sección se estudió el rol de las neuronas AHL^{GHSR} en la modulación de conductas alimentarias de manera independiente de la administración de ghrelina y LEAP2.

Primero se evaluó la inducción de c-Fos en las AHL^{GHSR} en un contexto en donde la relación ghrelina/LEAP2 en plasma está incrementada. Los resultados indicaron que las neuronas AHL^{eGFP} del ratón GHSR^{eGFP} no se activaron ante una restricción calórica de cinco días. Estos datos sugieren que incluso en situaciones donde la ghrelina plasmática está aumentada, está no logra inducir cambios en la activación transcripcional en las neuronas AHL^{GHSR}. De todas maneras, dado que c-Fos es una proteína de expresión rápida, podría suceder que no sea el marcador óptimo para evaluar la activación de las neuronas ante desafíos de largo término como lo es la restricción calórica [205, 206, 262].

Posteriormente se evaluó el efecto de la expresión de GHSR exclusivamente en el AHL a través del uso de AAV. Esto se realizó en ratones WT y GHSR^{n/n} inyectados en el AHL con un AAV que expresa la Cre recombinasa o con un AAV control. A dichos ratones se los expuso a dos protocolos conductuales: un protocolo de atracón con DACG y un protocolo de consumo de sacarina durante una restricción calórica del 60%.

El protocolo de atracón con DACG ha sido caracterizado previamente por nuestro grupo de trabajo [191, 195] en donde se observó que los ratones WT presentan una hiperfagia en el consumo de la DACG a lo largo del protocolo. Dicho fenotipo no se observó en los ratones GHSR^{n/n} y en el mismo sentido, se reportó que los animales WT consumieron significativamente más DACG que los GHSR^{n/n} tanto en el consumo diario como en el acumulado. Además, se

observó un aumento de células c-Fos+ en núcleos de la vía mesolímbica y en el AHL en los animales WT al finalizar el último día de consumo de DACG. Entonces, debido a que el consumo de DACG en este protocolo involucra la expresión de GHSR y la activación del AHL, en este trabajo de Tesis se estudió el rol de las neuronas AHL^{GHSR} en el atracón con DACG. Si bien no se observaron diferencias entre el consumo diario o acumulado de DACG entre ratones WT, GHSR^{n/n} AAV-eGFP y GHSR^{n/n} AAV-CRE, se reportaron diferencias en los grupos WT y GHSR^{n/n} AAV-CRE respecto al consumo del primer día de exposición a la dieta del mismo grupo. Estos resultados indican que las neuronas AHL^{GHSR} participan en el fenotipo de hiperfagia ascendente, la cual está asociada con la pérdida de control progresiva en el consumo de alimentos [263, 264] como de otras sustancias de abuso [225, 265]. Trabajos previos del grupo identificaron que la expresión de GHSR exclusivamente en las neuronas dopaminérgicas es suficiente para producir dicho fenotipo de atracón con DACG [195]. Dado que las inervaciones del AHL hacia las neuronas dopaminérgicas de la vía mesolímbica modulan conductas hedónicas de la alimentación [78, 93, 240], es posible que la expresión redundante de GHSR en varios núcleos de estos circuitos sea suficiente para producir el fenotipo de atracón.

El segundo protocolo consistió en evaluar el consumo de sacarina en ratones sujetos a una restricción calórica del 60% durante cuatro días. Una restricción calórica de esta magnitud produce una elevación en los niveles plasmáticos de ghrelina, descenso en los niveles de LEAP2 y aumento de las conductas apetitivas [231, 266, 267] incluyendo el aumento en el efecto recompensante que produce la estimulación eléctrica intra-AHL [268]. Dado que en esta condición metabólica el AHL modularía conductas recompensantes, se decidió evaluar el rol de las AHL^{GHSR} en el consumo de sacarina en ratones bajo restricción calórica, dado que la sacarina es un endulzante artificial que mantiene únicamente propiedades hedónicas ya que no posee contenido calórico [269, 270]. Aquí se observó que los animales WT y GHSR^{n/n} AAV-CRE consumieron significativamente más sacarina en el RC2 respecto al día previo a la RC. Esto no se observó en los animales GHSR^{n/n} AAV-eGFP. Al evaluarse el consumo acumulado de sacarina durante toda la RC, se observó que los animales WT consumieron más sacarina que los GHSR^{n/n} AAV-eGFP, sin embargo, no se observaron diferencias entre los GHSR^{n/n} AAV-CRE y el resto de los grupos experimentales. Estos resultados indican que GHSR participa en la modulación del consumo de las sustancias con alto valor hedónico en situaciones de déficit energético. Además, las neuronas AHL^{GHSR} podrían estar involucradas en dicho fenotipo, aunque su participación es dudosa dado que los animales GHSR^{n/n} AAV-CRE únicamente aumentaron su consumo en el día RC2 y no presentaron diferencias con los GHSR^{n/n} AAV-eGFP en el consumo acumulado. Un

factor involucrado en estos experimentos, es la variabilidad en la recombinación génica producto de la inyección de los AAV. Dicha variabilidad en la re-expresión de GHSR en el AHL de los animales GHSR^{n/n} AAV-eGFP podría reflejarse en la dispersión en el consumo de sacarina, disminuyendo así la capacidad de evidenciar diferencias conductuales.

En resumen, estos ensayos indican que las neuronas AHL^{GHSR} participan de aspectos vinculados al consumo de alimentos con alto valor hedónico, aunque esto no se observó en el consumo de líquidos como sacarina en ratones bajo situaciones de déficit energético. Dados estos resultados, resta preguntarse ¿cuál es el circuito reclutado ante la re-expresión de GHSR en el AHL para inducir el consumo de alimentos apetecibles? Previamente observamos que la inyección de ghrelina en el AHL indujo el consumo de alimentos e involucró la activación de neuronas del núcleo ARC, pero no de núcleos de la vía mesolímbica como el AVT o el NAcB. Ahora bien, dado que la re-expresión de GHSR induce el consumo de alimentos apetecibles y que tanto la ghrelina como LEAP2 no acceden al AHL, es posible que la sola presencia de GHSR en el AHL involucre la activación de neuronas del AVT o del NAcB para inducir el consumo de DACG. Estudios previos de nuestro grupo de trabajo indicaron que el consumo de DACG involucra la activación de las neuronas dopaminérgicas de la vía mesolímbica y que la presencia de GHSR en estas neuronas es necesaria para inducir dicha conducta [191, 195]. De esta manera, estos resultados respaldan la hipótesis de que núcleos de la vía mesolímbica podrían participar en el consumo de DACG mediado por la expresión de GHSR en el AHL. En el mismo sentido, se podría proponer otra hipótesis en donde el circuito neuronal reclutado para inducir el consumo de DACG luego de la re-expresión de GHSR en el AHL, es el mismo que aquel que se activa ante la administración de ghrelina en el AHL, es decir AHL^{GHSR}→AHL^{orex}→ARC^{NPY}. Dado que la conducta de atracón con DACG está fuertemente vinculada a la actividad de núcleos de la vía mesolímbica [271] es probable que sean los núcleos de esta vía y no el núcleo ARC los que medien el atracón con DACG en los ratones GHSR^{n/n} AAV-CRE. De todos modos, se precisan nuevos ensayos que confirmen cual es la vía neuronal involucrada en esta conducta.

Por último, es importante destacar que los experimentos realizados en este trabajo de Tesis incluyeron únicamente ratones machos. Trabajos previos mostraron que el efecto orexigénico de la ghrelina es más potente en machos que en hembras, tanto en ratones como en ratas [272, 273]. Además, se reportó que la acción de la ghrelina específicamente en el AHL aumenta el consumo de alimento en ratas tanto machos como en hembras, aunque solo induce conductas vinculadas a la búsqueda de alimento solo en hembras [164]. En función de estos reportes,

futuros estudios son necesarios para investigar si existe dimorfismo sexual en la fisiología de las neuronas AHL^{GHSR}.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de Tesis nos permiten proponer las siguientes conclusiones:

- Las neuronas AHL^{GHSR} se distribuyen de manera homogénea en todo el AHL.
- La acción de la ghrelina sobre las neuronas AHL^{GHSR} de ratones induce el consumo de alimento y la locomoción de manera transitoria.
- El efecto orexigénico de la ghrelina sobre el AHL de ratones involucra indirectamente a las neuronas AHL^{orexina} y a las neuronas ARC^{NPY}.
- Aumentos de LEAP2 en el LCR no inducen la activación del AHL.
- Tanto la ghrelina como el LEAP2 presentes en el plasma o en el LCR no acceden al AHL, aunque la ghrelina presente en el LCR impacta en la actividad de poblaciones neuronales del AHL.
- La presencia de GHSR exclusivamente en las neuronas AHL^{GHSR} modula el consumo de alimentos apetecibles.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kojima M, Kangawa K (2005) Ghrelin: structure and function. *Physiol Rev* 85:495–522. <https://doi.org/10.1152/physrev.00012.2004>
2. Kojima M, Hosoda H, Date Y, et al (1999) Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402:656–660. <https://doi.org/10.1038/45230>
3. Kaiya H, Kangawa K, Miyazato M (2014) Molecular evolution of GPCRs: Ghrelin/ghrelin receptors. *J Mol Endocrinol* 52:T87-100. <https://doi.org/10.1530/JME-13-0175>
4. Tine M, Kuhl H, Teske PR, et al (2016) Diversification and coevolution of the ghrelin/growth hormone secretagogue receptor system in vertebrates. *Ecol Evol* 6:2516–2535. <https://doi.org/10.1002/ece3.2057>
5. Kaiya H, Miyazato M, Kangawa K (2011) Recent advances in the phylogenetic study of ghrelin. *Peptides* 32:2155–2174. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.04.027>
6. Date Y, Kojima M, Hosoda H, et al (2000) Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology* 141:4255–4261. <https://doi.org/10.1210/endo.141.11.7757>
7. Date Y, Nakazato M, Hashiguchi S, et al (2002) Ghrelin is present in pancreatic alpha-cells of humans and rats and stimulates insulin secretion. *Diabetes* 51:124–129. <https://doi.org/10.2337/diabetes.51.1.124>
8. Gutierrez JA, Solenberg PJ, Perkins DR, et al (2008) Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:6320–6325. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800708105>
9. Kojima M, Hamamoto A, Sato T (2016) Ghrelin O-acyltransferase (GOAT), a specific enzyme that modifies ghrelin with a medium-chain fatty acid. *J Biochem (Tokyo)* 160:189–194. <https://doi.org/10.1093/jb/mvw046>
10. Yang J, Brown MS, Liang G, et al (2008) Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone. *Cell* 132:387–396. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.017>
11. Kirchner H, Gutierrez JA, Solenberg PJ, et al (2009) GOAT links dietary lipids with the endocrine control of energy balance. *Nat Med* 15:741–745. <https://doi.org/10.1038/nm.1997>
12. Zhang JV, Ren P-G, Avsian-Kretchmer O, et al (2005) Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake. *Science* 310:996–999. <https://doi.org/10.1126/science.1117255>
13. Zhu X, Cao Y, Voogd K, et al (2006) On the processing of proghrelin to ghrelin. *J Biol Chem* 281:38867–38870. <https://doi.org/10.1074/jbc.M607955200>

14. Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K (2000) Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 279:909–913. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.4039>
15. Patterson M, Murphy KG, le Roux CW, et al (2005) Characterization of ghrelin-like immunoreactivity in human plasma. *J Clin Endocrinol Metab* 90:2205–2211. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-1641>
16. Fernandez G, Cabral A, Cornejo MP, et al (2016) Des-Acyl Ghrelin Directly Targets the Arcuate Nucleus in a Ghrelin-Receptor Independent Manner and Impairs the Orexigenic Effect of Ghrelin. *J Neuroendocrinol* 28:12349. <https://doi.org/10.1111/jne.12349>
17. Ariyasu H, Takaya K, Tagami T, et al (2001) Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 86:4753–4758. <https://doi.org/10.1210/jcem.86.10.7885>
18. Fernandez G, Cabral A, Andreoli MF, et al (2018) Evidence Supporting a Role for Constitutive Ghrelin Receptor Signaling in Fasting-Induced Hyperphagia in Male Mice. *Endocrinology* 159:1021–1034. <https://doi.org/10.1210/en.2017-03101>
19. Steyn FJ, Leong JW, Huang L, et al (2012) GH does not modulate the early fasting-induced release of free fatty acids in mice. *Endocrinology* 153:273–282. <https://doi.org/10.1210/en.2011-1681>
20. Carlson JJ, Turpin AA, Wiebke G, et al (2009) Pre- and post- prandial appetite hormone levels in normal weight and severely obese women. *Nutr Metab* 6:32. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-6-32>
21. Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, et al (2001) A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 50:1714–1719. <https://doi.org/10.2337/diabetes.50.8.1714>
22. Drazen DL, Vahl TP, D'Alessio DA, et al (2006) Effects of a fixed meal pattern on ghrelin secretion: evidence for a learned response independent of nutrient status. *Endocrinology* 147:23–30. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0973>
23. Steinert RE, Feinle-Bisset C, Asarian L, et al (2017) Ghrelin, CCK, GLP-1, and PYY(3-36): Secretory Controls and Physiological Roles in Eating and Glycemia in Health, Obesity, and After RYGB. *Physiol Rev* 97:411–463. <https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2014>
24. Hosoda H, Kangawa K (2008) The autonomic nervous system regulates gastric ghrelin secretion in rats. *Regul Pept* 146:12–18. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2007.07.005>
25. Zhao T-J, Sakata I, Li RL, et al (2010) Ghrelin secretion stimulated by β 1-adrenergic receptors in cultured ghrelinoma cells and in fasted mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:15868–15873. <https://doi.org/10.1073/pnas.1011116107>
26. Briggs DI, Enriori PJ, Lemus MB, et al (2010) Diet-induced obesity causes ghrelin resistance in arcuate NPY/AgRP neurons. *Endocrinology* 151:4745–4755. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0556>

27. Shiiya T, Nakazato M, Mizuta M, et al (2002) Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 87:240–244. <https://doi.org/10.1210/jcem.87.1.8129>
28. Tschöp M, Weyer C, Tataranni PA, et al (2001) Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes* 50:707–709. <https://doi.org/10.2337/diabetes.50.4.707>
29. Zigman JM, Bouret SG, Andrews ZB (2016) Obesity Impairs the Action of the Neuroendocrine Ghrelin System. *Trends Endocrinol Metab TEM* 27:54–63. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2015.09.010>
30. Atalayer D, Gibson C, Konopacka A, Geliebter A (2013) Ghrelin and eating disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 40:70–82. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2012.08.011>
31. Garcia JM, Garcia-Touza M, Hijazi RA, et al (2005) Active ghrelin levels and active to total ghrelin ratio in cancer-induced cachexia. *J Clin Endocrinol Metab* 90:2920–2926. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-1788>
32. Kojima S, Nakahara T, Nagai N, et al (2005) Altered ghrelin and peptide YY responses to meals in bulimia nervosa. *Clin Endocrinol (Oxf)* 62:74–78. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2004.02176.x>
33. Otto B, Cuntz U, Fruehauf E, et al (2001) Weight gain decreases elevated plasma ghrelin concentrations of patients with anorexia nervosa. *Eur J Endocrinol* 145:669–673
34. Schalla MA, Stengel A (2018) The Role of Ghrelin in Anorexia Nervosa. *Int J Mol Sci* 19:. <https://doi.org/10.3390/ijms19072117>
35. Cabral A, López Soto EJ, Epelbaum J, Perelló M (2017) Is Ghrelin Synthesized in the Central Nervous System? *Int J Mol Sci* 18:. <https://doi.org/10.3390/ijms18030638>
36. Perello M, Cabral A, Cornejo MP, et al (2019) Brain accessibility delineates the central effects of circulating ghrelin. *J Neuroendocrinol* 31:e12677. <https://doi.org/10.1111/jne.12677>
37. Henriques ST, Tan CC, Craik DJ, Clark RJ (2010) Structural and functional analysis of human liver-expressed antimicrobial peptide 2. *Chembiochem Eur J Chem Biol* 11:2148–2157. <https://doi.org/10.1002/cbic.201000400>
38. Ge X, Yang H, Bednarek MA, et al (2018) LEAP2 Is an Endogenous Antagonist of the Ghrelin Receptor. *Cell Metab* 27:461-469.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.10.016>
39. Howard A, Townes C, Milona P, et al (2010) Expression and functional analyses of liver expressed antimicrobial peptide-2 (LEAP-2) variant forms in human tissues. *Cell Immunol* 261:128–133. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2009.11.010>
40. Krause A, Sillard R, Kleemeier B, et al (2003) Isolation and biochemical characterization of LEAP-2, a novel blood peptide expressed in the liver. *Protein Sci Publ Protein Soc* 12:143–152. <https://doi.org/10.1110/ps.0213603>

41. Fittipaldi AS, Hernández J, Castrogiovanni D, et al (2020) Plasma levels of ghrelin, des-acyl ghrelin and LEAP2 in children with obesity: correlation with age and insulin resistance. *Eur J Endocrinol* 182:165–175. <https://doi.org/10.1530/EJE-19-0684>
42. Islam MN, Mita Y, Maruyama K, et al (2020) Liver-expressed antimicrobial peptide 2 antagonizes the effect of ghrelin in rodents. *J Endocrinol* 244:13–23. <https://doi.org/10.1530/JOE-19-0102>
43. Mani BK, Puzziferri N, He Z, et al (2019) LEAP2 changes with body mass and food intake in humans and mice. *J Clin Invest* 129:3909–3923. <https://doi.org/10.1172/JCI125332>
44. Cornejo MP, Castrogiovanni D, Schiöth HB, et al (2019) Growth hormone secretagogue receptor signalling affects high-fat intake independently of plasma levels of ghrelin and LEAP2, in a 4-day binge eating model. *J Neuroendocrinol* 31:e12785. <https://doi.org/10.1111/jne.12785>
45. M’Kadmi C, Cabral A, Barrile F, et al (2019) N-Terminal Liver-Expressed Antimicrobial Peptide 2 (LEAP2) Region Exhibits Inverse Agonist Activity toward the Ghrelin Receptor. *J Med Chem* 62:965–973. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b01644>
46. Wang J-H, Li H-Z, Shao X-X, et al (2019) Identifying the binding mechanism of LEAP2 to receptor GHSR1a. *FEBS J* 286:1332–1345. <https://doi.org/10.1111/febs.14763>
47. Howard AD, Feighner SD, Cully DF, et al (1996) A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science* 273:974–977. <https://doi.org/10.1126/science.273.5277.974>
48. Holst B, Holliday ND, Bach A, et al (2004) Common structural basis for constitutive activity of the ghrelin receptor family. *J Biol Chem* 279:53806–53817. <https://doi.org/10.1074/jbc.M407676200>
49. Palyha OC, Feighner SD, Tan CP, et al (2000) Ligand activation domain of human orphan growth hormone (GH) secretagogue receptor (GHS-R) conserved from Pufferfish to humans. *Mol Endocrinol Baltim Md* 14:160–169. <https://doi.org/10.1210/mend.14.1.0412>
50. Yin Y, Li Y, Zhang W (2014) The growth hormone secretagogue receptor: its intracellular signaling and regulation. *Int J Mol Sci* 15:4837–4855. <https://doi.org/10.3390/ijms15034837>
51. Hedegaard MA, Holst B (2020) The Complex Signaling Pathways of the Ghrelin Receptor. *Endocrinology* 161:. <https://doi.org/10.1210/endocr/bqaa020>
52. Sivertsen B, Holliday N, Madsen AN, Holst B (2013) Functionally biased signalling properties of 7TM receptors - opportunities for drug development for the ghrelin receptor. *Br J Pharmacol* 170:1349–1362. <https://doi.org/10.1111/bph.12361>
53. Holst B, Cygankiewicz A, Jensen TH, et al (2003) High constitutive signaling of the ghrelin receptor--identification of a potent inverse agonist. *Mol Endocrinol Baltim Md* 17:2201–2210. <https://doi.org/10.1210/me.2003-0069>

54. Pantel J, Legendre M, Cabrol S, et al (2006) Loss of constitutive activity of the growth hormone secretagogue receptor in familial short stature. *J Clin Invest* 116:760–768. <https://doi.org/10.1172/JCI25303>
55. Torz LJ, Osborne-Lawrence S, Rodriguez J, et al (2020) Metabolic insights from a GHSR-A203E mutant mouse model. *Mol Metab* 39:101004. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2020.101004>
56. A K, M M, C U, et al (2015) Hippocampal Dopamine/DRD1 Signaling Dependent on the Ghrelin Receptor. *Cell* 163:. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.062>
57. Beaulieu J-M, Gainetdinov RR (2011) The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol Rev* 63:182–217. <https://doi.org/10.1124/pr.110.002642>
58. Kern A, Albarran-Zeckler R, Walsh HE, Smith RG (2012) Apo-ghrelin receptor forms heteromers with DRD2 in hypothalamic neurons and is essential for anorexigenic effects of DRD2 agonism. *Neuron* 73:317–332. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.10.038>
59. Jiang H, Betancourt L, Smith RG (2006) Ghrelin amplifies dopamine signaling by cross talk involving formation of growth hormone secretagogue receptor/dopamine receptor subtype 1 heterodimers. *Mol Endocrinol Baltim Md* 20:1772–1785. <https://doi.org/10.1210/me.2005-0084>
60. Schellekens H, De Francesco PN, Kandil D, et al (2015) Ghrelin's Orexigenic Effect Is Modulated via a Serotonin 2C Receptor Interaction. *ACS Chem Neurosci* 6:1186–1197. <https://doi.org/10.1021/cn500318q>
61. Xue Q, Bai B, Ji B, et al (2018) Ghrelin Through GHSR1a and OX1R Heterodimers Reveals a G α s-cAMP-cAMP Response Element Binding Protein Signaling Pathway in Vitro. *Front Mol Neurosci* 11:245. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00245>
62. Mustafá ER, Cordisco González S, Damian M, et al (2021) LEAP2 Impairs the Capability of the Growth Hormone Secretagogue Receptor to Regulate the Dopamine 2 Receptor Signaling. *Front Pharmacol* 12:712437. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.712437>
63. Cornejo MP, Mustafá ER, Barrile F, et al (2020) THE INTRIGUING LIGAND-DEPENDENT AND LIGAND-INDEPENDENT ACTIONS OF THE GROWTH HORMONE SECRETAGOGUE RECEPTOR ON REWARD-RELATED BEHAVIORS. *Neurosci Biobehav Rev*. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.10.017>
64. Guan XM, Yu H, Palyha OC, et al (1997) Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Brain Res Mol Brain Res* 48:23–29. [https://doi.org/10.1016/s0169-328x\(97\)00071-5](https://doi.org/10.1016/s0169-328x(97)00071-5)
65. Zigman JM, Jones JE, Lee CE, et al (2006) Expression of ghrelin receptor mRNA in the rat and the mouse brain. *J Comp Neurol* 494:528–548. <https://doi.org/10.1002/cne.20823>
66. Fernandez G, Cabral A, Andreoli MF, et al (2018) Evidence Supporting a Role for Constitutive Ghrelin Receptor Signaling in Fasting-Induced Hyperphagia in Male Mice. *Endocrinology* 159:1021–1034. <https://doi.org/10.1210/en.2017-03101>

67. Bernardis LL, Bellinger LL (1993) The lateral hypothalamic area revisited: neuroanatomy, body weight regulation, neuroendocrinology and metabolism. *Neurosci Biobehav Rev* 17:141–193. [https://doi.org/10.1016/s0149-7634\(05\)80149-6](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(05)80149-6)
68. Hahn JD, Swanson LW (2010) Distinct patterns of neuronal inputs and outputs of the juxtaparaventricular and supraforfornical regions of the lateral hypothalamic area in the male rat. *Brain Res Rev* 64:14–103. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2010.02.002>
69. Mickelsen LE, Kolling FW, Chimileski BR, et al (2017) Neurochemical Heterogeneity Among Lateral Hypothalamic Hypocretin/Orexin and Melanin-Concentrating Hormone Neurons Identified Through Single-Cell Gene Expression Analysis. *eNeuro* 4:. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0013-17.2017>
70. Berthoud H-R, Münzberg H (2011) The lateral hypothalamus as integrator of metabolic and environmental needs: from electrical self-stimulation to opto-genetics. *Physiol Behav* 104:29–39. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.04.051>
71. Palkovits M, Van Cuc H (1980) Quantitative light and electron microscopic studies on the lateral hypothalamus in rat. Cell and synaptic densities. *Brain Res Bull* 5:643–647. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(80\)90199-9](https://doi.org/10.1016/0361-9230(80)90199-9)
72. Anand BK, Brobeck JR (1951) Hypothalamic control of food intake in rats and cats. *Yale J Biol Med* 24:123–140
73. Burdakov D, Gerasimenko O, Verkhatsky A (2005) Physiological changes in glucose differentially modulate the excitability of hypothalamic melanin-concentrating hormone and orexin neurons in situ. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 25:2429–2433. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4925-04.2005>
74. Burdakov D, Karnani MM, Gonzalez A (2013) Lateral hypothalamus as a sensor-regulator in respiratory and metabolic control. *Physiol Behav* 121:117–124. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2013.03.023>
75. DiLeone RJ, Georgescu D, Nestler EJ (2003) Lateral hypothalamic neuropeptides in reward and drug addiction. *Life Sci* 73:759–768. [https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(03\)00408-9](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(03)00408-9)
76. de Lecea L, Jones BE, Boutrel B, et al (2006) Addiction and arousal: alternative roles of hypothalamic peptides. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 26:10372–10375. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3118-06.2006>
77. Li N, Li A, Nattie E (2013) Focal microdialysis of CO₂ in the perifornical-hypothalamic area increases ventilation during wakefulness but not NREM sleep. *Respir Physiol Neurobiol* 185:349–355. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2012.09.007>
78. Stuber GD, Wise RA (2016) Lateral hypothalamic circuits for feeding and reward. *Nat Neurosci* 19:198–205. <https://doi.org/10.1038/nn.4220>
79. Yamanaka A, Beuckmann CT, Willie JT, et al (2003) Hypothalamic orexin neurons regulate arousal according to energy balance in mice. *Neuron* 38:701–713. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(03\)00331-3](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00331-3)

80. Delgado JMR, Anand BK (1953) Increase of food intake induced by electrical stimulation of the lateral hypothalamus. *Am J Physiol* 172:162–168. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1952.172.1.162>
81. Hoebel BG, Teitelbaum P (1962) Hypothalamic control of feeding and self-stimulation. *Science* 135:375–377. <https://doi.org/10.1126/science.135.3501.375>
82. Rossi MA, Stuber GD (2018) Overlapping Brain Circuits for Homeostatic and Hedonic Feeding. *Cell Metab* 27:42–56. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.09.021>
83. Bonnavion P, Mickelsen LE, Fujita A, et al (2016) Hubs and spokes of the lateral hypothalamus: cell types, circuits and behaviour. *J Physiol* 594:6443–6462. <https://doi.org/10.1113/JP271946>
84. Aggleton JP, Brown MW (1999) Episodic memory, amnesia, and the hippocampal-anterior thalamic axis. *Behav Brain Sci* 22:425–444; discussion 444–489
85. Papez JW (1995) A proposed mechanism of emotion. 1937. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 7:103–112. <https://doi.org/10.1176/jnp.7.1.103>
86. Thomas AG, Koumellis P, Dineen RA (2011) The fornix in health and disease: an imaging review. *Radiogr Rev Publ Radiol Soc N Am Inc* 31:1107–1121. <https://doi.org/10.1148/rg.314105729>
87. Nieuwenhuys R, Geeraedts LM, Veening JG (1982) The medial forebrain bundle of the rat. I. General introduction. *J Comp Neurol* 206:49–81. <https://doi.org/10.1002/cne.902060106>
88. Döbrössy MD, Furlanetti LL, Coenen VA (2015) Electrical stimulation of the medial forebrain bundle in pre-clinical studies of psychiatric disorders. *Neurosci Biobehav Rev* 49:32–42. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.11.018>
89. Geeraedts LM, Nieuwenhuys R, Veening JG (1990) Medial forebrain bundle of the rat: IV. Cytoarchitecture of the caudal (lateral hypothalamic) part of the medial forebrain bundle bed nucleus. *J Comp Neurol* 294:537–568. <https://doi.org/10.1002/cne.902940404>
90. Carlezon WA, Chartoff EH (2007) Intracranial self-stimulation (ICSS) in rodents to study the neurobiology of motivation. *Nat Protoc* 2:2987–2995. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.441>
91. Kong C, Shin J, Koh C-S, et al (2019) Optimization of Medial Forebrain Bundle Stimulation Parameters for Operant Conditioning of Rats. *Stereotact Funct Neurosurg* 97:1–9. <https://doi.org/10.1159/000497151>
92. Elias CF, Saper CB, Maratos-Flier E, et al (1998) Chemically defined projections linking the mediobasal hypothalamus and the lateral hypothalamic area. *J Comp Neurol* 402:442–459
93. Jennings JH, Ung RL, Resendez SL, et al (2015) Visualizing hypothalamic network dynamics for appetitive and consummatory behaviors. *Cell* 160:516–527. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.12.026>

94. Mickelsen LE, Bolisetty M, Chimileski BR, et al (2019) Single-cell transcriptomic analysis of the lateral hypothalamic area reveals molecularly distinct populations of inhibitory and excitatory neurons. *Nat Neurosci* 22:642–656. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0349-8>
95. Stanley BG, Urstadt KR, Charles JR, Kee T (2011) Glutamate and GABA in lateral hypothalamic mechanisms controlling food intake. *Physiol Behav* 104:40–46. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.04.046>
96. Allen GV, Cechetto DF (1995) Neurotensin in the lateral hypothalamic area: origin and function. *Neuroscience* 69:533–544. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(95\)00261-g](https://doi.org/10.1016/0306-4522(95)00261-g)
97. Elias CF, Lee CE, Kelly JF, et al (2001) Characterization of CART neurons in the rat and human hypothalamus. *J Comp Neurol* 432:1–19. <https://doi.org/10.1002/cne.1085>
98. Goforth PB, Leininger GM, Patterson CM, et al (2014) Leptin acts via lateral hypothalamic area neurotensin neurons to inhibit orexin neurons by multiple GABA-independent mechanisms. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 34:11405–11415. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5167-13.2014>
99. Horjales-Araujo E, Hellysaz A, Broberger C (2014) Lateral hypothalamic thyrotropin-releasing hormone neurons: distribution and relationship to histochemically defined cell populations in the rat. *Neuroscience* 277:87–102. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.06.043>
100. Laque A, Zhang Y, Gettys S, et al (2013) Leptin receptor neurons in the mouse hypothalamus are colocalized with the neuropeptide galanin and mediate anorexigenic leptin action. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 304:E999-1011. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00643.2012>
101. Abrahamson EE, Leak RK, Moore RY (2001) The suprachiasmatic nucleus projects to posterior hypothalamic arousal systems. *Neuroreport* 12:435–440. <https://doi.org/10.1097/00001756-200102120-00048>
102. Blanco-Centurion C, Bendell E, Zou B, et al (2018) VGAT and VGLUT2 expression in MCH and orexin neurons in double transgenic reporter mice. *IBRO Rep* 4:44–49. <https://doi.org/10.1016/j.ibror.2018.05.001>
103. Rosin DL, Weston MC, Sevigny CP, et al (2003) Hypothalamic orexin (hypocretin) neurons express vesicular glutamate transporters VGLUT1 or VGLUT2. *J Comp Neurol* 465:593–603. <https://doi.org/10.1002/cne.10860>
104. Chou TC, Lee CE, Lu J, et al (2001) Orexin (hypocretin) neurons contain dynorphin. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 21:RC168
105. Harris GC, Aston-Jones G (2006) Arousal and reward: a dichotomy in orexin function. *Trends Neurosci* 29:571–577. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2006.08.002>
106. Perello M, Sakata I, Birnbaum S, et al (2010) Ghrelin increases the rewarding value of high-fat diet in an orexin-dependent manner. *Biol Psychiatry* 67:880–886. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.10.030>

107. Laque A, Yu S, Qualls-Creekmore E, et al (2015) Leptin modulates nutrient reward via inhibitory galanin action on orexin neurons. *Mol Metab* 4:706–717. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2015.07.002>
108. Elias CF, Sita LV, Zambon BK, et al (2008) Melanin-concentrating hormone projections to areas involved in somatomotor responses. *J Chem Neuroanat* 35:188–201. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2007.10.002>
109. Harthoorn LF, Sañé A, Nethe M, Van Heerikhuizen JJ (2005) Multi-transcriptional profiling of melanin-concentrating hormone and orexin-containing neurons. *Cell Mol Neurobiol* 25:1209–1223. <https://doi.org/10.1007/s10571-005-8184-8>
110. Chee MJS, Arrigoni E, Maratos-Flier E (2015) Melanin-concentrating hormone neurons release glutamate for feedforward inhibition of the lateral septum. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 35:3644–3651. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4187-14.2015>
111. Brown JA, Woodworth HL, Leininger GM (2015) To ingest or rest? Specialized roles of lateral hypothalamic area neurons in coordinating energy balance. *Front Syst Neurosci* 9:9. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2015.00009>
112. Clegg DJ, Air EL, Benoit SC, et al (2003) Intraventricular melanin-concentrating hormone stimulates water intake independent of food intake. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284:R494–499. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00399.2002>
113. Sakamaki R, Uemoto M, Inui A, et al (2005) Melanin-concentrating hormone enhances sucrose intake. *Int J Mol Med* 15:1033–1039
114. Leininger GM, Opland DM, Jo Y-H, et al (2011) Leptin action via neurotensin neurons controls orexin, the mesolimbic dopamine system and energy balance. *Cell Metab* 14:313–323. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.06.016>
115. Kempadoo KA, Tourino C, Cho SL, et al (2013) Hypothalamic neurotensin projections promote reward by enhancing glutamate transmission in the VTA. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 33:7618–7626. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2588-12.2013>
116. Cador M, Kelley AE, Le Moal M, Stinus L (1986) Ventral tegmental area infusion of substance P, neurotensin and enkephalin: differential effects on feeding behavior. *Neuroscience* 18:659–669. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(86\)90061-8](https://doi.org/10.1016/0306-4522(86)90061-8)
117. Hawkins MF, Barkemeyer CA, Tulley RT (1986) Synergistic effects of dopamine agonists and centrally administered neurotensin on feeding. *Pharmacol Biochem Behav* 24:1195–1201. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(86\)90170-x](https://doi.org/10.1016/0091-3057(86)90170-x)
118. Luttinger D, King RA, Sheppard D, et al (1982) The effect of neurotensin on food consumption in the rat. *Eur J Pharmacol* 81:499–503. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(82\)90116-9](https://doi.org/10.1016/0014-2999(82)90116-9)
119. Brown JA, Wright A, Bugescu R, et al (2019) Distinct Subsets of Lateral Hypothalamic Neurotensin Neurons are Activated by Leptin or Dehydration. *Sci Rep* 9:1873. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38143-9>
120. Watts AG (1992) Osmotic stimulation differentially affects cellular levels of corticotropin-releasing hormone and neurotensin/neuromedin N mRNAs in the lateral

- hypothalamic area and central nucleus of the amygdala. *Brain Res* 581:208–216. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(92\)90710-q](https://doi.org/10.1016/0006-8993(92)90710-q)
121. Qualls-Creekmore E, Yu S, Francois M, et al (2017) Galanin-Expressing GABA Neurons in the Lateral Hypothalamus Modulate Food Reward and Noncompulsive Locomotion. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 37:6053–6065. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0155-17.2017>
 122. Kristensen P, Judge ME, Thim L, et al (1998) Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature* 393:72–76. <https://doi.org/10.1038/29993>
 123. Lambert PD, Couceyro PR, McGirr KM, et al (1998) CART peptides in the central control of feeding and interactions with neuropeptide Y. *Synap N Y N* 29:293–298. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2396\(199808\)29:4<293::AID-SYN1>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2396(199808)29:4<293::AID-SYN1>3.0.CO;2-0)
 124. Heuer H, Schäfer MK, O'Donnell D, et al (2000) Expression of thyrotropin-releasing hormone receptor 2 (TRH-R2) in the central nervous system of rats. *J Comp Neurol* 428:319–336
 125. Hara J, Gerashchenko D, Wisor JP, et al (2009) Thyrotropin-releasing hormone increases behavioral arousal through modulation of hypocretin/orexin neurons. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 29:3705–3714. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0431-09.2009>
 126. Kisner A, Slocomb JE, Sarsfield S, et al (2018) Electrophysiological properties and projections of lateral hypothalamic parvalbumin positive neurons. *PloS One* 13:e0198991. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198991>
 127. Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, et al (2004) Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat Rev Neurosci* 5:793–807. <https://doi.org/10.1038/nrn1519>
 128. Mészár Z, Girard F, Saper CB, Celio MR (2012) The lateral hypothalamic parvalbumin-immunoreactive (PV1) nucleus in rodents. *J Comp Neurol* 520:798–815. <https://doi.org/10.1002/cne.22789>
 129. Siemian JN, Borja CB, Sarsfield S, et al (2019) Lateral hypothalamic fast-spiking parvalbumin neurons modulate nociception through connections in the periaqueductal gray area. *Sci Rep* 9:12026. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48537-y>
 130. Yamakawa T, Kurauchi Y, Hisatsune A, et al (2018) Endogenous Nitric Oxide Inhibits, Whereas Awakening Stimuli Increase, the Activity of a Subset of Orexin Neurons. *Biol Pharm Bull* 41:1859–1865. <https://doi.org/10.1248/bpb.b18-00633>
 131. Karnani MM, Szabó G, Erdélyi F, Burdakov D (2013) Lateral hypothalamic GAD65 neurons are spontaneously firing and distinct from orexin- and melanin-concentrating hormone neurons. *J Physiol* 591:933–953. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.243493>
 132. Kosse C, Schöne C, Bracey E, Burdakov D (2017) Orexin-driven GAD65 network of the lateral hypothalamus sets physical activity in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:4525–4530. <https://doi.org/10.1073/pnas.1619700114>
 133. Sharpe MJ, Marchant NJ, Whitaker LR, et al (2017) Lateral Hypothalamic GABAergic Neurons Encode Reward Predictions that Are Relayed to the Ventral Tegmental Area to

- Regulate Learning. *Curr Biol* CB 27:2089-2100.e5.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.06.024>
134. Navarro M, Olney JJ, Burnham NW, et al (2016) Lateral Hypothalamus GABAergic Neurons Modulate Consummatory Behaviors Regardless of the Caloric Content or Biological Relevance of the Consumed Stimuli. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol* 41:1505–1512. <https://doi.org/10.1038/npp.2015.304>
 135. Nieh EH, Vander Weele CM, Matthews GA, et al (2016) Inhibitory Input from the Lateral Hypothalamus to the Ventral Tegmental Area Disinhibits Dopamine Neurons and Promotes Behavioral Activation. *Neuron* 90:1286–1298.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.04.035>
 136. Jennings JH, Rizzi G, Stamatakis AM, et al (2013) The inhibitory circuit architecture of the lateral hypothalamus orchestrates feeding. *Science* 341:1517–1521.
<https://doi.org/10.1126/science.1241812>
 137. Anand BK, Brobeck JR (1951) Localization of a “feeding center” in the hypothalamus of the rat. *Proc Soc Exp Biol Med Soc Exp Biol Med N Y N* 77:323–324.
<https://doi.org/10.3181/00379727-77-18766>
 138. Epstein AN (1960) Reciprocal changes in feeding behavior produced by intrahypothalamic chemical injections. *Am J Physiol* 199:969–974.
<https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1960.199.6.969>
 139. O’Connor EC, Kremer Y, Lefort S, et al (2015) Accumbal D1R Neurons Projecting to Lateral Hypothalamus Authorize Feeding. *Neuron* 88:553–564.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.09.038>
 140. Georgescu D, Sears RM, Hommel JD, et al (2005) The hypothalamic neuropeptide melanin-concentrating hormone acts in the nucleus accumbens to modulate feeding behavior and forced-swim performance. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 25:2933–2940.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1714-04.2005>
 141. Borgland SL, Taha SA, Sarti F, et al (2006) Orexin A in the VTA is critical for the induction of synaptic plasticity and behavioral sensitization to cocaine. *Neuron* 49:589–601.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.01.016>
 142. Perez-Bonilla P, Santiago-Colon K, Leininger GM (2020) Lateral hypothalamic area neuropeptides modulate ventral tegmental area dopamine neurons and feeding. *Physiol Behav* 223:112986. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2020.112986>
 143. Baimel C, Lau BK, Qiao M, Borgland SL (2017) Projection-Target-Defined Effects of Orexin and Dynorphin on VTA Dopamine Neurons. *Cell Rep* 18:1346–1355.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.01.030>
 144. Narita M, Nagumo Y, Hashimoto S, et al (2006) Direct involvement of orexinergic systems in the activation of the mesolimbic dopamine pathway and related behaviors induced by morphine. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 26:398–405.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2761-05.2006>

145. Li S-B, de Lecea L (2020) The hypocretin (orexin) system: from a neural circuitry perspective. *Neuropharmacology* 167:107993. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.107993>
146. Siegel JM (2004) Hypocretin (orexin): role in normal behavior and neuropathology. *Annu Rev Psychol* 55:125–148. <https://doi.org/10.1146/annurev.psych.55.090902.141545>
147. Bonnavion P, de Lecea L (2010) Hypocretins in the control of sleep and wakefulness. *Curr Neurol Neurosci Rep* 10:174–179. <https://doi.org/10.1007/s11910-010-0101-y>
148. Venner A, Karnani MM, Gonzalez JA, et al (2011) Orexin neurons as conditional glucosensors: paradoxical regulation of sugar sensing by intracellular fuels. *J Physiol* 589:5701–5708. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.217000>
149. Peyron C, Tighe DK, van den Pol AN, et al (1998) Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 18:9996–10015. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-23-09996.1998>
150. Boules M, Cusack B, Zhao L, et al (2000) A novel neurotensin peptide analog given extracranially decreases food intake and weight in rodents. *Brain Res* 865:35–44. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(00\)02187-9](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(00)02187-9)
151. Zigman JM, Jones JE, Lee CE, et al (2006) Expression of ghrelin receptor mRNA in the rat and the mouse brain. *J Comp Neurol* 494:528–548. <https://doi.org/10.1002/cne.20823>
152. Mani BK, Walker AK, Lopez Soto EJ, et al (2014) Neuroanatomical characterization of a growth hormone secretagogue receptor-green fluorescent protein reporter mouse. *J Comp Neurol* 522:3644–3666. <https://doi.org/10.1002/cne.23627>
153. Betley JN, Cao ZFH, Ritola KD, Sternson SM (2013) Parallel, redundant circuit organization for homeostatic control of feeding behavior. *Cell* 155:1337–1350. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.002>
154. Willesen MG, Kristensen P, Rømer J (1999) Co-localization of growth hormone secretagogue receptor and NPY mRNA in the arcuate nucleus of the rat. *Neuroendocrinology* 70:306–316. <https://doi.org/10.1159/000054491>
155. Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, et al (2006) Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* 443:289–295. <https://doi.org/10.1038/nature05026>
156. Elias CF, Saper CB, Maratos-Flier E, et al (1998) Chemically defined projections linking the mediobasal hypothalamus and the lateral hypothalamic area. *J Comp Neurol* 402:442–459
157. Bouret SG, Draper SJ, Simerly RB (2004) Formation of projection pathways from the arcuate nucleus of the hypothalamus to hypothalamic regions implicated in the neural control of feeding behavior in mice. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 24:2797–2805. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5369-03.2004>

158. Chen Y, Lin Y-C, Zimmerman CA, et al (2016) Hunger neurons drive feeding through a sustained, positive reinforcement signal. *eLife* 5:e18640. <https://doi.org/10.7554/eLife.18640>
159. Gumbs MCR, Eggels L, Vuuregge AH, et al (2022) Effects of Neuropeptide Y administration into the lateral hypothalamus on intake of free-choice high-fat high-sucrose diet components of the male Wistar rat. *Nutr Neurosci* 25:621–630. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2020.1788774>
160. Date Y, Ueta Y, Yamashita H, et al (1999) Orexins, orexigenic hypothalamic peptides, interact with autonomic, neuroendocrine and neuroregulatory systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:748–753. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.2.748>
161. Bäckberg M, Hervieu G, Wilson S, Meister B (2002) Orexin receptor-1 (OX-R1) immunoreactivity in chemically identified neurons of the hypothalamus: focus on orexin targets involved in control of food and water intake. *Eur J Neurosci* 15:315–328. <https://doi.org/10.1046/j.0953-816x.2001.01859.x>
162. Garfield AS, Shah BP, Burgess CR, et al (2016) Dynamic GABAergic afferent modulation of AgRP neurons. *Nat Neurosci* 19:1628–1635. <https://doi.org/10.1038/nn.4392>
163. Mitchell V, Bouret S, Beauvillain JC, et al (2001) Comparative distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue-receptor (GHS-R) in *Microcebus murinus* (Primate, lemurian) and rat forebrain and pituitary. *J Comp Neurol* 429:469–489. [https://doi.org/10.1002/1096-9861\(20010115\)429:3<469::aid-cne8>3.0.co;2-#](https://doi.org/10.1002/1096-9861(20010115)429:3<469::aid-cne8>3.0.co;2-#)
164. López-Ferreras L, Richard JE, Anderberg RH, et al (2017) Ghrelin's control of food reward and body weight in the lateral hypothalamic area is sexually dimorphic. *Physiol Behav* 176:40–49. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.02.011>
165. Olszewski PK, Li D, Grace MK, et al (2003) Neural basis of orexigenic effects of ghrelin acting within lateral hypothalamus. *Peptides* 24:597–602. [https://doi.org/10.1016/s0196-9781\(03\)00105-0](https://doi.org/10.1016/s0196-9781(03)00105-0)
166. Wren AM, Small CJ, Abbott CR, et al (2001) Ghrelin causes hyperphagia and obesity in rats. *Diabetes* 50:2540–2547. <https://doi.org/10.2337/diabetes.50.11.2540>
167. Wren AM, Small CJ, Abbott CR, et al (2001) Ghrelin causes hyperphagia and obesity in rats. *Diabetes* 50:2540–2547. <https://doi.org/10.2337/diabetes.50.11.2540>
168. Wellman PJ, Clifford PS, Rodriguez JA, et al (2012) Brain reinforcement system function is ghrelin dependent: studies in the rat using pharmacological fMRI and intracranial self-stimulation. *Addict Biol* 17:908–919. <https://doi.org/10.1111/j.1369-1600.2011.00392.x>
169. López-Ferreras L, Richard JE, Anderberg RH, et al (2017) Ghrelin's control of food reward and body weight in the lateral hypothalamic area is sexually dimorphic. *Physiol Behav* 176:40–49. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.02.011>
170. Lawrence CB, Snape AC, Baudoin FM-H, Luckman SM (2002) Acute central ghrelin and GH secretagogues induce feeding and activate brain appetite centers. *Endocrinology* 143:155–162. <https://doi.org/10.1210/endo.143.1.8561>

171. Toshinai K, Date Y, Murakami N, et al (2003) Ghrelin-induced food intake is mediated via the orexin pathway. *Endocrinology* 144:1506–1512. <https://doi.org/10.1210/en.2002-220788>
172. So M, Hashimoto H, Saito R, et al (2018) Inhibition of ghrelin-induced feeding in rats by pretreatment with a novel dual orexin receptor antagonist. *J Physiol Sci JPS* 68:129–136. <https://doi.org/10.1007/s12576-016-0517-5>
173. Valdivia S, Patrone A, Reynaldo M, Perello M (2014) Acute high fat diet consumption activates the mesolimbic circuit and requires orexin signaling in a mouse model. *PLoS One* 9:e87478. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087478>
174. Chu G, Peng H, Yu N, et al (2022) Involvement of POMC neurons in LEAP2 regulation of food intake and body weight. *Front Endocrinol* 13:932761. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.932761>
175. Zigman JM, Nakano Y, Coppari R, et al (2005) Mice lacking ghrelin receptors resist the development of diet-induced obesity. *J Clin Invest* 115:3564–3572. <https://doi.org/10.1172/JCI26002>
176. Paxinos G, Franklin K (2001) *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, San Diego
177. Ester M, Kriegel H, Sander J, Xu X (1996) A density-based algorithm for discovering clusters in large spatial databases with noise. *AAAI Press* 226–231
178. Carey H, Pegios M, Martin L, et al (2022) DeepSlice: rapid fully automatic registration of mouse brain imaging to a volumetric atlas. *bioRxiv* 2022.04.28.489953. <https://doi.org/10.1101/2022.04.28.489953>
179. Uriarte M, De Francesco PN, Fernández G, et al (2021) Circulating ghrelin crosses the blood-cerebrospinal fluid barrier via growth hormone secretagogue receptor dependent and independent mechanisms. *Mol Cell Endocrinol* 538:111449. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2021.111449>
180. Cabral A, Valdivia S, Fernandez G, et al (2014) Divergent neuronal circuitries underlying acute orexigenic effects of peripheral or central ghrelin: critical role of brain accessibility. *J Neuroendocrinol* 26:542–554. <https://doi.org/10.1111/jne.12168>
181. Mickelsen LE, Kolling FW, Chimileski BR, et al (2017) Neurochemical Heterogeneity Among Lateral Hypothalamic Hypocretin/Orexin and Melanin-Concentrating Hormone Neurons Identified Through Single-Cell Gene Expression Analysis. *eNeuro* 4:ENEURO.0013-17.2017. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0013-17.2017>
182. Wang Y, Eddison M, Fleishman G, et al (2021) EASI-FISH for thick tissue defines lateral hypothalamus spatio-molecular organization. *Cell* 184:6361-6377.e24. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.11.024>
183. Bonnavion P, Mickelsen LE, Fujita A, et al (2016) Hubs and spokes of the lateral hypothalamus: cell types, circuits and behaviour. *J Physiol* 594:6443–6462. <https://doi.org/10.1113/JP271946>

184. Kohno D, Gao H-Z, Muroya S, et al (2003) Ghrelin directly interacts with neuropeptide-Y-containing neurons in the rat arcuate nucleus: Ca²⁺ signaling via protein kinase A and N-type channel-dependent mechanisms and cross-talk with leptin and orexin. *Diabetes* 52:948–956. <https://doi.org/10.2337/diabetes.52.4.948>
185. Perello M, Cabral A, Cornejo MP, et al (2019) Brain accessibility delineates the central effects of circulating ghrelin. *J Neuroendocrinol* 31:e12677. <https://doi.org/10.1111/jne.12677>
186. Burt J, Alberto CO, Parsons MP, Hirasawa M (2011) Local network regulation of orexin neurons in the lateral hypothalamus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 301:R572–580. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00674.2010>
187. Hurley SW, Johnson AK (2014) The role of the lateral hypothalamus and orexin in ingestive behavior: a model for the translation of past experience and sensed deficits into motivated behaviors. *Front Syst Neurosci* 8:216. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2014.00216>
188. Lawrence CB, Snape AC, Baudoin FM-H, Luckman SM (2002) Acute central ghrelin and GH secretagogues induce feeding and activate brain appetite centers. *Endocrinology* 143:155–162. <https://doi.org/10.1210/endo.143.1.8561>
189. Perello M, Sakata I, Birnbaum S, et al (2010) Ghrelin increases the rewarding value of high-fat diet in an orexin-dependent manner. *Biol Psychiatry* 67:880–886. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.10.030>
190. Cabral A, Fernandez G, Perello M (2013) Analysis of brain nuclei accessible to ghrelin present in the cerebrospinal fluid. *Neuroscience* 253:406–415. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.09.008>
191. Valdivia S, Cornejo MP, Reynaldo M, et al (2015) Escalation in high fat intake in a binge eating model differentially engages dopamine neurons of the ventral tegmental area and requires ghrelin signaling. *Psychoneuroendocrinology* 60:206–216. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2015.06.018>
192. van den Pol AN, Yao Y, Fu L-Y, et al (2009) Neuromedin B and gastrin-releasing peptide excite arcuate nucleus neuropeptide Y neurons in a novel transgenic mouse expressing strong Renilla green fluorescent protein in NPY neurons. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 29:4622–4639. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3249-08.2009>
193. Cabral A, Fernandez G, Tolosa MJ, et al (2020) Fasting induces remodeling of the orexigenic projections from the arcuate nucleus to the hypothalamic paraventricular nucleus, in a growth hormone secretagogue receptor-dependent manner. *Mol Metab* 32:69–84. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2019.11.014>
194. Chuang J-C, Sakata I, Kohno D, et al (2011) Ghrelin directly stimulates glucagon secretion from pancreatic alpha-cells. *Mol Endocrinol Baltim Md* 25:1600–1611. <https://doi.org/10.1210/me.2011-1001>
195. Cornejo MP, Barrile F, Cassano D, et al (2020) Growth hormone secretagogue receptor in dopamine neurons controls appetitive and consummatory behaviors towards high-fat diet in ad-libitum fed mice. *Psychoneuroendocrinology* 119:104718. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2020.104718>

196. El-Brolosy MA, Stainier DYR (2017) Genetic compensation: A phenomenon in search of mechanisms. *PLoS Genet* 13:e1006780. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006780>
197. Luquet S, Perez FA, Hnasko TS, Palmiter RD (2005) NPY/AgRP neurons are essential for feeding in adult mice but can be ablated in neonates. *Science* 310:683–685. <https://doi.org/10.1126/science.1115524>
198. Madisen L, Zwingman TA, Sunkin SM, et al (2010) A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nat Neurosci* 13:133–140. <https://doi.org/10.1038/nn.2467>
199. Perello M, Castrogiovanni D, Giovambattista A, et al (2009) Prolonged but not short negative energy condition restored corticoadrenal leptin sensitivity in the hypothalamic obese rat. *Neuroendocrinology* 89:276–287. <https://doi.org/10.1159/000193061>
200. Perelló M, Gaillard RC, Chisari A, Spinedi E (2003) Adrenal enucleation in MSG-damaged hyperleptinemic male rats transiently restores adrenal sensitivity to leptin. *Neuroendocrinology* 78:176–184. <https://doi.org/10.1159/000072799>
201. Cabral A, Portiansky E, Sánchez-Jaramillo E, et al (2016) Ghrelin activates hypophysiotropic corticotropin-releasing factor neurons independently of the arcuate nucleus. *Psychoneuroendocrinology* 67:27–39. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2016.01.027>
202. R D, Z A (1983) A behavioral assessment of arcuate nucleus damage after a single injection of monosodium glutamate. *Neurobehav Toxicol Teratol* 5:
203. F C-M, F J-H, A A-D, et al (2022) Immediate Early Gene c-fos in the Brain: Focus on Glial Cells. *Brain Sci* 12:. <https://doi.org/10.3390/brainsci12060687>
204. Dg H, Ha R (1996) Activation of c-fos in the brain. *Prog Neurobiol* 50:. [https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(96\)00021-4](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(96)00021-4)
205. Kovács KJ (1998) c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map. *Neurochem Int* 33:287–297. [https://doi.org/10.1016/s0197-0186\(98\)00023-0](https://doi.org/10.1016/s0197-0186(98)00023-0)
206. Morgan JI, Curran T (1991) Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annu Rev Neurosci* 14:421–451. <https://doi.org/10.1146/annurev.ne.14.030191.002225>
207. Saha RN, Dudek SM (2013) Splitting hares and tortoises: a classification of neuronal immediate early gene transcription based on poised RNA polymerase II. *Neuroscience* 247:175–181. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.04.064>
208. Hewson AK, Dickson SL (2000) Systemic administration of ghrelin induces Fos and Egr-1 proteins in the hypothalamic arcuate nucleus of fasted and fed rats. *J Neuroendocrinol* 12:1047–1049. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2826.2000.00584.x>
209. Cornejo MP, De Francesco PN, García Romero G, et al (2018) Ghrelin receptor signaling targets segregated clusters of neurons within the nucleus of the solitary tract. *Brain Struct Funct* 223:3133–3147. <https://doi.org/10.1007/s00429-018-1682-5>

210. Olszewski PK, Grace MK, Billington CJ, Levine AS (2003) Hypothalamic paraventricular injections of ghrelin: effect on feeding and c-Fos immunoreactivity. *Peptides* 24:919–923. [https://doi.org/10.1016/s0196-9781\(03\)00159-1](https://doi.org/10.1016/s0196-9781(03)00159-1)
211. Takayama K, Johno Y, Hayashi K, et al (2007) Expression of c-Fos protein in the brain after intravenous injection of ghrelin in rats. *Neurosci Lett* 417:292–296. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2007.02.089>
212. Zhang W, Lin TR, Hu Y, et al (2003) Activation of c-fos expression in the rat inferior olivary nucleus by ghrelin. *Neurosci Lett* 353:157–160. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2003.08.083>
213. Liu B, Kwok RP, Fernstrom JD (1991) Colchicine-induced increases in immunoreactive neuropeptide levels in hypothalamus: use as an index of biosynthesis. *Life Sci* 49:345–352. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(91\)90441-d](https://doi.org/10.1016/0024-3205(91)90441-d)
214. An overview of tubulin inhibitors that interact with the colchicine binding site - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22814904/>. Accessed 3 Apr 2023
215. Mancini G, Horvath TL (2018) Viral Vectors for Studying Brain Mechanisms that Control Energy Homeostasis. *Cell Metab* 27:1168–1175. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.05.015>
216. Chen S-H, Haam J, Walker M, et al (2019) Recombinant Viral Vectors as Neuroscience Tools. *Curr Protoc Neurosci* 87:e67. <https://doi.org/10.1002/cpns.67>
217. Haery L, Deverman BE, Matho KS, et al (2019) Adeno-Associated Virus Technologies and Methods for Targeted Neuronal Manipulation. *Front Neuroanat* 13:93. <https://doi.org/10.3389/fnana.2019.00093>
218. Nectow AR, Nestler EJ (2020) Viral tools for neuroscience. *Nat Rev Neurosci* 21:669–681. <https://doi.org/10.1038/s41583-020-00382-z>
219. Challis RC, Ravindra Kumar S, Chen X, et al (2022) Adeno-Associated Virus Toolkit to Target Diverse Brain Cells. *Annu Rev Neurosci* 45:447–469. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-111020-100834>
220. McCown TJ (2005) Adeno-associated virus (AAV) vectors in the CNS. *Curr Gene Ther* 5:333–338. <https://doi.org/10.2174/1566523054064995>
221. Optimization of adeno-associated viral vector-mediated gene delivery to the hypothalamus - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20073991/>. Accessed 5 Apr 2023
222. Reichenbach A, Steyn FJ, Sleeman MW, Andrews ZB (2012) Ghrelin receptor expression and colocalization with anterior pituitary hormones using a GHSR-GFP mouse line. *Endocrinology* 153:5452–5466. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1622>
223. Hildebrandt BA, Ahmari SE (2021) Breaking It Down: Investigation of Binge Eating Components in Animal Models to Enhance Translation. *Front Psychiatry* 12:728535. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2021.728535>

224. Perello M, Valdivia S, García Romero G, Raingo J (2014) Considerations about rodent models of binge eating episodes. *Front Psychol* 5:372. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2014.00372>
225. Je G, Ks M, MI B, We F (2009) Escalation of food-maintained responding and sensitivity to the locomotor stimulant effects of cocaine in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 93:. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2009.04.008>
226. McFarlane MR, Brown MS, Goldstein JL, Zhao T-J (2014) Induced ablation of ghrelin cells in adult mice does not decrease food intake, body weight, or response to high-fat diet. *Cell Metab* 20:54–60. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.04.007>
227. Sclafani A, Bahrani M, Zukerman S, Ackroff K (2010) Stevia and saccharin preferences in rats and mice. *Chem Senses* 35:433–443. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjq033>
228. Short JL, Drago J, Lawrence AJ (2006) Comparison of ethanol preference and neurochemical measures of mesolimbic dopamine and adenosine systems across different strains of mice. *Alcohol Clin Exp Res* 30:606–620. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2006.00071.x>
229. Aponte Y, Atasoy D, Sternson SM (2011) AGRP neurons are sufficient to orchestrate feeding behavior rapidly and without training. *Nat Neurosci* 14:351–355. <https://doi.org/10.1038/nn.2739>
230. Abtahi S, Mirza A, Howell E, Currie PJ (2017) Ghrelin enhances food intake and carbohydrate oxidation in a nitric oxide dependent manner. *Gen Comp Endocrinol* 250:9–14. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2017.05.017>
231. Cornejo MP, Denis RGP, García Romero G, et al (2021) Ghrelin treatment induces rapid and delayed increments of food intake: a heuristic model to explain ghrelin's orexigenic effects. *Cell Mol Life Sci CMLS* 78:6689–6708. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03937-0>
232. Cui RJ, Li X, Appleyard SM (2011) Ghrelin inhibits visceral afferent activation of catecholamine neurons in the solitary tract nucleus. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 31:3484–3492. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3187-10.2011>
233. Suarez AN, Liu CM, Cortella AM, et al (2020) Ghrelin and Orexin Interact to Increase Meal Size Through a Descending Hippocampus to Hindbrain Signaling Pathway. *Biol Psychiatry* 87:1001–1011. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2019.10.012>
234. Yamanaka A, Beuckmann CT, Willie JT, et al (2003) Hypothalamic orexin neurons regulate arousal according to energy balance in mice. *Neuron* 38:701–713. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(03\)00331-3](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00331-3)
235. Brown JA, Bugescu R, Mayer TA, et al (2017) Loss of Action via Neurotensin-Leptin Receptor Neurons Disrupts Leptin and Ghrelin-Mediated Control of Energy Balance. *Endocrinology* 158:1271–1288. <https://doi.org/10.1210/en.2017-00122>
236. Li S-B, de Lecea L (2020) The hypocretin (orexin) system: from a neural circuitry perspective. *Neuropharmacology* 167:107993. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.107993>

237. Ferrari LL, Park D, Zhu L, et al (2018) Regulation of Lateral Hypothalamic Orexin Activity by Local GABAergic Neurons. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 38:1588–1599. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1925-17.2017>
238. Feldblum S, Erlander MG, Tobin AJ (1993) Different distributions of GAD65 and GAD67 mRNAs suggest that the two glutamate decarboxylases play distinctive functional roles. *J Neurosci Res* 34:689–706. <https://doi.org/10.1002/jnr.490340612>
239. Cador M, Kelley AE, Le Moal M, Stinus L (1986) Ventral tegmental area infusion of substance P, neurotensin and enkephalin: differential effects on feeding behavior. *Neuroscience* 18:659–669. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(86\)90061-8](https://doi.org/10.1016/0306-4522(86)90061-8)
240. Rossi MA, Basiri ML, Liu Y, et al (2021) Transcriptional and functional divergence in lateral hypothalamic glutamate neurons projecting to the lateral habenula and ventral tegmental area. *Neuron* 109:3823-3837.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.09.020>
241. Rossi MA, Basiri ML, McHenry JA, et al (2019) Obesity remodels activity and transcriptional state of a lateral hypothalamic brake on feeding. *Science* 364:1271–1274. <https://doi.org/10.1126/science.aax1184>
242. Jennings JH, Rizzi G, Stamatakis AM, et al (2013) The inhibitory circuit architecture of the lateral hypothalamus orchestrates feeding. *Science* 341:1517–1521. <https://doi.org/10.1126/science.1241812>
243. Jordan LM (1998) Initiation of locomotion in mammals. *Ann N Y Acad Sci* 860:83–93. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb09040.x>
244. Sinnamon HM, Benaur M (1997) GABA injected into the anterior dorsal tegmentum (ADT) of the midbrain blocks stepping initiated by stimulation of the hypothalamus. *Brain Res* 766:271–275. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(97\)00734-8](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(97)00734-8)
245. Cone JJ, McCutcheon JE, Roitman MF (2014) Ghrelin acts as an interface between physiological state and phasic dopamine signaling. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 34:4905–4913. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4404-13.2014>
246. van den Pol AN (1999) Hypothalamic hypocretin (orexin): robust innervation of the spinal cord. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 19:3171–3182. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-08-03171.1999>
247. Cornejo MP, Barrile F, De Francesco PN, et al (2018) Ghrelin Recruits Specific Subsets of Dopamine and GABA Neurons of Different Ventral Tegmental Area Sub-nuclei. *Neuroscience* 392:107–120. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.09.027>
248. Hoffman GE, Lyo D (2002) Anatomical markers of activity in neuroendocrine systems: are we all “fos-ed out”? *J Neuroendocrinol* 14:259–268. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2826.2002.00775.x>
249. Szentirmai E, Kapás L, Krueger JM (2007) Ghrelin microinjection into forebrain sites induces wakefulness and feeding in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292:R575-585. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00448.2006>

250. Concetti C, Burdakov D (2021) Orexin/Hypocretin and MCH Neurons: Cognitive and Motor Roles Beyond Arousal. *Front Neurosci* 15:639313. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.639313>
251. De Francesco PN, Fernandez G, Uriarte M, et al (2023) Systemic Ghrelin Treatment Induces Rapid, Transient, and Asymmetric Changes in the Metabolic Activity of the Mouse Brain. *Neuroendocrinology* 113:64–79. <https://doi.org/10.1159/000526245>
252. Schaeffer M, Langlet F, Lafont C, et al (2013) Rapid sensing of circulating ghrelin by hypothalamic appetite-modifying neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:1512–1517. <https://doi.org/10.1073/pnas.1212137110>
253. Uriarte M, De Francesco PN, Fernandez G, et al (2019) Evidence Supporting a Role for the Blood-Cerebrospinal Fluid Barrier Transporting Circulating Ghrelin into the Brain. *Mol Neurobiol* 56:4120–4134. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1362-8>
254. Cornejo MP, Mustafá ER, Cassano D, et al (2021) The ups and downs of growth hormone secretagogue receptor signaling. *FEBS J* 288:7213–7229. <https://doi.org/10.1111/febs.15718>
255. Cordisco Gonzalez S, Mustafá ER, Rodriguez SS, et al (2020) Dopamine Receptor Type 2 and Ghrelin Receptor Coexpression Alters CaV2.2 Modulation by G Protein Signaling Cascades. *ACS Chem Neurosci* 11:3–13. <https://doi.org/10.1021/acchemneuro.9b00426>
256. Hedegaard MA, Holst B (2020) The Complex Signaling Pathways of the Ghrelin Receptor. *Endocrinology* 161:bqaa020. <https://doi.org/10.1210/endocr/bqaa020>
257. Wang J-H, Li H-Z, Shao X-X, et al (2019) Identifying the binding mechanism of LEAP2 to receptor GHSR1a. *FEBS J* 286:1332–1345. <https://doi.org/10.1111/febs.14763>
258. Identifying key residues and key interactions for the binding of LEAP2 to receptor GHSR1a - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32803260/>. Accessed 4 Apr 2023
259. Banks WA (2021) Leptin and the Blood-Brain Barrier: Curiosities and Controversies. *Compr Physiol* 11:2351–2369. <https://doi.org/10.1002/cphy.c200017>
260. Maness LM, Banks WA, Zadina JE, Kastin AJ (1996) Periventricular penetration and disappearance of ICV Tyr-MIF-1, DAMGO, tyrosine, and albumin. *Peptides* 17:247–250. [https://doi.org/10.1016/0196-9781\(95\)02135-3](https://doi.org/10.1016/0196-9781(95)02135-3)
261. Cornejo MP, Castrogiovanni D, Schiöth HB, et al (2019) Growth hormone secretagogue receptor signalling affects high-fat intake independently of plasma levels of ghrelin and LEAP2, in a 4-day binge eating model. *J Neuroendocrinol* 31:e12785. <https://doi.org/10.1111/jne.12785>
262. Hudson AE (2018) Genetic Reporters of Neuronal Activity: c-Fos and G-CaMP6. *Methods Enzymol* 603:197–220. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2018.01.023>
263. Anversa RG, Muthmainah M, Sketriene D, et al (2021) A review of sex differences in the mechanisms and drivers of overeating. *Front Neuroendocrinol* 63:100941. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2021.100941>

264. Bake T, Murphy M, Morgan DGA, Mercer JG (2014) Large, binge-type meals of high fat diet change feeding behaviour and entrain food anticipatory activity in mice. *Appetite* 77:60–71. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2014.02.020>
265. Blanco-Gandía MC, Miñarro J, Rodríguez-Arias M (2020) Common Neural Mechanisms of Palatable Food Intake and Drug Abuse: Knowledge Obtained with Animal Models. *Curr Pharm Des* 26:2372–2384. <https://doi.org/10.2174/1381612826666200213123608>
266. Zhao T-J, Liang G, Li RL, et al (2010) Ghrelin O-acyltransferase (GOAT) is essential for growth hormone-mediated survival of calorie-restricted mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:7467–7472. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002271107>
267. Pankevich DE, Teegarden SL, Hedin AD, et al (2010) Caloric restriction experience reprograms stress and orexigenic pathways and promotes binge eating. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 30:16399–16407. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1955-10.2010>
268. P S, S F, B W (2001) Brain reward circuitry and the regulation of energy balance. *Int J Obes Relat Metab Disord J Int Assoc Study Obes* 25 Suppl 5: <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0801906>
269. A S, M B, S Z, K A (2010) Stevia and saccharin preferences in rats and mice. *Chem Senses* 35:. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjq033>
270. Cason AM, Aston-Jones G (2013) Attenuation of saccharin-seeking in rats by orexin/hypocretin receptor 1 antagonist. *Psychopharmacology (Berl)* 228:499–507. <https://doi.org/10.1007/s00213-013-3051-7>
271. Naef L, Pitman KA, Borgland SL (2015) Mesolimbic dopamine and its neuromodulators in obesity and binge eating. *CNS Spectr* 20:574–583. <https://doi.org/10.1017/S1092852915000693>
272. Clegg DJ, Brown LM, Zigman JM, et al (2007) Estradiol-dependent decrease in the orexigenic potency of ghrelin in female rats. *Diabetes* 56:1051–1058. <https://doi.org/10.2337/db06-0015>
273. de Souza GO, Wasinski F, Donato J (2022) Characterization of the metabolic differences between male and female C57BL/6 mice. *Life Sci* 301:120636. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120636>