

**INSTITUTO DE FISIOLÓGIA Y BIOFÍSICA**  
**BERNARDO HOUSSAY (IFIBIO)**  
DPTO. DE CIENCIAS FISIOLÓGICAS, UNIDAD ACADÉMICA I.

PROYECTO/S DE INVESTIGACIÓN:

**ESTUDIO DE LOS CIRCUITOS HIPOTALÁMICOS QUE CONTROLAN EL BALANCE ENERGÉTICO Y LA GLUCEMIA.**

DOCENTE/S A CARGO: PORF. DR. MARIO GUSTAVO MURER.

UBICACIÓN: PARAGUAY 2155, 7mo piso, Sector M3.

TAREAS A REALIZAR POR PARTE DEL PRACTICANTE:

Manipulación y cuidado de ratones. Técnicas básicas de biología molecular (extracción de ADN, PCR) y de histología (inmunohistoquímica e hibridación in situ). Ensayos biológicos como curvas de tolerancia a la glucosa y sensibilidad a la insulina.

OBJETIVOS A CUMPLIR POR PARTE DEL PRACTICANTE

Determinar la sensibilidad a la insulina y la tolerancia a la glucosa en ratones salvajes y obesos.

REQUERIMIENTOS

NO SE REQUIERE.

PROGRAMA DE FORMACIÓN DEL PRACTICANTE

CARGA HORARIA: 15 hs. semanales.

**TÍTULO:** *Caracterización de los circuitos melanocortinérgicos que regulan el balance energético y la glucemia*

**RESUMEN DEL PROYECTO**

Unos 1900 millones de personas adultas de todo el mundo tienen sobrepeso y 422 millones padecen diabetes. En Argentina el 62 % de la población adulta presenta sobrepeso y existen 1,6 millones con diabetes, constituyendo unas de las principales causas de muerte y generando alto impacto en los costos del sistema de salud. A pesar de los esfuerzos destinados a disminuir la obesidad, la pérdida de peso alcanzada por los tratamientos disponibles a la fecha es modesta y existe una alta tasa de recidiva. Para poder generar terapias novedosas es importante conocer en detalle los circuitos neuroendócrinos involucrados. El hipotálamo cumple un papel central en la regulación del balance energético y la glucemia. Entre las moléculas hipotalámicas con mayor poder saciatorio están las hormonas estimulantes de los melanocitos ( $\alpha$  y  $\beta$ -MSH), que derivan del neuropéptido PROOPIOMELANOCORTINA (POMC). Los seres humanos y roedores mutantes para POMC presentan obesidad mórbida como producto de hiperfagia extrema y disminución de la tasa metabólica. Además, POMC aumenta la sensibilidad a la insulina y la tolerancia a la glucosa. En síntesis, POMC tendría un doble rol protector: contra la obesidad y la diabetes. La población de neuronas hipotalámicas de POMC del núcleo arcuato (Arc) es heterogénea, con subpoblaciones aún no bien definidas. Existe un fuerte interés en disecar y caracterizar estas subpoblaciones con la expectativa de facilitar el

diseño racional de herramientas que permitan manipular en forma específica distintas subpoblaciones para el tratamiento de la obesidad y la diabetes. El OBJETIVO GENERAL de la presente línea de trabajo es CARACTERIZAR ANATÓMICA, BIOQUÍMICA Y FUNCIONALMENTE A LAS SUBPOBLACIONES DE NEURONAS HIPOTALÁMICAS DE POMC Y DISECAR EL ROL QUE CUMPLEN EN LA REGULACIÓN DEL BALANCE ENERGÉTICO Y LA GLUCEMIA. Nuestro laboratorio cuenta con un modelo de ratón único, que desarrolla obesidad extrema de comienzo temprano como producto de una mutación reversible en el gen de *Pomc*. En este modelo, la expresión hipotalámica del gen de *Pomc* se encuentra anulada pero puede recuperarse mediante estrategias que involucren al sistema de Cre-loxP (reversión condicional). Esto brinda la posibilidad de expresar POMC selectivamente en una subpoblación neuronal mediante la cruce con ratones que expresan diferentes formas de Cre (tejido específicas) y/o por expresión de Cre mediante vectores virales inyectados localmente. Anteriormente expresamos POMC selectivamente en la subpoblación de neuronas GABAérgicas y determinamos que esta subpoblación tiene un rol fundamental en el control de la ingesta. Además, observamos que uno de los sitios de proyección principales de esta subpoblación es el núcleo dorsomedial del hipotálamo (DMH), en el cual POMC parece regular la expresión del neuropéptido orexígeno NPY. Las neuronas de POMC del núcleo arcuato (Arc-POMC) también proyectan a otras regiones entre las que se destaca el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVH), conocido por su rol principal en el control del apetito. En el presente proyecto proponemos: 1. Disecar el rol de las vías Arc-POMC → DMH y Arc-POMC → PVH en el control del balance energético y la homeostasis de la glucemia; 2. Caracterizar electrofisiológicamente la vía Arc-POMC → DMH-NPY.

## PLAN DE TRABAJO

### OBJETIVO GENERAL O MARCO DE REFERENCIA

Según datos de la Organización Mundial de la Salud, más de 650 millones de personas son **obesas**<sup>1</sup>. En la República Argentina el 61,6% de la población tiene sobrepeso y un 25,4%, obesidad<sup>2</sup>, y sus co-morbilidades generan alto impacto en los costos del sistema de salud<sup>3</sup>. Frecuentemente, la obesidad conduce a complicaciones como la hipertensión arterial, la diabetes y la hipercolesterolemia que, en conjunto, conforman el Síndrome Metabólico, y se encuentran entre las principales causas de muerte<sup>4, 5</sup>.

La **diabetes** es una enfermedad crónica caracterizada por un aumento en los niveles de glucosa plasmática que padecen unas 422 millones de personas en todo el mundo<sup>6</sup>. En 2015 se estima que 1,6 millones de personas murieron por complicaciones atribuibles a la diabetes<sup>6</sup>. Las últimas estimaciones de 2014 señalan que en la República Argentina hay más de 1,6 millones de personas con diabetes<sup>7</sup>.

El sobrepeso se produce cuando la ingesta supera al gasto energético, mientras que la forma más frecuente de diabetes (la Diabetes Mellitus tipo II), se desencadena por la pérdida de la sensibilidad a la insulina. El **hipotálamo cumple un papel central en la regulación del balance energético y la glucemia**. Conocer los **circuitos** hipotalámicos que participan, las **neuronas** que lo componen, y el estudio molecular y funcional de los **genes** involucrados es importante para poder generar terapias novedosas contra la obesidad y la diabetes.

Unas de las moléculas hipotalámicas con mayor poder saciatorio son las hormonas estimulantes de los melanocitos que derivan del neuropéptido codificado por el gen de la **proopiomelanocortina (Pomc)**<sup>8</sup>. La alteración de la función de *Pomc* desencadena obesidad mórbida como producto de hiperfagia extrema y disminución de la tasa metabólica en seres humanos y roedores <sup>9, 10</sup>. Por otro lado, las neuronas de POMC participan en la homeostasis de la glucosa y, recientemente, hemos detectado que POMC favorece la tolerancia a la glucosa y la sensibilidad a la insulina<sup>11, 12</sup>. En síntesis, **las neuronas de POMC cumplen un doble rol protector: contra la obesidad y la diabetes**. Como las neuronas de POMC son heterogéneas, se postula que existen diferentes subpoblaciones con roles diversos.

El **OBJETIVO GENERAL** de la presente línea de trabajo es caracterizar anatómica, bioquímica y funcionalmente a las subpoblaciones de neuronas hipotalámicas de POMC y disecar el rol que cumplen en la regulación del balance energético y la glucemia.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Las neuronas de Arc-POMC son heterogéneas y proyectan a una variedad de regiones hipotalámicas y extrahipotalámicas<sup>13</sup>. Existe un fuerte interés en disecar y caracterizar las subpoblaciones de neuronas hipotalámicas de POMC con la expectativa de que esta información facilite el diseño racional de herramientas que permitan manipular en forma específica distintas subpoblaciones para el tratamiento de la obesidad y la diabetes<sup>14, 15</sup>. Nuestro laboratorio cuenta con un modelo de ratón único, que desarrolla obesidad extrema de comienzo temprano como producto de una **mutación reversible en el gen de Pomc** (ratones *arcPomc*<sup>-/-</sup>)<sup>16</sup>. En este modelo, **la expresión hipotalámica del gen de Pomc se encuentra anulada pero puede recuperarse** mediante estrategias que involucran al sistema de Cre-loxP (reversión *condicional*). Esto brinda la posibilidad de **expresar POMC selectivamente en una subpoblación neuronal** mediante la cruce con ratones que expresan diferentes formas de Cre (tejido específicas) y/o la inyección de vectores virales que expresen Cre.

Clásicamente se ha considerado que las neuronas de POMC del núcleo arcuato del hipotálamo (Arc-POMC) inhiben la ingesta principalmente a través de sus proyecciones al núcleo paraventricular del hipotálamo (PVH)<sup>17</sup>. Sin embargo, recientemente hemos encontrado evidencias que indicarían que las neuronas Arc-POMC podrían, además, ejercer su función anorexígena a través de sus proyecciones al núcleo hipotalámico dorsomedial (DMH), más específicamente mediante la inhibición de la expresión del neuropéptido Y (NPY), conocido por su capacidad de estimular la ingesta<sup>18</sup>. **Nuestra HIPÓTESIS es que el circuito Arc-POMC → DMH cumple un rol principal en el control del apetito y que posiblemente sea a través de las neuronas de DMH-NPY.** Para probar esta hipótesis proponemos abordar los siguientes objetivos específicos:

**1. Disecar el rol de la vía Arc-POMC → DMH en el control del balance energético y la homeostasis de la glucemia.** Para poder estudiar esta vía en forma aislada, generaremos ratones que sólo expresen POMC en la subpoblación de neuronas que proyectan al DMH. Para ello, inyectaremos bilateralmente el DMH de ratones *arcPomc*<sup>-/-</sup> con vectores virales que viajan en forma retrógrada y son portadores de la enzima Cre. Así, Cre se transportará desde el DMH al Arc y reactivará la expresión de POMC exclusivamente en las neuronas del arcuato que proyectan al DMH. Para poder comparar los efectos de la vía Arc-POMC → DMH con la vía Arc-POMC → PVH, otro grupo de ratones será inyectado en el PVH, y expresará POMC exclusivamente en las neuronas del Arc-POMC que proyectan a este núcleo. En ambos grupos se analizará:

1.1 Localización y cuantificación de las neuronas de POMC que proyectan a cada sitio mediante inmunohistoquímica y caracterización de sus proyecciones.

1.2 Regulación del balance energético mediante la medición de distintos parámetros como ingesta diaria, peso, hiperfagia inducida por ayuno y tejido graso.

1.3 Regulación de la homeostasis de la glucemia mediante curvas de tolerancia a la glucosa y sensibilidad a la insulina.

1.4 Determinación de la respuesta de las neuronas de POMC a una sobrecarga de glucosa mediante la cuantificación de C-FOS en las neuronas recuperadas. Esto permitirá dilucidar si la glucosa estimula preferencialmente a alguna de las dos subpoblaciones de neuronas de POMC.

1.5 Cuantificación de la expresión de NPY en el DMH y el Arc mediante hibridación in situ. Estos experimentos contribuirán a dilucidar si la regulación de la expresión de NPY en el DMH está sólo

relacionada con la expresión de POMC en las neuronas del Arc que proyectan al DMH o si el PVH también está involucrado.

1.6 Determinación de la co-expresión de ácido gama-amino butírico (GABA) y glutamato en las subpoblaciones de neuronas de POMC que proyectan al DMH y al PVH. Se sabe que existe una subpoblación de neuronas Arc-POMC que co-libera el neurotransmisor estimulador glutamato y otra que co-libera el neurotransmisor inhibitorio GABA<sub>19-21</sub> pero aún se desconoce el grado de participación en cada una de las dos vías a estudiar.

**Caracterizar electrofisiológicamente la vía Arc-POMC → DMH-NPY.** En este objetivo nos proponemos dilucidar de qué manera las neuronas Arc-POMC regulan la actividad de las neuronas DMH-NPY. Para ello mediremos la actividad de las neuronas DMH-NPY mediante registros electrofisiológicos de célula única en rebanadas de cerebro. Para estudiar la respuesta de estas neuronas a la activación específica de la vía Arc-POMC → DMH-NPY se expresará la proteína channelrhodopsin específicamente en neuronas Arc-POMC que proyectan al DMH y se activará a dicha proteína mediante iluminación de los terminales sinápticos que la contienen en el DMH. En primer lugar, se determinará si la activación de la vía Arc-POMC impacta en la actividad de las neuronas DMH-MPY y si así fuera se estudiará utilizando estrategias farmacológicas si este efecto se ejerce en forma directa o indirecta y cuáles son los neurotransmisores y neuromoduladores involucrados.

## INTRODUCCIÓN, CONOCIMIENTOS EXISTENTES Y RESULTADOS PREVIOS

### INTRODUCCIÓN GENERAL

#### IMPORTANCIA E IMPACTO DEL PROYECTO

Alrededor de 1900 millones de adultos de todo el mundo padecen sobrepeso, de los cuales 650 millones son obesos<sup>1</sup>. Según estadísticas de 2019, unos 39 millones de niños menores de 5 años presentan sobrepeso<sup>1</sup>. La preocupación que genera esta epidemia a nivel mundial radica, entre otras cosas, en el incremento acelerado del número de casos, ya que el número de afectados se ha triplicado desde 1975<sup>1</sup>. La obesidad y el sedentarismo predisponen al aumento de la presión arterial, la glucemia y la colesterolemia (Síndrome Metabólico). Este síndrome aumenta el riesgo de padecer trastornos cardiovasculares (enfermedad cardíaca isquémica, hipertensión arterial y accidentes cerebrovasculares), diabetes mellitus tipo II y ciertos tipos de cánceres, disminuyendo en 7 años la expectativa de vida<sup>4, 5</sup>. En 2017 se estableció que cada año mueren unos 4 millones de personas a causa de sobrepeso u obesidad ([https://www.who.int/health-topics/obesity#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/obesity#tab=tab_1)). Podemos afirmar entonces, que las complicaciones frecuentes del sobrepeso no sólo alteran la calidad de vida del paciente, sino que impactan fuertemente en los costos del sistema de salud, convirtiendo al sobrepeso en un asunto de Estado<sup>22</sup>. La población de la **República Argentina**, no sólo no escapa a esta epidemia, sino que presenta un cuadro de situación alarmante. Según datos de la 4<sup>º</sup> Encuesta Nacional de Factores de Riesgo (ENFR) realizada por la Secretaría de Gobierno de Salud y el INDEC, el 61,6% de los argentinos tiene exceso de peso, en una proporción de 36,2% de personas con sobrepeso y 25,4% con obesidad<sup>2</sup>. Se puede tener una perspectiva de la problemática argentina mediante el análisis de un relevamiento publicado en marzo de 2016, donde se incluyeron más de 30.000 sujetos de 19 ciudades de Asia, África y Sudamérica<sup>23</sup>. En ese estudio, **la ciudad argentina de Marcos Paz, lideró el ranking de índice de masa corporal promedio** [IMC=peso (Kg)/altura<sup>2</sup> (m<sup>2</sup>)], con un valor altísimo de casi 30<sup>23</sup>. Para combatir esta problemática, en Argentina se sancionó en 2008 la Ley de Trastornos Alimentarios (número 26.396) que en su Artículo 1<sup>º</sup> ordena “*Declárese de **interés nacional** la prevención y control de los trastornos alimentarios, que comprenderá la **investigación** de sus agentes causales...*”. Teniendo en cuenta que este es un tema prioritario, **en el presente proyecto proponemos avanzar en el conocimiento de los circuitos hipotalámicos que controlan el balance energético y la glucemia**, con la expectativa de generar nuevos conocimientos que promuevan el diseño de herramientas terapéuticas para la obesidad y la diabetes sobre una base racional.

#### CIRCUITOS HIPOTALÁMICOS INVOLUCRADOS EN EL BALANCE ENERGÉTICO

Para la supervivencia de cualquier organismo es fundamental mantener la homeostasis energética, que resulta de la ingesta de nutrientes y el gasto de energía, siendo ambos procesos controlados principalmente por el cerebro. El control a largo plazo depende de señales periféricas que reflejan el estado de las reservas de energía. El hipotálamo es una región del cerebro que regula funciones básicas como la reproducción, la temperatura y el equilibrio hidrosalino, entre otros, y cumple un papel central en la regulación del balance energético. Contiene neuronas capaces de sensor nutrientes, hormonas y neurotransmisores, y orquesta una variedad de respuestas neuroquímicas, neurofisiológicas y conductuales que participan en el control de la ingesta y el gasto energético, cuyo balance determina el peso corporal. El **núcleo arcuato** del hipotálamo (**Arc**) es considerado el sitio primario de integración del estado nutricional. En este núcleo coexisten dos poblaciones neuronales con función antagónica: una población que expresa el pro-péptido anorexígeno proopiomelanocortina (**POMC**), y el péptido *cocaine- and amphetamine-regulated transcript* (**CART**), y otra población que expresa el *neuropéptido Y* (**NPY**) y el *agouty-related peptide* (**AgRP**), ambos con actividad orexígena<sup>24</sup>. Uno de los sitios de proyección principal de estas subpoblaciones es el núcleo paraventricular del hipotálamo (**PVH**), donde actúan sobre receptores para melanocortinas 3 y 4 (MC3-R y MC4-R)<sup>25</sup>. AgRP y las hormonas estimulantes de los melanocitos ( $\alpha$  y  $\beta$ -MSH, que derivan de POMC), son ligandos antagónicos para el MC4-R. Mientras que la activación del MC4-R por la  $\alpha$  y  $\beta$ -MSH reduce la ingesta de alimentos y aumenta el gasto energético, la supresión de la señal del MC4-R a través del antagonista endógeno AgRP aumenta la ingesta y reduce el gasto energético<sup>24</sup>. Ambas poblaciones responden a señales que reflejan el estado de las reservas de energía como la hormona leptina, la insulina y la glucosa. La leptina es secretada por el tejido adiposo en niveles proporcionales a los depósitos de grasa. En el arcuato, la leptina estimula la síntesis de mRNA de *Pomc*, activa las neuronas de POMC y estimula la secreción de  $\alpha$ -MSH. Por el contrario, inhibe la actividad de las neuronas NPY/AgRP y suprime la expresión y secreción de NPY y AgRP<sup>26</sup>. De este modo, en situaciones de exceso de energía la leptina promueve un balance energético negativo. Al igual que la leptina, la insulina reduce la ingesta, además de controlar la glucemia. El rol del hipotálamo en el control de la ingesta es conocido desde hace décadas pero en los últimos años se lo ha implicado además en el control de la glucemia, sobre todo a través de las neuronas de POMC y de AgRP. Estudios realizados recientemente en nuestro laboratorio han demostrado que POMC favorece la tolerancia a la glucosa y la sensibilidad a la insulina<sup>12</sup>. **Es decir que las neuronas de POMC tendrían un doble rol protector: frente a la obesidad y la diabetes.** Por otro lado, las neuronas hipotalámicas que regulan el balance energético son reguladas por la grelina, una hormona que es secretada por el estómago durante el ayuno. La grelina induce la ingesta estimulando a las neuronas de AgRP/NPY del Arc y aumentando la inervación inhibitoria sobre las neuronas de POMC, entre otros mecanismos<sup>27</sup>. Existen otras señales y circuitos que participan en el control del balance energético, cuya descripción excede los propósitos del presente proyecto.

## EL GEN DE POMC

El gen de *Pomc* se expresa principalmente en la hipófisis y en el núcleo arcuato del hipotálamo de todos los vertebrados. Sus productos peptídicos, que incluyen a la adrenocorticotrofina (ACTH), las  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ -MSH, y la  $\beta$ -endorfina, participan en procesos vinculados al estrés, el equilibrio energético, la pigmentación y la analgesia<sup>28</sup>. Krude y colaboradores reportaron dos casos de niños con insuficiencia suprarrenal congénita, pelo rojo y obesidad severa, que poseen mutaciones en los alelos de *Pomc*<sup>9</sup>. La obesidad surge por la falta del efecto de la  $\beta$ -MSH y la  $\gamma$ -MSH sobre los receptores MC3-R y MC4-R a nivel cerebral y confirma el rol importante de la señalización por melanocortinas en la regulación del balance energético en el hombre. Gracias a las investigaciones sobre los circuitos hipotalámicos, 18 años más tarde, dos pacientes con déficit de POMC recibieron tratamiento con un agonista para el MC4-R que indujo una pérdida de peso muy

significativa por disminución de la ingesta<sup>29</sup>. Los ratones con deficiencia total de POMC tienen un fenotipo similar al de los hombres<sup>10</sup> aunque los ratones carecen de  $\beta$ -MSH. Hace algunos años hemos localizado las regiones reguladoras responsables de la transcripción hipotalámica de *Pomc* (*enhancers* neuronales)<sup>30</sup> y desarrollamos una línea de ratones con una interrupción de los *enhancers* neuronales que impide la expresión de *Pomc* en el núcleo arcuato del hipotálamo (ratón *arcPomc*<sup>-/-</sup>)<sup>16</sup>. Estos ratones son hiperfágicos, obesos y diabéticos pero, a diferencia de otros modelos, no desarrollan insuficiencia adrenal porque conservan la secreción hipofisaria de ACTH<sup>16</sup>. Una de las ventajas de este modelo es que se puede rescatar la expresión hipotalámica de *Pomc* en cualquier momento de la vida del ratón (ver detalles más adelante).

## PRINCIPALES CONTRIBUCIONES DE OTROS

### SUBPOBLACIONES DE NEURONAS HIPOTALÁMICAS DE POMC

El núcleo arcuato del ratón tiene unas 3000 neuronas de POMC<sup>31</sup>. Existen fuertes evidencias sobre la heterogeneidad de las neuronas de POMC, característica que no llama la atención teniendo en cuenta la diversidad de funciones que cumplen los neuropéptidos a los que da origen esta molécula. La hipótesis de la existencia de **subpoblaciones** de neuronas de POMC se fundamenta en la diversidad de sus sitios blanco, las diferencias en su actividad electrofisiológica, heterogeneidad en los receptores y canales que presentan, de los factores de transcripción que expresan y de los neurotransmisores que co-liberan<sup>32</sup>. Por ejemplo, puede distinguirse heterogeneidad de las neuronas de POMC en cuanto a la expresión de receptores para leptina (50-80%<sup>33</sup>), insulina (25-80%<sup>34</sup>), o serotonina 5-HT<sub>2c</sub> (~45%<sup>35</sup>), y en cuanto a la co-expresión de los neurotransmisores glutamato (7-43%<sup>19, 21</sup>), GABA (45-54%<sup>19, 21</sup>) y acetilcolina (~37%<sup>36</sup>). Hasta la fecha, no se ha precisado el patrón de co-expresión de estas moléculas ni el lugar a donde proyectan las neuronas que expresan estos marcadores. Sin embargo, estudios de secuenciación de RNA de células aisladas sugieren que existen 3 grupos de neuronas de POMC en relación a su patrón de expresión: dos grupos de neuronas GABAérgicas y uno de neuronas glutamatérgicas<sup>14, 15, 37</sup>. En un trabajo realizado recientemente en nuestro laboratorio hemos elucidado que la subpoblación de neuronas GABAérgicas de POMC cumple un rol principal en la regulación de la ingesta<sup>18</sup> (ver 4.3c).

### SITIOS BLANCO DE LAS NEURONAS ARC-POMC

Las neuronas de Arc-POMC proyectan hacia núcleos hipotalámicos y extrahipotalámicos a través de los cuales ejercen sus variados roles fisiológicos<sup>38</sup>. Entre las regiones extrahipotalámicas se destacan el núcleo del tracto solitario, el núcleo accumbens, el área tegmental ventral, la amígdala y sitios relacionados con la inducción de la analgesia, como la sustancia gris periacueductal y el núcleo dorsal del raphe<sup>38, 39</sup>.

Uno de los principales sitios de proyección intrahipotalámicos de las neuronas Arc-POMC es **PVH**, un sitio crítico para el mantenimiento de la homeostasis energética<sup>25, 40</sup>. Las lesiones en el PVH causan obesidad mórbida. Los ratones deficientes en MC4R también son hiperfágicos y obesos, y la restitución aislada de la expresión del MC4R en el PVH, reduce la hiperfagia y peso en un 60%<sup>41</sup>. Además, mientras la inyección del agonista del MC4R, melanotan II (MTII), en el PVH inhibe la alimentación nocturna y aumenta el gasto energético, las inyecciones de antagonistas produce efectos opuestos<sup>41</sup>. Si bien estos hallazgos sugieren un rol importante de la vía Arc-POMC  $\rightarrow$  PVH en el control del balance energético, para ponderar la importancia fisiológica de esta vía en relación a otras que involucran a las neuronas del Arc-POMC, **en el presente proyecto proponemos estudiar la expresión de POMC exclusivamente en las neuronas del Arc que proyectan al PVH**. Son de especial interés para este proyecto las proyecciones de las neuronas Arc-POMC hacia el hipotálamo dorso-medial (**DMH**), un núcleo que regula la ingesta y el consumo de energía<sup>42</sup>. El DMH recibe proyecciones del Arc y, a su vez, envía proyecciones hacia el PVH y el hipotálamo lateral (LH)<sup>42</sup>. El DMH cumple un rol importante como **inductor de la ingesta**, principalmente a través de una población de neuronas que expresan el péptido

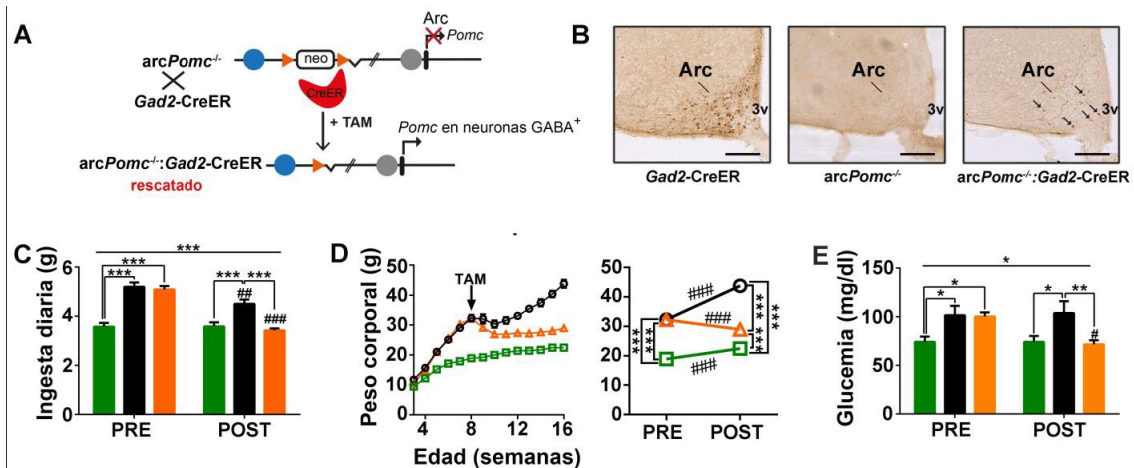
orexígeno **NPY**<sup>43–47</sup>. En los roedores adultos, la expresión basal de NPY en el DMH (DMH-NPY) es baja o nula, y esto ha dificultado el estudio de esta población neuronal. Sin embargo, las neuronas DMH-NPY pueden visualizarse por hibridación in situ en ciertas situaciones de hiperfagia crónica en las que aumenta significativamente la expresión de *Npy*, como la lactancia y la obesidad, y en situaciones de déficit energético como la restricción crónica de alimento o el ejercicio<sup>43–49</sup>. Existen evidencias que sostienen la hipótesis de un **tono inhibitorio de la expresión de DMH-NPY por parte de las melanocortinas**. En primer lugar, los ratones Ay, que expresan la proteína orexígena Agouty en forma ectópica, muestran expresión de *Npy* en el DMH<sup>44</sup>. Se cree que la expresión de DMH-NPY en estos ratones se debe a la inhibición que ejerce el péptido Agouty sobre los receptores para melanocortina MC3/4R, ya que la alteración genética del MC4-R también aumenta la expresión de DMH-NPY<sup>44</sup>. Además, la inyección de melanotan II en el DMH, suprime la hiperfagia inducida por el ayuno o por la lactancia en ratas<sup>49</sup> mientras que la inyección de  $\alpha$ -MSH en el DMH disminuye la ingesta<sup>50</sup>. Si bien los hallazgos descritos son demostraciones de que las melanocortinas tienen el potencial de inhibir la ingesta mediante la inhibición de la expresión de DMH-NPY, hasta hace poco no existían evidencias de una relación entre la expresión de Arc-POMC y la de DMH-NPY. En este sentido, recientemente hemos mostrado que existe una relación inversa entre la expresión de Arc-POMC, principalmente en la subpoblación de neuronas GABAérgicas, y la expresión de DMH-NPY<sup>18</sup> (ver **4.3c**).

## **PRINCIPALES CONTRIBUCIONES AL TEMA POR PARTE DEL GRUPO DEL PROYECTO**

### **MODELO DE RATÓN CON OBESIDAD REVERSIBLE**

Hace unos años que estamos trabajando con un modelo de ratón obeso generado en el laboratorio que dirige el Dr. Marcelo Rubinstein, caracterizado por la IR, y que actualmente criamos en el Instituto de Fisiología y Biofísica Bernardo Houssay (IFIBIO)<sup>16</sup>. En este modelo, el *enhancer* hipotalámico de *Pomc* se encuentra interrumpido por la inserción del gen de resistencia a la neomicina ("*neo*". Ver alelo **arcPomc**-, **Figura 1A**). **La presencia de neo impide la expresión de Pomc en el núcleo arcuato del hipotálamo, pero NO en la hipófisis**, razón por la cual estos ratones tienen alterado el balance energético pero **NO presentan insuficiencia adrenal**. Como *neo* está flanqueado por dos sitios loxP puede ser removido por la enzima recombinasa Cre y, como restaura el alelo ("*rescata*" *Pomc*), este modelo es "reversible". Es importante aclarar que **no se ha alterado la región que da origen al transcripto primario** (que incluye la región codificante de *Pomc*).

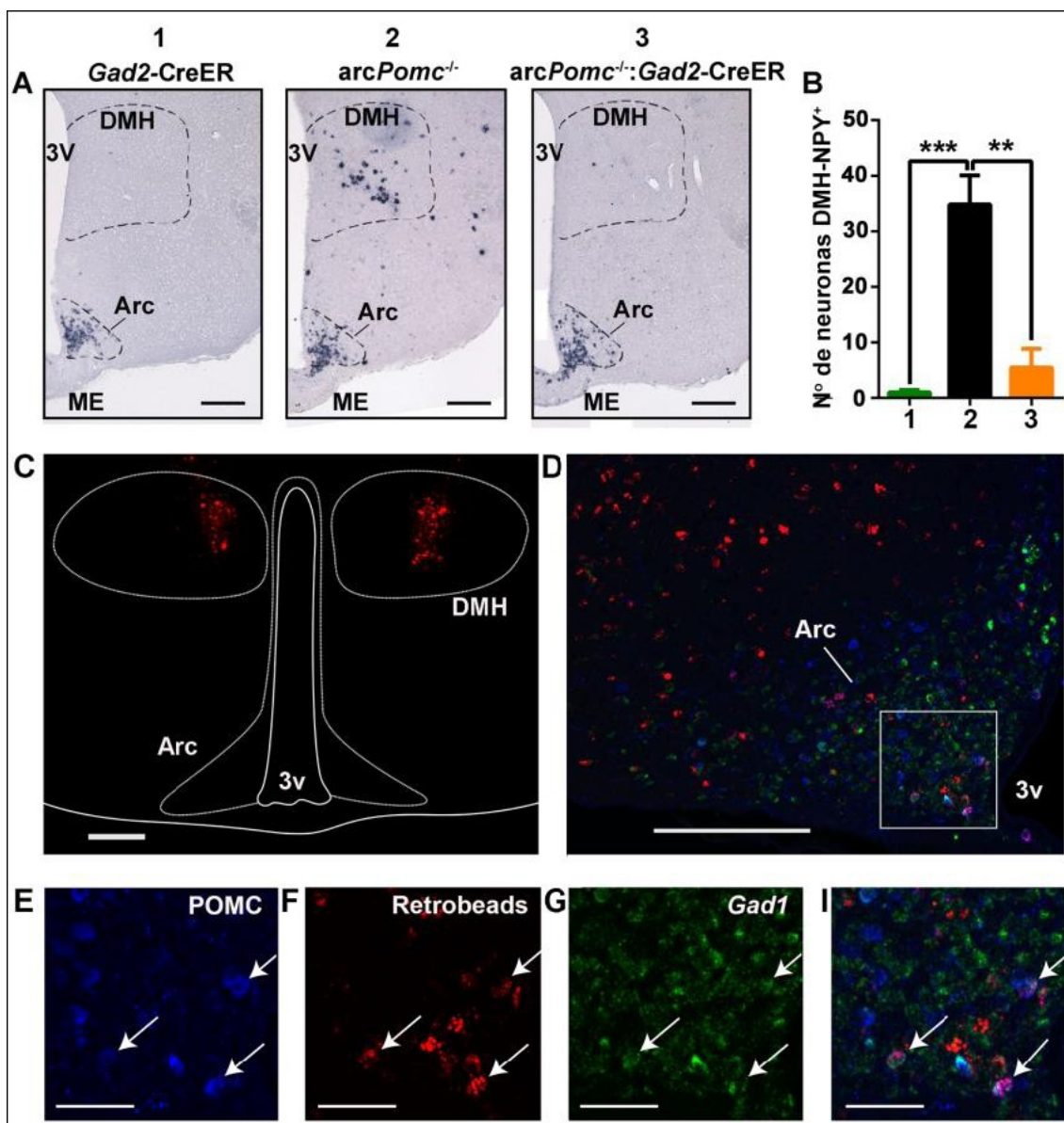
Los ratones homocigotas para arcPomc<sup>-/-</sup>, carentes de POMC en el arcuato, son hiperfágicos, obesos y diabéticos, y tienen disminuido el gasto energético<sup>16</sup>. Previamente hemos demostrado que puede rescatarse la expresión de *Pomc* en estos ratones mediante la cruce de los mismos con ratones transgénicos **CreERT51**, que expresan una forma de Cre inducible por tamoxifeno en **todas** las células del ratón. A pesar de que CreERT rescata el alelo en forma ubicua, la **reactivación de Pomc es tejida específica** ya que está bajo la regulación del *enhancer* de *Pomc*. El rescate de *Pomc* conduce a la disminución de la ingesta, el peso y la glucemia, obteniendo un mejor resultado cuanto menor es el grado de sobrepeso al comienzo del tratamiento<sup>16</sup>.



**Figura 1. La subpoblación de neuronas GABAérgicas de POMC regulan la ingesta, el peso y la glucemia.** **A** Construcción genética de ratones mutantes reversibles para la expresión de *Pomc* en el hipotálamo. *arcPomc*<sup>-/-</sup>: alelo mutante utilizado para generar un ratón *knock in* en reemplazo del alelo salvaje<sup>16</sup>. Círculo azul: uno de los *enhancers* hipotalámicos<sup>30</sup>. *neo*: gen de resistencia a la neomicina que interrumpe la actividad del *enhancer* neuronal. Triángulos: sitios *loxP*. Círculo gris: promotor hipofisario. Flechas: indican inicio de la transcripción en Arcuato (Arc). X: ausencia de transcripción. Al cruzar ratones *arcPomc*<sup>-/-</sup> con ratones *Gad2-CreERT* se obtienen ratones *arcPomc*<sup>-/-</sup>:*Gad2-CreERT* que al ser tratados con tamoxifeno (TAM) a las 8 semanas recuperan la expresión de *Pomc* en las neuronas GABAérgicas de POMC del Arc. **B** Inmunohistoquímica (IHC) para POMC en cortes coronales de cerebro de ratones. Las flechas indican neuronas con "rescate" de *Pomc*. 3v: 3er ventrículo. **C-D** Ingesta diaria (**C**), curvas de pesos (**D**) y glucemia basal en ayunas (**E**) de hembras antes (PRE) y después (POST) del tratamiento con TAM (n=9-14). En **D**, el gráfico de la derecha muestra la comparación de los pesos antes (PRE, semana 7) y después (POST, semana 16) del tratamiento con TAM. Barras de error:  $\pm$ SEM. ANOVA de Medidas Repetidas, Bonferroni: ###p<0.001 (comparación intragrupo, PRE vs POST); \*p<0.05, \*\*p<0.01 y \*\*\*p<0.001 (comparación entre genotipos o interacción tratamiento x genotipo, según corresponda). Estos resultados han sido publicados recientemente<sup>18</sup>.

Más recientemente hemos generado un ratón que expresa *Pomc* únicamente en la subpoblación de neuronas GABAérgicas<sup>18</sup> (**Figura 1A**). Para expresar POMC en forma restringida a esas neuronas, cruzamos los ratones *arcPomc*<sup>-/-</sup> con los ratones **Gad2-CreERT**<sup>52</sup>, que expresan una forma de Cre inducible por tamoxifeno **únicamente** en neuronas GABAérgicas (**Figura 1A**). La inyección de tamoxifeno en ratones *arcPomc*<sup>-/-</sup>:*Gad2-CreERT* adultos (de 60 días, P60), permitió rescatar la expresión de POMC en un 25% de las neuronas (**Figura 1B y 18**). Llamativamente, el rescate de POMC en tan solo un cuarto de las neuronas condujo a la normalización total de la ingesta y la glucemia basal, y al descenso significativo del peso (**Figura 1C-E**). Mediante inmunohistoquímica realizamos un seguimiento de las fibras de POMC en los ratones rescatados y pudimos determinar que el total de los 6 ratones hembras y 6 machos analizados tienen fibras positivas en el DMH, y que 4 de cada sexo tienen proyecciones al PVH, pero en menor densidad. Además, mediante hibridación in situ, detectamos que los ratones *arcPomc*<sup>-/-</sup> (deficientes en *Pomc*), tienen un aumento muy significativo de la expresión de *Npy* en el DMH y que esta expresión se normaliza en los ratones *arcPomc*<sup>-/-</sup>:*Gad2-CreERT* que recuperan la expresión de *Pomc* en neuronas GABAérgicas (**Figuras 2A y 2B**). Finalmente, mediante inyecciones estereotáxicas aplicadas al DMH de ratones salvajes, introdujimos "retrobeads" (perlas fluorescentes que, una vez incorporadas en el terminal presináptico, viajan retrógradamente hasta los somas). Así logramos marcar a las neuronas que proyectan al DMH, con especial interés en las del Arc.

Dos semanas más tarde, preparamos cortes de los cerebros de esos ratones y realizamos inmunohistoquímica para marcar las neuronas de POMC e hibridación in situ para marcar las neuronas GABAérgicas. Con esta triple marcación (**Figuras 2C-I**), determinamos que el ~16 % de las neuronas Arc-POMC proyectan al DMH y que el ~75 % de las neuronas de POMC que proyectan al DMH son GABAérgicas.



**Figura 2. Relación entre las neuronas GABAérgicas de POMC y el Hipotálamo Dorsomedial (DMH).** **A** Secciones coronales de cerebros de ratones hembra *Gad2-CreER*, *arcPomc*<sup>-/-</sup> y *arcPomc*<sup>-/-</sup>:*Gad2-CreER* rescatados en P60, sometidas a hibridación in situ para detectar expresión de *Npy* (marca violeta). Se observan neuronas positivas para *Npy* en el DMH y en el núcleo Arcuato (Arc). ME: eminencia media. 3v: 3er ventrículo. Barra de magnificación 200 μm. **B** Promedio de neuronas DMH-NPY<sup>+</sup> por sección de los grupos mostrados en A (a igual número corresponde igual genotipo). Barras de error: ±SEM. ANOVA de una vía: \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001 (Bonferroni). N = 3-4. **C** Imagen representativa de una sección coronal de cerebro de un ratón inyectado con retrobeads en forma bilateral en ambos DMHs (fluorescencia roja). Barra de magnificación 200 μm. **D** Imagen del Arc representativa de una sección coronal del cerebro del ratón mostrado en C, a una distancia de -1.58 mm desde el bregma, sometida a inmunomarcación para POMC (fluorescencia

azul) e hibridación in situ contra *Gad1* para detectar neuronas GABAérgicas (fluorescencia verde). En rojo se muestran las retrobeads que provienen del DMH. Barra de magnificación 200  $\mu$ m. **E-I** Magnificaciones del cuadrado que se muestra en **D**. Las flechas muestran neuronas con triple marcación: neuronas GABAérgicas de POMC que proyectan al DMH. Barra de magnificación 50  $\mu$ m.

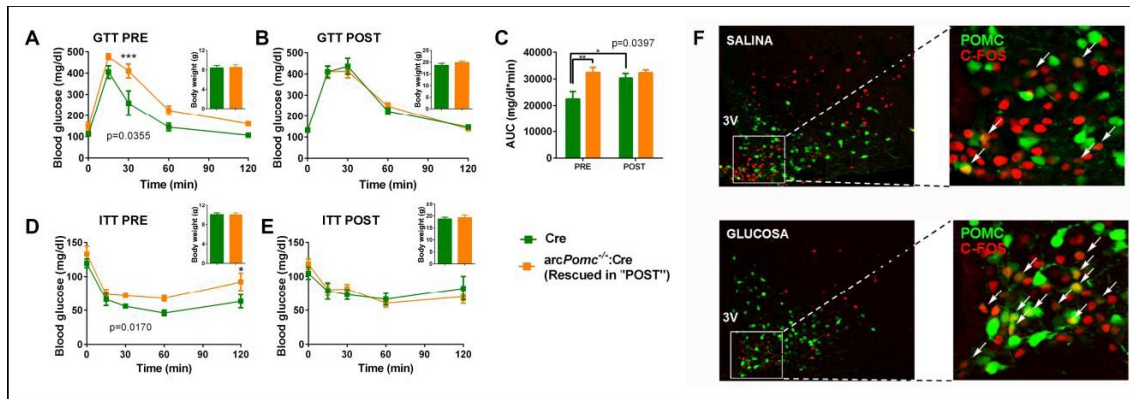
En conjunto, estos resultados muestran que la expresión de POMC en la subpoblación de neuronas GABAérgicas cumple un rol principal en el control de la ingesta, el peso corporal y la glucemia. Además, sugieren que el control anorexígeno que ejerce esta subpoblación podría ser, al menos en parte, mediante la inhibición de DMH-NPY. **El presente proyecto apunta a probar esta hipótesis, a disecar los mecanismos que median esta inhibición y a comparar las funciones de las vías Arc-POMC $\rightarrow$ DMH y Arc-POMC $\rightarrow$ PVN.**

#### POMC Y CONTROL DE LA GLUCEMIA

En un trabajo que publicamos en 2018<sup>12</sup>, con el objetivo de probar si la falta de POMC se relaciona con trastornos en el metabolismo de la glucosa por **mecanismos independientes al desarrollo de obesidad**, hemos explorado la tolerancia a una sobrecarga de glucosa en ratones **púberes** mutantes para *Pomc* (antes que desarrollen sobrepeso). En ese estudio se utilizó el ratón *arcPomc*<sup>-/-</sup>:CreERT, con una **Cre** de expresión **ubícua**, al igual que lo publicado anteriormente<sup>16</sup>. Como se muestra en la **Figura 3A**, las hembras *arcPomc*<sup>-/-</sup>:CreERT presentan una menor tolerancia a la glucosa respecto de los controles CreERT, a pesar de que a esa edad los ratones aún no presentan sobrepeso (ver inserto en la

misma figura). Más aún, el rescate de *Pomc* en los ratones *arcPomc*<sup>-/-</sup>:CreERT normaliza por completo la tolerancia a la glucosa (**Figuras 3B y 3C**). Además, en otra cohorte de ratones púberes, pudimos determinar que la menor tolerancia a la glucosa se debe, al menos en parte, a una disminución en la sensibilidad a la insulina en las hembras, que también revierte al rescatar *Pomc* (**Figuras 3D y 3E**). Por último, para demostrar que estas alteraciones no se deben a la falta de sensibilidad de las *neuronas* de POMC a la glucosa, comparamos la inducción de la expresión de C-FOS en las neuronas de POMC en ratones salvajes y mutantes inyectados con glucosa (**Figura 3F**). Como queríamos ver expresión de C-FOS en las neuronas de POMC en ratones que no expresan POMC (*arcPomc*<sup>-/-</sup>), cruzamos estos ratones con otros que expresan EGFP en neuronas de POMC (ratones POMC-EGFP<sup>31</sup>). En estos experimentos pudimos determinar que tanto en los ratones salvajes (sólo POMC-EGFP) como en los *arcPomc*<sup>-/-</sup>:POMC-EGFP, la co-localización de C-FOS y EGFP aumenta aproximadamente al doble en los ratones inyectados con glucosa respecto de los inyectados con salina (de un 15 a un 30% aproximadamente,  $p < 0.05$ ), no habiendo diferencias significativas entre las respuestas de ambos genotipos (RMA  $p > 0.05$ ). Este experimento indicaría que el cambio de actividad de las neuronas de POMC inducida por glucosa no se ve afectada por la falta de POMC.

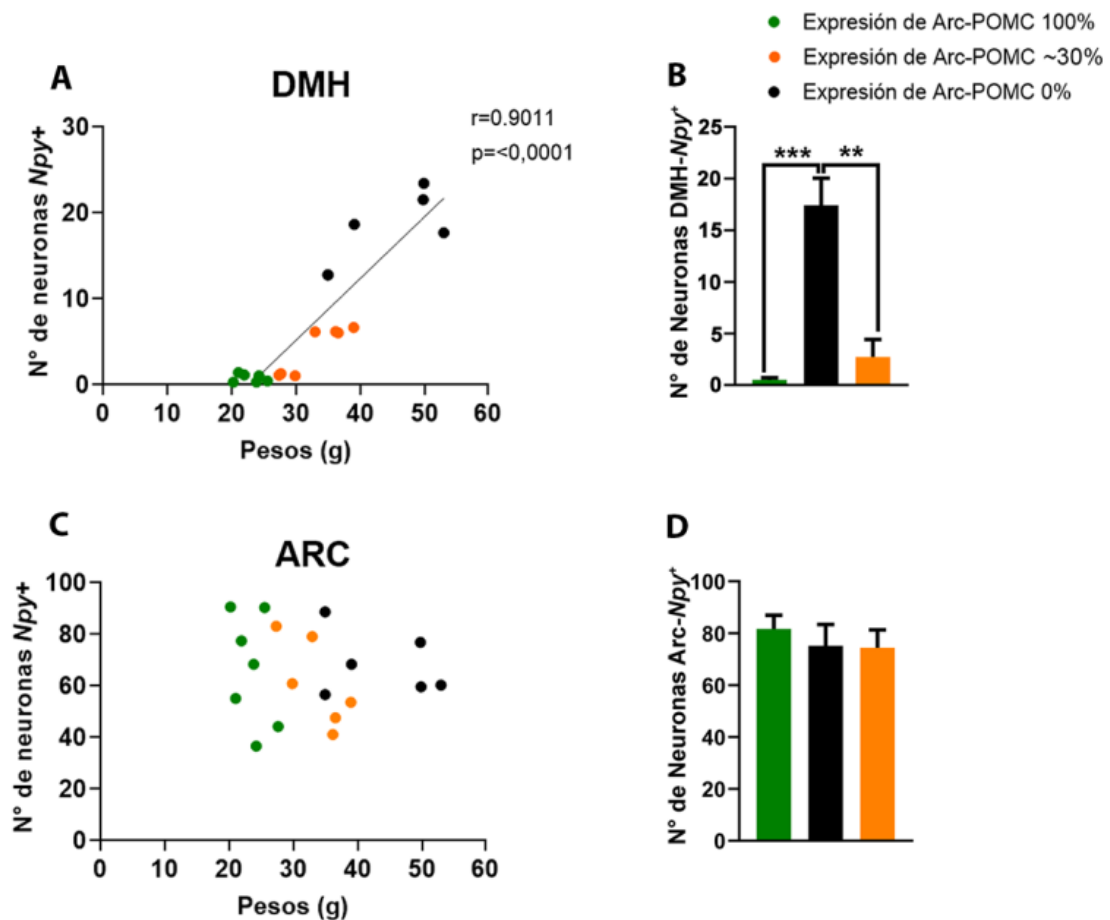
Como los ratones púberes mutantes para POMC no son obesos pero sí intolerantes a la glucosa y menos sensibles a la insulina, nuestros resultados muestran por primera vez que POMC juega un rol importante en el metabolismo de la glucosa en forma independiente a su rol como regulador de la ingesta<sup>12</sup>. Como continuación de esta línea de trabajo, proponemos dilucidar **si las subpoblaciones de neuronas que proyectan al DMH y/o al PVH participan en el control de la homeostasis de la glucosa**. De ser así, una o ambas subpoblaciones de neuronas de POMC podrían convertirse en un blanco terapéutico en pacientes diabéticos.



**Figura 3. Rol de *Pomc* en la homeostasis de la glucosa.** A y B Test de Tolerancia a la Glucosa (GTT) antes (PRE) y después (POST) de recuperar la expresión de *Pomc* con tamoxifeno en hembras. Los insertos muestran que no hay diferencia de pesos al momento del experimento. C Área bajo las curvas (AUC) de A y B. RMA, p: genotipo x tratamiento; Bonferroni post-hoc: \* $p < 0.05$  y \*\*  $p < 0.01$ .  $n = 7-8$ . Nótese que los CreERT aumentan su glucemia por la edad, característico de la cepa C57BL/6, mientras que los recuperados no cambian. D y E Test de Tolerancia a la Insulina (ITT) en hembras antes (PRE) y después (POST) de recuperar la expresión de *Pomc* con tamoxifeno.  $n = 8-11$ . En A y D, RMA: p: genotipo x tratamiento. Bonferroni post-hoc: \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$  (efecto del genotipo). Las barras de error corresponden al SEM. F Microfotografías de cortes coronales de cerebros de ratones POMC-EGFP sometidos a inmunofluorescencia contra C-FOS y co-localización con autofluorescencia verde de EGFP. Arriba un ejemplo de ratón tratado con solución salina. Abajo, uno tratado con glucosa. Se muestran neuronas sólo positivas para C-FOS (rojo), neuronas de POMC que no expresan C-FOS (verde) y neuronas de POMC que expresan C-FOS (amarillas o naranjas, señaladas por flechas).

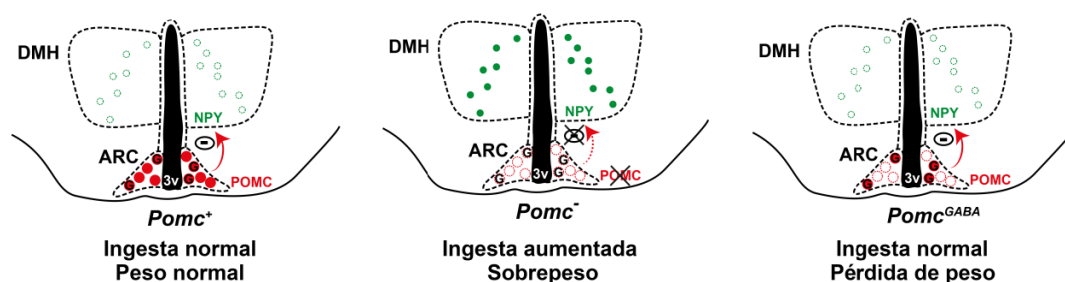
### RESULTADOS PRELIMINARES

Recientemente hemos encontrado que los ratones con deficiencia de POMC en el Arc (*arcPomc*<sup>-/-</sup>) tienen aumento de la expresión de *Npy* en el DMH, rasgo que correlaciona con el aumento de la ingesta y el peso de los ratones (Figuras 1, 2 y 4). Evaluando datos de distintos modelos de ratones que expresan diferentes proporciones de POMC en el Arc con respecto a ratones control, hemos determinado que existe una correlación entre la expresión de Arc-POMC y la expresión de DMH-NPY (Figura 4A y 4B): a menor expresión de Arc-POMC le corresponde mayor número de neuronas que expresan DMH-NPY (Figura 4B) y, a su vez, se correlaciona con mayor peso (Figura 4A). Por el contrario, la expresión de NPY en el arcuato no varía significativamente con la expresión de Arc-POMC ni correlaciona con el peso de ratones con distinto porcentaje de neuronas que expresan Arc-POMC (Figura 4C y 4D), resultado que reforzaría la hipótesis de la importancia del circuito Arc- POMC ↔ DMH-NPY en el control del balance energético.



**Figura 4. El número de neuronas DMH-NPY correlaciona con el peso de ratones con diferentes porcentajes de neuronas que expresan Arc-POMC.** Estos experimentos se realizaron en ratones *arcPomc*<sup>-/-</sup> (Arc-POMC 0%) y sus hermanos WT (Arc-POMC 100%) o con rescate de POMC con distintos tipos de Cre (Arc-POMC ~30%). **A** y **C** Correlación entre la cantidad de neuronas de *Npy*<sup>+</sup> en el núcleo dorsal del hipotálamo (DMH, **A**) o núcleo arcuato (Arc, **C**) y el peso de los ratones.  $r$  y  $p$  calculados mediante Correlación de Pearson. En **B** y **D** se muestra el promedio del número de neuronas *Npy*<sup>+</sup> en el DMH (**B**) y el Arc (**D**), por hemisección, para ratones con distintos niveles de expresión de Arc-POMC. Barras de error:  $\pm$  SEM. Análisis mediante ANOVA: \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$  (Bonferroni).  $N = 3-4$ . La marcación de neuronas de NPY se realizó por hibridación in situ y la de POMC por inmunohistoquímica.

Además, hemos mostrado que el rescate de la expresión hipotalámica de POMC en forma restringida a neuronas GABAérgicas normaliza la expresión de DMH-NPY y la ingesta, y disminuye el peso de los ratones (**Figuras 1, 2 y 5**). Finalmente, como hemos observado que las neuronas GABAérgicas de POMC proyectan principalmente al DMH y que la mayoría de las neuronas de POMC que proyectan al DMH son GABAérgicas, **nuestra HIPÓTESIS es que las neuronas Arc-POMC que proyectan al DMH disminuyen la ingesta mediante la inhibición de la expresión de NPY en el DMH (Figura 5).**



**Figura 5. Modelo de un circuito Arc-POMC ↔ DMH-NPY para la regulación de la ingesta.** Panel izquierdo: En los ratones salvajes (*Pomc*<sup>+</sup>) las neuronas GABAérgicas de POMC (círculos rojos con la G) del Arcuato (ARC) disminuyen la ingesta mediante la inhibición de la expresión de NPY del hipotálamo dorsomedial (DMH, círculos verdes vacíos), manteniendo un peso normal. Panel medio: en el ratón mutante (*Pomc*<sup>-</sup>) la falta de expresión de *Pomc* en las neuronas del ARC (círculos rojos vacíos), resulta en aumento de la expresión de DMH-NPY (círculos verdes llenos), aumentando la ingesta e induciendo sobrepeso. Panel derecho: La expresión de *Pomc* en las neuronas GABAérgicas (*Pomc*<sup>GABA</sup>) recuperaría la inhibición de la expresión de NPY, normalizando la ingesta y permitiendo la pérdida de peso.

## ACTIVIDADES, CRONOGRAMA Y METODOLOGÍA

### OBJETIVO 1: Disecar el rol de la vía Arc-POMC ↔ DMH en el control del balance energético y la homeostasis de la glucemia.

Base racional: Como las neuronas de Arc-POMC proyectan a numerosas áreas del sistema nervioso central conocidas por cumplir con diversas funciones, postulamos la existencia de subpoblaciones de neuronas de POMC con diferentes conexiones y roles fisiológicos. Se ha descrito que las neuronas Arc-POMC controlan el balance energético a través de circuitos que involucran al DMH y el PVH, entre otros núcleos. Sin embargo, hasta la fecha, estos circuitos no han sido bien caracterizados. En el presente proyecto proponemos caracterizar exhaustivamente la vía Arc-POMC ↔ DMH y compararla con la vía Arc-POMC ↔ PVH, para evaluar en qué medida cada una contribuye a la regulación del balance energético y la homeostasis de la glucemia. Para ello proponemos utilizar el ratón *arcPomc*<sup>-/-</sup>, que carece de la expresión hipotalámica de *Pomc*. Este ratón ha sido de utilidad para activar la expresión de *Pomc* en forma restringida a subpoblaciones que co-expresan diferentes moléculas, como el receptor para serotonina 5-HT<sub>2CR53</sub>, el receptor de leptina<sup>54</sup> y, por nuestro grupo, en neuronas GABAérgicas<sup>18</sup> (Figuras 1 y 2). En esos trabajos, la especificidad de tejido para la expresión de *Pomc* estuvo dada por el promotor o enhancer que regula la expresión de Cre. En el presente proyecto, para activar la expresión de *Pomc* sólo en las neuronas que proyectan al DMH o en aquellas que proyectan al VMH, proponemos inyectar ratones *arcPomc*<sup>-/-</sup> con vectores virales adenoasociados (AAV) que viajan en forma retrógrada (desde la presinapsis de las aferencias a sus somas) y son portadores de la enzima Cre. Un grupo de ratones será inyectado en el DMH y otro en el PVH, de modo tal de activar diferencialmente la expresión de POMC en las vías Arc-POMC ↔ DMH y Arc-POMC ↔ PVH. Así, todo cambio fisiológico que se observe se deberá a la expresión de POMC en las neuronas Arc-POMC que participan en dicha vía. Como control del sitio de inyección se co-inyectará un virus con expresión local de mCherry.

Metodología:

#### - OBTENCIÓN Y MANTENIMIENTO DE LOS RATONES:

Los ratones *arcPomc*<sup>-/-</sup>, generados y donados por el laboratorio que dirige el Dr. Marcelo Rubinstein, han sido utilizados y/o publicados en proyectos anterior<sup>12, 16, 18</sup>. Las cruces se realizan de modo similar a lo publicado<sup>16</sup>. Los ratones se encuentran alojados en el Bioterio del Instituto de Fisiología y Biofísica "Bernardo Houssay" en la Ftd. de Medicina (IFIBIO, UBA-CONICET), en estanterías comunes. El bioterio del IFIBIO aloja más de 20

líneas de ratones transgénicos y tiene capacidad para alojar 1000 jaulas de las cuales unas 80 serán destinadas a este proyecto. Se estima que se incluirá un total de 200 ratones para cumplir con todo el proyecto para lo cual deben nacer unos 400 ratones a lo largo de los 3 años (ya que sólo 50 % de los ratones nacen con los genotipos deseados). Los ratones se encuentran bajo un ciclo de luz-oscuridad de 12 hs-12 hs, toman agua corriente y comen alimento para roedores estándar disponible ad libitum (25 % proteína, 7.5 % grasa, y 32 % de carbohidratos; 2.9 Kcal/kg). Antes del destete los ratones son numerados mediante perforación de sus orejas y los trozos extraídos se utilizan para preparar ADN por métodos convencionales. Luego se genotipifica por PCR con *primers* específicos.

- **VECTORES VIRALES:**

☐ Retro-AAV-Cre [(ssAAV-retro/2-hSyn1-chI-iCre-WPRE-SV40p(A), Universidad de Zurich]: este vector es utilizado de rutina por el grupo del Dr. Fernando Kasanetz del GNS (IFIBIO). Utilizando un ratón reportero el Dr Kasanetz ha infectado neuronas del estriado dorso-medial y ha conseguido recombinación en la corteza cingular anterior, que es la principal corteza que proyecta a esa región del estriado. En el presente proyecto se propone inyectar un grupo de ratones *arcPomc*<sup>-/-</sup> en el DMH y otro en el PVH para que el virus viaje retrógradamente al Arc y reactive la expresión de *Pomc* en la subpoblación de neuronas que proyecta a esos núcleos.

☐ AAV-mCherry (rAAV8/hSyn-mcherry): Este vector es utilizado de rutina por otros miembros del GNS del IFIBIO. Se co-inyectará con el anterior para poder visualizar el sitio de inyección y como control de inyección sin actividad recombinante.

- **GRUPOS EXPERIMENTALES:**

Se utilizarán hembras y machos adultos, de 60 días postnatales (P60 ±3 días), tanto con expresión normal de *Pomc* (*arcPomc*<sup>-/-</sup> o WT) como *arcPomc*<sup>-/-</sup>. Un grupo será inyectado en el DMH y otro en el PVH. Los tratamientos serán así:

I-WT + AAV-mCherry (ratón control de peso normal)

II-*arcPomc*<sup>-/-</sup> + retro-AAV-Cre+ AAV-mCherry (ratón obeso que recuperará POMC en el Arc). Según se reactive la expresión de POMC en el DMH o el PVH, los ratones serán denominados POMCDMH o POMCPVH. Se busca ver si adelgazan y/o cambian su ingesta.

III-*arcPomc*<sup>-/-</sup> + AAV-mCherry (ratón control obeso). No deberían cambiar la ingesta porque no recuperan POMC

- **INYECCIONES ESTEREOTÁXICAS:**

En el núcleo arcuato del hipotálamo existen aproximadamente unas 3000 neuronas de *Pomc* distribuidas en un volumen de 1 mm x 1 mm x 0,5 mm (izquierda-derecha x anterior-posterior x rostro-caudal)<sup>31</sup>. Los AAV serán inyectados en el cerebro de ratones utilizando la metodología descrita previamente<sup>55</sup>. Brevemente, los ratones serán anestesiados con isoflurano, colocados en un marco estereotáxico y se localizarán las coordenadas correspondientes del área a inyectar siguiendo el atlas de coordenadas del cerebro de ratón<sup>56</sup>. Se inyectará 0,25 – 0,5 µl de suspensión del AAV, en una concentración aproximada de 4 x 10<sup>12</sup> vg/ml, en cada hemisferio cerebral. Se utilizan capilares de vidrio y se inyectará 0,1 µl/min. En primera instancia se realizará la inyección del vector AAV-mCherry en ratones salvajes, a fin de determinar las condiciones óptimas de inyección. Las inyecciones en el DMH ya han sido puestas a punto como se muestra en la **Figura 2** (coordenadas: -1.7 mm anteroposterior, ± 1.3 mm mediolateral en relación con bregma, -4.80 mm dorsoventral desde la superficie cortical usando un ángulo de 10 ° para evitar los ventrículos y el daño del seno sagital superior<sup>18</sup>). Las inyecciones en el PVH serán puestas a punto siguiendo las recomendaciones de la bibliografía.

Los ratones serán seguidos por 6 semanas más para evaluar los siguientes parámetros:

- **OBJETIVO 1.1 Localización y cuantificación de las neuronas de POMC que proyectan a cada sitio mediante inmunohistoquímica (IHC).** Al terminar los protocolos los ratones serán perfundidos con paraformaldehído al 4% en PBS. Sus cerebros serán cortados con micrótopo de congelación y los cortes coronales serán sometidos a

inmunohistoquímica contra un péptido derivado de POMC (ACTH), tal como se explicó anteriormente<sup>30</sup>. El anticuerpo anti-ACTH de rata que se utiliza (A.F. Parlow, National Hormone and Peptide Program), reconoce a la pro-hormona POMC completa, antes de ser procesada en péptidos más pequeños. Como el procesamiento de POMC se realiza en las vesículas durante el transporte axonal, utilizando este anticuerpo es posible teñir no sólo los somas sino también las proyecciones de las neuronas de POMC. Es importante aclarar que esta IHQ se utiliza a fines de identificar las neuronas de POMC y sus proyecciones, no para evaluar su poder anorexígeno. Para estimar el porcentaje de neuronas de POMC rescatadas se comparará el número de neuronas de POMC de los ratones rescatados (grupo II) con los controles WT (grupo I), mediante revelado con DAB. Verificaremos los sitios de proyección de las neuronas rescatadas, que deberían proyectar al sitio de inyección y quizás a otros sitios. Se tomarán microfotografías con un microscopio de fluorescencia motorizado AxioImager M2 con iluminación estructurada por un sistema Apotome2 (Zeiss). Se realizará un recuento preciso por zonas siguiendo el atlas de Paxinos<sup>56</sup> y se compararán secciones equivalentes de los tres grupos. Este tipo de análisis, además, permitirá ver si las neuronas recuperadas (que son las que proyectan al PVH o el DMH), se encuentran agrupadas en alguna región en particular.

**- OBJETIVO 1.2 Evaluación de la regulación del balance energético mediante la medición de distintos parámetros:**

**Ingesta diaria y peso corporal:** se medirán en ratones aislados como se detalla en<sup>16</sup>, antes y después de las inyecciones de los AAV.

**hiperfagia inducida por ayuno:** antes de sacrificar a los ratones, éstos serán ayunados durante 24 hs y se evaluará el consumo de alimento de las siguientes 24 hs, para comparar con la ingesta diaria basal como se hizo en <sup>16</sup>.

**Tejido graso.** Con el objetivo de determinar si los ratones que disminuyen de peso lo hacen a expensas del tejido adiposo, los ratones serán sacrificados por dislocación cervical y se extraerá la grasa subcutánea, la gonadal y el hígado para pesarlos, como se hizo en<sup>16</sup>.

**- OBJETIVO 1.3 Regulación de la homeostasis de la glucosa:** hemos determinado que la falta de POMC induce menor tolerancia a la glucosa y menor sensibilidad a la insulina y que esta condición revierte cuando se recupera *Pomc*<sup>12, 18</sup>. Con el objetivo de determinar si las neuronas que proyectan al DMH y/o al PVH son *suficientes* para normalizar la homeostasis de la glucosa realizaremos las siguientes mediciones antes y después de las inyecciones de los AAV:

**Prueba de Tolerancia a la Glucosa (GTT):** expondremos a los ratones a una sobrecarga de glucosa como se hizo anteriormente<sup>12</sup>. Brevemente, se mide la glucemia en ayunas con un glucómetro portátil sobre una muestra de sangre obtenida de la cola del ratón a tiempo 0 (basal) y a los 15, 30, 60 y 120 min de inyectar por vía i.p. una solución de dextrosa (2 mg/g de ratón).

**Prueba de Tolerancia Intraperitoneal a la Insulina (ITT).** Para evaluar la respuesta intraperitoneal a la insulina los ratones serán ayunados por 2 hs a las 8 am y a continuación recibirán una inyección de insulina humana (1 U/kg de peso corporal) como se explica en<sup>12</sup>. Se medirá la glucemia como se explica en el punto anterior a 0, 15, 30, 60 y 120 minutos.

**- OBJETIVO 1.4 Determinación de la respuesta de las neuronas de POMC a una sobrecarga de glucosa.** Entre la diversidad que muestran las neuronas hipotalámicas de POMC del núcleo arcuato (Arc-POMC), llama la atención la existencia de dos subpoblaciones de neuronas que co-liberan neurotransmisores con función antagónica: una que libera el neurotransmisor estimulador glutamato y otra que libera el

neurotransmisor inhibitorio ácido gama-amino butírico (GABA)<sup>19-21</sup>.

Recientemente hemos medido que una sobrecarga i.p. de glucosa induce la expresión de C-FOS en las neuronas Arc-POMC (**Figura 3**)<sup>12</sup>. En el presente proyecto repetiremos estos experimentos en los ratones POMCDMH y POMCPVH para evaluar si las neuronas de POMC que participan de los circuitos Arc-POMC → DMH y Arc-POMC → PVH son reguladas por cambios en la glucemia. La medición de la inducción de C-FOS permite ver cambios a nivel poblacional, con gran precisión para cuantificar el porcentaje de neuronas que responden en comparación con la inyección de solución salina. Se repetirá el mismo procedimiento que el publicado anteriormente<sup>12</sup> con las siguientes modificaciones (porque no se utilizarán ratones POMC-EGFP): Se realizará doble inmunofluorescencia contra POMC (anticuerpo hecho en ratón) y contra C-FOS (Merck No 2578130, millipore), hecho en conejo.

- **OBJETIVO 1.5 Cuantificación de la expresión de NPY en el DMH y el Arc mediante hibridación in situ.** Estos experimentos contribuirán a dilucidar si la regulación de la expresión de NPY en el DMH está sólo relacionada con la expresión de POMC en las neuronas del Arc que proyectan al DMH. Si también se observan cambios en la expresión de DMH-NPY en los ratones que recuperan POMC en las neuronas que proyectan al PVN, el mecanismo sería indirecto. La cuantificación de neuronas de NPY en el Arc se utiliza como control ya que hemos visto que no cambia con la expresión de Arc-POMC<sup>18</sup>. Además, proponemos hacer una doble marcación, también por hibridación in situ, con los receptores MC3, MC4,  $\mu$ , GABA-A y GABA-B, para ver si hay co-localización con Npy. Con este último experimento se pretende esclarecer si la  $\alpha$ -MSH y/o la  $\beta$ -endorfina que derivan de POMC, y/o el neurotransmisor GABA podrían ser candidatos para regular a las neuronas DMH-NPY.

**Hibridación In situ (ISH).** Como se muestra en la **Figura 2** y se ha publicado anteriormente<sup>18</sup>, ya hemos puesto a punto la ISH para marcar neuronas de NPY. Brevemente, los ratones son perfundidos y sus cerebros post-fijados con paraformaldehído al 4% en PBS, luego criopreservados en sacarosa 15%, incluidos en gelatina al 15% y congelados rápidamente en isopentano y hielo seco para finalmente ser cortados en criostato. La sonda de NPY se obtienen a partir de un plásmido otorgado por el Dr. José Luis Ferrán, un colaborador argentino de la Universidad de Murcia, España. Este plásmido contiene una secuencia complementaria al mensajero de *Npy* de 493 bp (NM\_023456.3, 32-524 bp). La sonda se marca con digoxigenina (DIG RNA Labeling Kit, Roche) y para la hibridación in situ se procede tal como se describió anteriormente<sup>18</sup>, incubando a 72 °C. Para el revelado se utiliza un anticuerpo anti-digoxigenina acoplado a fosfatasa alcalina y se revela con NBT/BCIP (Roche). En el caso de las co-localizaciones de *Npy* con MC3R, MC4R,  $\mu$ , GABA-A y GABA-B (sondas que serán proporcionadas por el Dr. Ferrán), se realizarán ISH fluorescentes, que también hemos puesto a punto en nuestro laboratorio. En este caso, la segunda sonda se marca con fluoresceína y se utilizan secuencialmente un anticuerpo anti-DIG acoplado a peroxidasa (para revelar *Npy*), se revela con una reacción enzimática con el kit TSA Plus Cyanine 3 System (Perkin Elmer), se bloquea con agua oxigenada y se procede a revelar la segunda in situ con un anticuerpo anti-fluoresceína acoplado a peroxidasa pero esta vez se revela con TSA-Cy5.

- **OBJETIVO 1.6 Determinación de la co-expresión de GABA y glutamato en las subpoblaciones de neuronas de POMC que proyectan al DMH y al PVH.** Se ha demostrado que un 45-54% de las neuronas hipotalámicas de POMC son GABAérgicas y un 7-43% son glutamatérgicas<sup>19, 21</sup>. Teniendo en cuenta que las respuestas provocadas por GABA y glutamato en la excitabilidad neuronal son antagónicas, se especula que estas subpoblaciones llevarían a cabo funciones diferentes.

Recientemente hemos observado que un 75% de las neuronas de POMC que proyectan al DMH son GABAérgicas<sup>18</sup>. El presente objetivo apunta a determinar qué porcentaje de estas neuronas son glutamatérgicas y qué porcentaje de las neuronas de POMC que

proyectan al PVH son GABAérgicas o glutamatérgicas. Para poder determinarlo realizaremos ISH con doble marcación: para POMC y Gad1 (para neuronas GABAérgicas) y para POMC y vGlut (para neuronas glutamatérgicas). Los resultados se expresarán como porcentaje de neuronas de POMC que expresan GABA o vGlut.

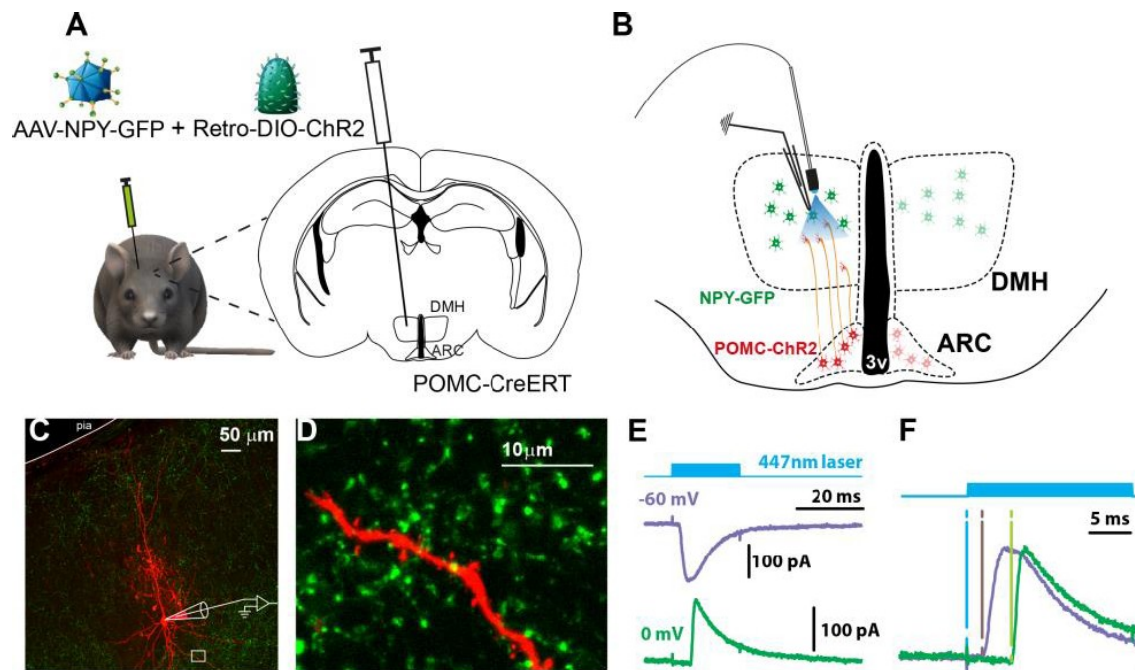
Resultados esperados: Mejoras en la ingesta, el peso y/o la glucemia indicará que la población de neuronas Arc-POMC que fue reactivada (que proyectan al DMH o al VMH), está involucrada en la regulación de esas variables fisiológicas. Un aumento de C-FOS en las neuronas de POMC que proyectan al DMH o VMH en respuesta a la glucosa, en comparación con el vehículo, indicará que esa subpoblación cambia su actividad y sugerirá una participación de esas vías en la homeostasis de la glucosa. Esperamos que los ratones *arcPomc*<sup>-/-</sup> tengan aumento de la expresión de *Npy* en el DMH y que esta disminuya o se normalice en los ratones POMCDMH replicando lo que hemos publicado anteriormente<sup>18</sup>. No podemos predecir qué ocurrirá con los ratones POMCPVH. En el caso que *Npy* no cambie, apoyará la hipótesis de innervación directa de las neuronas Arc-POMC sobre las DMH-NPY. Si en cambio, los niveles de *Npy* disminuyen en ausencia de fibras que proyecten al DMH, plantearemos la hipótesis de una regulación indirecta (aunque no descarta que también exista innervación directa del Arc al DMH que controle la expresión de DMH-NPY). Además, esperamos que exista una **correlación directa entre los niveles de DMH-NPY, la ingesta y el peso de los ratones**. Por otro lado, la co-localización de alguno de los receptores (MC3R, MC4R o  $\mu$ ) con la expresión de *Npy* en el DMH, fortalecerá la hipótesis de una innervación directa Arc-POMC  $\rightarrow$  DMH-NPY y agregará datos sobre la naturaleza del neurotransmisor involucrado. Como las neuronas de POMC que proyectan al DMH son en su mayoría GABAérgicas<sup>18</sup>, quizás estas neuronas tengan tanto receptores para  $\alpha$ -MSH o  $\beta$ -endorfina como para GABA. Para los experimentos de co-localización de POMC con Gad1 o vGlut, se analizarán los ratones de cada grupo experimental: los inyectados con Cre retrógrado en el DMH, sólo expresarán POMC en las neuronas que proyectan a ese núcleo. Sabemos que un 75% de las neuronas serán GABAérgicas<sup>18</sup> pero habrá que ver si el resto son glutamatérgicas. De ser así, puede ser que haya un subgrupo de neuronas con diferentes funciones. Anteriormente hemos determinado que las neuronas GABAérgicas de POMC proyectan al PVH pero aún no sabemos si todas las que proyectan a este núcleo son GABAérgicas o si hay también proyecciones glutamatérgicas.

Consideraciones: Hay que tener en cuenta que es posible que una misma neurona de POMC proyecte a más de un núcleo. Entonces, por ej., podría ser que la inyección retrógrada en el DMH muestre fibras positivas también en el PVH. Por lo tanto, las conclusiones de los experimentos deberán contemplar estos aspectos. Está descrito que <5% de las neuronas de POMC co-expresan Gad1 y vGlut, pero en nuestros experimentos no podrán determinar a dónde proyectan estas neuronas ya que no tenemos planificada hacer una triple ISH.

**OBJETIVO 2: Caracterizar electrofisiológicamente la vía Arc-POMC DMH-NPY.** Nuestros resultados sugieren que Arc-POMC regula la expresión del gen de NPY en el DMH. Hay numerosos ejemplos que muestran que los neuropéptidos y otros tipos de neurotransmisores pueden regular tanto la transcripción génica como la actividad electrofisiológica de la post-sinapsis. Este objetivo se propone para **iniciar** la continuación de esta línea de trabajo y apunta a dilucidar si las neuronas de POMC del Arc activan/inhiben a las neuronas de NPY del DMH y, si lo hacen, si es en forma directa o indirecta.

Base racional: La aproximación *ex vivo*, en rodajas de cerebro de ratón, para el estudio de circuitos, permite el registro de la actividad neuronal de células individuales con significativa preservación de la estructura de circuitos y con un abanico de posibilidades de intervención farmacológica que supera ampliamente las posibilidades *in vivo*. Para determinar si las neuronas de Arc-POMC regulan la actividad de las neuronas DMH-NPY realizaremos registros electrofisiológicos en rebanadas de cerebros. La idea general es realizar experimentos de optogenética estimulando la actividad de las neuronas Arc-POMC

mediante la expresión de la proteína Channelrhodopsin (ChR) en esas neuronas y la iluminación en el DMH (**Figura 5**). Concomitantemente registraremos cambios en las corrientes iónicas de las neuronas de DMH-NPY que serán identificadas mediante la expresión de la proteína fluorescente GFP.



**Figura 5. Caracterización del circuito Arc-POMC → DMH-NPY mediante optogenética y electrofisiología ex vivo.** **A** Ratones POMC-CreERT serán inyectados en el DMH con los vectores AAV-NPY-GFP para visualizar las neuronas de NPY del DMH y con el Retro-DIO-ChR2 que viajará en forma retrógrada a todas las aferencias al DMH. A las dos semanas se inyectará tamoxifeno i.p. para inducir Cre y activar la expresión de ChR2 en las neuronas de POMC (POMC-ChR2). **B** Se realizarán experimentos de electrofisiología en rodajas coronales conteniendo el DMH. Triángulo celeste: iluminación con láser de 447nm para activar a las terminales de POMC. Se registrará mediante whole cell patch clamp la corriente en las neuronas de NPY del DMH que serán visualizadas por fluorescencia verde (NPY-GFP). **C-D** Ejemplo de un sistema similar en el cual se estimulan por optogenética aferencias hipocámpales que expresan ChR2 (**D**, verde), para evocar corrientes en neuronas piramidales de la corteza prefrontal (**C**, rojo). **E** En modo de clampeo de voltaje se registran entradas excitatorias (en violeta) e inhibitorias (en verde) al estimular los axones hipocámpales con luz de 447nm (barra celeste). **F** Detalle del curso temporal de las corrientes que se muestran en **E**, demostrando que la corriente inhibitoria es compatible temporalmente con inhibición anterógrada (feed-forward). **C-F** experimento realizado por nuestro colaborador, el Dr. Diego Pafundo.

Metodología:

- **HERRAMIENTAS GENÉTICAS.**

1. Utilizaremos ratones **POMC-CreERT** machos y hembras, que serán proporcionados por nuestro colaborador, el Dr. Marcelo Rubinstein. Estos ratones han sido obtenidos del Jackson Laboratory [Cepa Tg(Pomc-cre/ERT2)#Jke] y actualmente están alojados en el INGBI. Los ratones POMC-CreERT expresan Cre únicamente en las neuronas de POMC y presentan la ventaja de ser inducibles por tamoxifeno (TAM)<sup>57</sup>. Esta característica permite evitar que Cre se exprese en neuronas de NPY, ya que el 25 % de las neuronas de NPY y de POMC del Arc tienen un origen embriológico común<sup>58</sup>. Los ratones POMC-CreERT se mantienen en hemicigosis.

2. Los ratones POMC-CreERT serán inyectados en el DMH con dos AAV:

**-RetroAAV-DIO-ChR2** (Addgene: pAAV-EF1a-double floxed-hChR2 (H134R)-mCherry-WPRE-HGHpA): este vector viral permite la infección de terminales sinápticos y el transporte retrógrado del constructo con la posterior expresión ChR2 y de la proteína fluorescente mCherry, dirigidas por el promotor EF1 exclusivamente en neuronas que expresen CRE. Se espera que viaje del DMH al Arc y que sólo se active en neuronas de Arc-POMC luego de activar Cre con TAM. Además, podremos verificar su expresión en las neuronas de Arc-POMC mediante co-localización de mCherry e inmunohistoquímica contra ACTH.

**-AAV-NPY-GFP** (Addgene: pAAV-fNPY-GFP (Addgene)59: este vector viral permitirá identificar las neuronas DMH-NPY que fluorescerán de color verde bajo el microscopio de fluorescencia y así, luego de activar las neuronas de Arc-POMC con el láser, se podrán registrar cambios en la actividad de estas neuronas mediante *patch clamp*.

**-METODOLOGÍA GENERAL:**

Las aferencias a las neuronas de DMH provenientes de las neuronas Arc-POMC se estudiarán utilizando optogenética. Brevemente, se microinyectarán los vectores RetroAAV-DIO-ChR2 y AAV-NPY-GFP mediante cirugía estereotáxica en ratones POMC-CreERT, como se explica en el **OBJETIVO 1** pero en el DMH de uno de los hemisferios. Luego de dos semanas post transducción, los ratones serán

tratados con tamoxifeno para activar la expresión de ChR2 mediada por Cre, como se explicó anteriormente<sup>16</sup>. Luego se dejarán pasar 30-60 días para analizar las corrientes evocadas por la estimulación de las aferencias de las neuronas POMC mediante registros electrofisiológicos de whole cell patch clamp en modo de clampeo de voltaje en rodajas coronales (300  $\mu$ m) que contienen tanto al Arc como al DMH (**Figura 5**). Brevemente, los animales se anestesiaron profundamente con isoflurano, se decapitaron e inmediatamente se extraerá el cerebro bajo una solución de corte en interfaz líquida-hielo. La solución de corte contiene (en mM): 210 sacarosa, 10 glucosa, 10 NaCl, 1.9 KCl, 1.2 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 33 NaHCO<sub>3</sub>, 1.3 ácido ascórbico, 6 MgCl, 1 CaCl; pH=7.3-7.4 cuando es burbujeada continuamente con 95%O<sub>2</sub>-5%CO<sub>2</sub>. Las rodajas conteniendo el DMH serán luego seccionadas en rodajas coronales de 300  $\mu$ m de grosor usando un vibrátomo (1000, Ted Pella) e inmediatamente transferidas a una cámara de incubación conteniendo fluido cerebroespinal artificial (ACSF) mantenido a 36°C. El ACSF contiene (en mM) 125 NaCl, 2.5KCl, 1.25 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 glucosa, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 0.4 ácido ascórbico, 1 MgCl<sub>2</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, pH 7.3-7.4 cuando es gaseada con carbógeno (95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>). Luego de 5 minutos de incubación a 36°C, se estabilizarán las rodajas a temperatura ambiente en la misma solución por al menos 30 minutos antes de ser transferidas a la cámara de registro.

Los registros se realizarán en una cámara de registro sumergida montada en un microscopio (Nikon Eclipse FN1) equipado con iluminación de luz infrarroja y contraste de interferencia diferencial (IR-DIC), iluminación por epifluorescencia y cámara CCD. Las rodajas serán perfundidas a un flujo de 2ml/min con ACSF oxigenado a 30-32°C. Se obtendrán registros de patch clamp del tipo whole cell en neuronas del DMH con pipetas estiradas a partir de vidrio de borosilicato con una resistencia de 4-7 M $\Omega$  cuando se llenen con (en mM): 130 CsMeSO, 10 HEPES, 0.2 EGTA, 4.5 MgATP, 0.3 NaGTP, 14 fosfocreatina de sodio, 10 TEA-Cl, 5 QX-314-Br; pH 7.2-7.4 usando CsOH. La presencia de Cesio y de los bloqueantes de canales QX314 y TEA que se incluyen en esta solución permite mejorar el clampeo de voltaje y el volumen efectivo del clampeo de voltaje en las neuronas. Se incluirá neurobiotina para, a posteriori revelar las neuronas registradas y se co-localizará con la expresión de NPY mediante hibridación in situ o inmunohistoquímica para GFP. Los registros se obtendrán utilizando amplificadores Multiclamp 700B (Molecular Devices). Se filtrarán las señales con un filtro pasabajos a 6 kHz y se digitalizarán a 20 kHz utilizando interfaces de adquisición DigiData 1200 (Molecular Devices) y el software de adquisición Clampex (Molecular Devices). Para el análisis de los registros se utilizarán los programas CampFit (Molecular devices) y rutinas ad hoc en Matlab (Mathworks). Los registros se realizarán en modo de clampeo de voltaje, donde se compensará la capacitancia de la pipeta y la resistencia en serie se monitoreará continuamente utilizando un escalón de

voltaje. Solo se incluirán en el análisis los registros donde la resistencia en serie sea estable y  $<20\text{ M}\Omega$ .

Las aferencias de las neuronas POMC se estimularán mediante la iluminación a través del objetivo del microscopio (40X de inmersión en agua) con un láser de 447nm cuya duración e intensidad podrán ser reguladas en los experimentos. Se realizarán registros de patch clamp en modo de clampeo de voltaje. Esta aproximación experimental permitirá registrar las corrientes evocadas y poder determinar su potencial de reversión, con el fin de determinar si se encuentran asociadas a canales de  $\text{Cl}^-$  como en el caso de receptores GABA-A, o de  $\text{Na}^+$  como en el caso de receptores de glutamato. En nuestras condiciones de registro, podremos determinar corrientes excitatorias evocadas por luz al potencial de reversión del GABA (-60 mV) e inhibitorias al potencial de reversión del AMPA (0 mV) como se muestra en el ejemplo de la **Figura 5**. Confirmaremos la identidad de las corrientes utilizando bloqueantes específicos de los receptores postsinápticos (para receptores MC3/4R y GABA), en experimentos similares estimulando las aferencias de neuronas POMC. Con el fin de determinar si las corrientes evocadas corresponden con eventos monosinápticos de las neuronas POMC o si corresponden al reclutamiento de neuronas locales, estimaremos el retraso del inicio de las corrientes postsinápticas con el inicio de la estimulación con luz. Confirmaremos estos resultados en experimentos alternativos en donde luego de evocar la corriente postsináptica con luz, se incubará la rodaja con tetrodotoxina y 4-aminoperidina. La presencia del bloqueante de canales de  $\text{Na}^+$  activados por voltaje tetrodotoxina, elimina la posibilidad de generar potenciales de acción. Por lo tanto la estimulación por luz en estas condiciones permitirá únicamente la despolarización de los axones y terminales de las neuronas POMC y las corrientes evocadas serán únicamente monosinápticas. La presencia de 4-AP, mejora la estimulación de los terminales y permite la detección de las corrientes postsinápticas.

Resultados esperados: Esperamos poder medir cambios en la actividad eléctrica de las neuronas DMH-NPY luego de la activación de las neuronas Arc-POMC por optogenética. Además, esperamos poder determinar si estos cambios corresponden a circuitos mono o polisinápticos. Finalmente, sería óptimo poder identificar si estos cambios son dependientes de los receptores MC3/4R o GABAérgicos (ya que las neuronas de POMC liberan tanto  $\alpha$ -MSH como GABA).

Consideraciones: A pesar de que la técnica está puesta a punto en el IFIBIO, este objetivo se plantea como el comienzo de una nueva línea y aún no tenemos resultados preliminares que nos permitan asegurar que el sistema funcionará. De fallar la expresión o activación de alguno de los vectores virales, se evaluarán estrategias alternativas con otros vectores o ratones transgénicos (como aquellos que expresan YFP en las neuronas de NPY).

- **ANÁLISIS ESTADÍSTICO.** Para todo el proyecto: se usará la prueba de t para las comparaciones entre dos grupos y ANOVA de dos factores para evaluar el efecto de un tratamiento a lo largo del tiempo o en diferentes genotipos. Se usará estadística no paramétrica cuando se viole el supuesto de normalidad. El error alfa se define en 0.05 y las diferencias se considerarán significativas si  $p < 0.05$ .

## CRONOGRAMA DE TRABAJO

### Primer año

	Meses											
TAREAS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Obtención y mantenimiento de ratones	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Objetivo 1-1 a 1-4	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Objetivo 2							x	x	x	x	x	x

### Segundo Año

	Meses											
TAREAS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Mantenimiento de ratones	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Objetivo 1-1 a 1-4	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Objetivo 1-5 a 1-6	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Objetivo 2	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

### Tercer año

	Meses											
TAREAS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Mantenimiento de ratones	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Objetivo 1-1 a 1-4	x	x	x	x								
Objetivo 1-5 a 1-6	x	x	x	x	x	x	x	x	x			
Objetivo 2	x	x	x	x	x	x	x	x	x			
Escritura de manuscritos										x	x	x

## 4.5- RESULTADOS ESPERADOS

Los resultados del proyecto nos permitirán determinar el rol que juegan las vías Arc-POMC → DMH y Arc-POMC → PVH en el balance energético y el control de la glucemia. Además, caracterizaremos la localización anatómica y los neurotransmisores que secretan las subpoblaciones de neuronas de Arc-POMC que proyectan al DMH y al PVH. Por otro lado nos permitirán establecer si existe una vía Arc-POMC → DMH directa o indirecta, estimuladora o inhibitoria.

La caracterización funcional de los distintos circuitos que involucran a las neuronas de POMC podría tener implicancias terapéuticas de gran significancia. Por ejemplo, podrían diseñarse tratamientos que activen las subpoblaciones neuronales que disminuyen la ingesta sin afectar aquellas que proyectan al tronco encefálico y regulan funciones cardiovasculares.

## 4.6- DIFUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados serán difundidos en reuniones científicas y serán publicados en revistas internacionales con referato. En relación al último punto esperamos publicar en revistas de alto impacto, tal como viene consiguiendo el grupo de trabajo en publicaciones de esta línea (la revista Molecular Metabolism tiene un factor de impacto mayor a 6). Además, los resultados formarán parte de la Tesis Doctoral de la Lic. Milagros Trotta y del informe técnico como CPA de la Lic. Bárbara Giugovaz.

## 4.7- PROTECCIÓN DE LOS RESULTADOS

En principio, no prevemos necesidad de protección intelectual. Sin embargo, en caso de que surgiera la necesidad se solicitará asesoramiento de las oficinas de transferencia del CONICET y UBA.

## 4.8- ACTIVIDADES DE TRANSFERENCIA

No corresponde

## 5. CONFORMACIÓN DEL GRUPO DE INVESTIGACIÓN

### 5.1- JUSTIFICACIÓN DE LOS PARTICIPANTES

- **Dra. Viviana F. Bumashny (IR).** Estará a cargo de dirigir el proyecto, optimizar las técnicas para llevar a cabo los objetivos específicos, de administrar los recursos, de supervisar las actividades del grupo de colaboradores y la formación de estudiantes de grado y Doctorado. Interpretará los resultados obtenidos y será autora responsable de las publicaciones que surjan de los resultados del proyecto.
- **Dra. Jimena Balletero.** La incorporación de la Dra. Balletero permitirá llevar a cabo el objetivo 2 del presente plan gracias a su vasta experiencia trabajando en registros de patch-clamp en rodajas de cerebro y otros sistemas<sup>60–63</sup>. Además, contribuirá a las discusiones y escritura de los resultados.
- **Dra. Estefanía P. Bello.** Contribuirá a este proyecto tanto en el diseño y trabajo experimental como financieramente. En particular, su participación permitirá la realización de cirugías estereotáxicas para la inyección de vectores virales, además de contribuir con reactivos necesarios para la realización del proyecto. Además, contribuirá a las discusiones y escritura de los resultados.
- **Lic. Milagros Trotta.** Realiza su Doctorado en la línea de trabajo propuesta, con una Beca de Postgrado del CONICET, bajo la dirección de la IR en la Ftad. de Medicina (UBA). Realizará los experimentos propuestos en el objetivo 1 aplicando técnicas que ya ha puesto a punto previamente<sup>12, 18</sup>.
- **Dra. Bárbara Giugovaz.** Es técnica en electrofisiología del IFIBIO HOUSSAY y CPA de CONICET. Colaborará aportando asistencia técnica en los experimentos del objetivo 2.

## 5.2 INTERACCIÓN CON OTROS GRUPOS

El laboratorio de la IR está asociado al Grupo de Neurociencia de Sistemas (GNS) que forma parte del IFIBIO. El GNS está conformado por grupos liderados por investigadores con extensa experiencia en el campo de las neurociencias que comparten recursos y técnicas. El **Dr. Diego Pafundo**, Investigador Adjunto del CONICET, integrante del GNS en el IFIBIO, colaborará con la puesta a punto del sistema de estimulación láser para las rodajas de cerebro, ya que es experto en el tema<sup>64, 65</sup>. Esto permitirá realizar los registros electrofisiológicos del proyecto que requieran de optogenética dado que es un experto en este tipo de técnica.

El laboratorio de la IR mantiene colaboraciones con otros grupos de investigación externos al IFIBIO HOUSSAY. El **Dr. Marcelo Rubinstein** es Investigador Superior del CONICET. Director del INGEBI. Ex Director Doctoral y Post-doctoral de la IR. Colaborará con herramientas específicas para el estudio de POMC así como también con la posibilidad de realizar algunos experimentos de biología molecular en el INGEBI. Participará en la discusión de resultados. El **Dr. José Luis Ferrán** es investigador argentino con lugar de trabajo en la Universidad de Murcia, España. Es experto en técnicas de histología y neuroanatomía. Ha colaborado previamente con la IR<sup>18</sup> y seguirá colaborando mediante el aporte de sondas para las hibridaciones in situ, asistencia técnica y discusión de resultados.

## 5.3 ANTECEDENTES DE INTERACCIÓN ENTRE LOS PARTICIPANTES

La Lic. Milagros Trotta es egresada de la licenciatura en Biotecnología (UADE). Actualmente cursando el Doctorado con una Beca de Postgrado del CONICET, bajo la dirección de la IR en la Ftad. de Medicina (UBA). Realizó su Tesis de licenciatura bajo la dirección de la Dra. Bumashny caracterizando las neuronas GABAérgicas de POMC. Desde su incorporación al grupo en 2015 ya ha presentado varios trabajos en congresos nacionales e internacionales, es co-autora de otra publicación del laboratorio<sup>12</sup> y autora principal del trabajo del cual se desprende la hipótesis del presente proyecto<sup>18</sup>.

La Dra. Bárbara Giugovaz ya colabora con la Dra. Bello en otros proyectos de la investigadora desde hace un par de años, donde participa de la generación de electrodos de carbono para voltametría cíclica e implantación crónica de los mismos en ratones por medio de cirugías estereotáxicas.

La Dra. Balletero es una investigadora incorporada recientemente al GNS del IFIBIO

HOUSSAY luego de su estadía postdoctoral en el exterior y hará un valioso aporte al proyecto ya que permitirá incorporar técnicas de electrofisiología. La Dra. Bello pertenece al GNS del IFIBIO HOUSSAY y ya es una colaboradora habitual del grupo que dirige la IR, lo que se refleja en una publicación donde es co-autora, una presentación a un congreso nacional y uno internacional<sup>18</sup>.

#### **6. VIABILIDAD Y FACTIBILIDAD TÉCNICA**

Los animales se alojarán en el bioterio del IFIBIO HOUSSAY (Sistema Nacional de Bioterios, #1139/107) en donde se los mantiene en un ciclo luz oscuridad 12:12, alimento ad libitum, climatización frío/calor centralizada y supervisión por técnicas capacitadas que son miembros de la CPA de CONICET (Jessica Unger y Verónica Risso).

El IFIBIO cuenta con un droguero con drogas de uso común y balanzas. Además, tiene equipamiento que será usado en el proyecto y que incluye una termocicladora para realizar PCRs (MJ), un microscopio estereoscópico de fluorescencia acoplado a una cámara digital (Olimpus), un microscopio de fluorescencia AxioImager M2 motorizado con iluminación estructurada Apotome2 (Zeiss), un transiluminador, un freezer de -80C, estufas y termobloques para incubaciones, un micrótopo Leica para hacer cortes de tejidos y un criostato. Además, tenemos acceso a un microscopio confocal Olympus instalado en el IFIBIO que forma parte de un STAN del CONICET.

El Grupo de Neurociencias de Sistemas al cual está asociado el laboratorio de la IR, cuenta con dos puestos aptos para realizar registros en rodajas de cerebro y optogenética que incluye: mesa antivibratoria (TMC), una plataforma Gibraltar y micromanipuladores piezoeléctricos Burleigh, cámara de registro y sistema de regulación de la temperatura Warner y una bomba peristáltica Cole-Palmer y picospitzer (Dagan). Para la visualización los puestos cuentan con un microscopio Nikon Eclipse E600 equipado con luz infrarroja e iluminación IR-DIC, epifluorescencia con lasers LED (Tolket, Arg) y cámara CCD. La estimulación de Chr2 se realizará a través del objetivo de 40X de inmersión en agua con un láser 447nm (1mW max, tolket, Arg). Para la adquisición de señales se cuenta con amplificadores Axopatch 200b (Molecular Devices), conversores A/D x16 canales (Digidata, Molecular Devices), una computadora de alto rendimiento para registro de señales y software de adquisición y análisis PClamp 9. Además, se cuenta con un puesto para cirugía estereotáxica Kopf para ratones y con jeringas de 1-10 ul Hamilton acopladas a una bomba de inyección automática que se utilizará para la administración de los vectores virales.

El Laboratorio de Neuroendocrinología Molecular que dirige la IR cuenta con una microcentrífuga, dos juegos de micropipetas completos, una micropipeta electrónica, un dispensador electrónico, un glucómetro, material de cirugía, un vórtex, un sistema de electroforesis horizontal y un microondas, un agitador orbital, dos balanzas, una heladera con freezer, un freezer de -20°C. Todos los gastos generados de las instalaciones están a cargo de la UBA y el CONICET.

#### **7. ASPECTOS ÉTICOS**

En este proyecto no se llevará a cabo experimentación con pacientes ni se utilizarán datos ni muestras de personas físicas que requieran de autorización ni aprobación por parte de un comité de ética.

Todos los experimentos con animales se llevarán a cabo siguiendo las normas del SENASA RS617/2002 y han sido o serán aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Medicina de la UBA. Todos los miembros del proyecto cuentan con formación y autorización para el manejo de animales de laboratorio. Proyectos anteriores presentados por la IR que incluyen protocolos similares a los planteados en este proyecto fueron en su momento aprobados por la CICUAL y también aceptados para su publicación. Se adjunta el comprobante de la presentación del trámite.

#### **8. ASPECTOS DE LA SEGURIDAD LABORAL AMBIENTAL Y BIOSEGURIDAD RELACIONADOS CON EL PROYECTO**

El proyecto se desarrollará en el IFIBIO HOUSSAY situado en la Facultad de Medicina-UBA

(FMED) que cuenta con una división de higiene y seguridad laboral que monitorea el cumplimiento de las normas vigentes. Todo el personal e integrante del laboratorio recibe capacitación en materia de prevención y seguridad y en particular, necesitan aprobar un entrenamiento en el manejo de sustancias químicas y de equipamiento previo a su utilización. El almacenamiento de las sustancias químicas empleadas durante el proyecto se realiza en un droguero de seguridad conforme a las indicaciones de las normativas vigentes. Las sustancias inflamables se almacenan en gabinetes de seguridad adecuados. La manipulación de sustancias tóxicas se realiza bajo campana de extracción y son debidamente neutralizadas y descartadas de acuerdo a la normativa.

El laboratorio está provisto de descartadores rojos en todos los espacios rotulados debidamente para todos los elementos cortopunzantes (agujas, vidrios para montar, ampollas de solución fisiológica, etc). En bolsas rojas debidamente rotuladas se descartan los residuos biopatógenos o elementos contaminados por éstos (como ser restos de viruta, material plástico, guantes, etc.). De ser necesario, estos elementos se colocan previamente en cajas o botellas para evitar la rotura de las bolsas. La

Facultad de Medicina contrata una empresa especializada que gestiona el retiro y tratamiento de residuos patológicos y químicos.

## **9. AUTORIZACIONES CORRESPONDIENTES**

No aplica al presente proyecto.

## **10. RECURSOS FINANCIEROS**

### **10.1 GATOS DE CAPITAL**

No se solicitan ya que se cuenta con el equipamiento e infraestructura para desarrollar el proyecto como se detalla en el punto 6

### **10.2 GASTOS CORRIENTES**

Bienes de Consumo: en este rubro se incluye el presupuesto destinado a:

Drogas: tamoxifeno para la inducción de Cre; anestesia para las cirugías (uretano e isoflurano), analgésicos para las cirugías (lidocaína), aceite de sésamo (vehículo de inyección); antibióticos para la recuperación tras las inyecciones virales, moduladores farmacológicos de canales iónicos.

Reactivos de laboratorio: paraformaldehído (fijación de tejidos), anticuerpos y otros reactivos para inmunohistoquímica; Taq polimerasa, dNTPs y oligonucleótidos para genotipificación; agarosa para geles, marcador de peso molecular de ADN. Reactivos para hibridación in situ. Compra de vectores virales. Solventes. Sales y buffers para la preparación de soluciones de electrofisiología

Consumibles varios: Agujas y jeringas para inyectar ratones, material de plástico y de vidrio, tubuladuras para los sistemas de perfusión, capilares de vidrios para electrodos de registro y para la inyección viral, repuestos para los holders de los electrodos del sistema de registro electrofisiológico y para el sistema de inyección viral, alambre de plata, electrodos de referencia.

Gastos asociados al alojamiento de animales: Jaulas, viruta, alimento y compra de ratones (para cada año se estimó el costo para mantener un promedio de 60 jaulas por mes).

Viajes y viáticos: incluye gastos de transporte, alojamiento y comidas durante congresos y reuniones científicas. Durante el primer y segundo año se presentará un avance del trabajo en un congreso local (3 días) y para el tercer año se espera presentar el trabajo en un congreso internacional (5 días). Se contempla distribuir el presupuesto para viajes entre la IR y un becario.

Difusión y/o protección de resultados: en este rubro se incluyen los gastos de inscripción a reuniones científicas de acuerdo a lo detallado en el rubro anterior. Adicionalmente se contempla el pago de gastos de publicación de los resultados obtenidos en revistas internacionales con referato.

Servicios de Terceros: en este rubro se contemplan consultas a técnicos de bioterio y/o veterinarios, gastos que provengan de la importación directa de reactivos y equipamiento a través de Roecyts, para disminuir los costos de aquellos insumos que deban ser importados y gastos para reparación y el mantenimiento del equipo de laboratorio

utilizado en el presente proyecto.

## 11. DEDICACIÓN AL PROYECTO

Todos los integrantes (Dra. Bumashny, Dra. Ballestero, Dra. Bello, Lic. Trotta y Dra. Giugovaz) de este proyecto tienen lugar de trabajo en el Grupo Neurociencia de Sistemas del IFIBIO HOUSSEY y se comprometen a dedicar al menos un 50% de su tiempo a la realización de este proyecto.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Obesity and Overweight: World Health Organization (2019), (available at <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>).
2. S. de G. de S. República Argentina, **Boletín** 12 (2019) (available at [http://www.msal.gob.ar/plan-reduccion-mortalidad/boletin/2019-05\\_b12/noti0.php](http://www.msal.gob.ar/plan-reduccion-mortalidad/boletin/2019-05_b12/noti0.php)).
3. L. G. J. C. A. C. M. L. C. J. G. Jorge Elgart Guillermina Pfirter, *Rev. Argentina Salud Pública*. **1**, 6–12.
4. D. W. Haslam, W. P. James, *Lancet*. **366**, 1197–1209 (2005).
5. A. Peeters *et al.*, *Ann Intern Med*. **138**, 24–32 (2003).
6. WHO, World Health Organization-Diabetes Fact Sheet (2017), (available at <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>).
7. P. Aschner *et al.*, *Diabetes Res Clin Pr*. **103**, 238–243 (2014).
8. A. P. Coll, Y. C. Loraine Tung, Pro-opiomelanocortin (POMC)-derived peptides and the regulation of energy homeostasis. *Mol. Cell. Endocrinol.* **300** (2009), pp. 147–151.
9. H. Krude *et al.*, *Nat Genet.* **19**, 155–157 (1998).
10. L. Yaswen, N. Diehl, M. B. Brennan, U. Hochgeschwender, *Nat Med.* **5**, 1066–1070 (1999).
11. L. Varela, T. L. Horvath, *EMBO Rep.* **13**, 1079–1086.
12. R. Alsina, M. Trotta, V. F. Bumashny, *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **9**, 554 (2018).
13. A. J. Mercer, S. T. Hentges, C. K. Meshul, M. J. Low, *Front Neurosci.* **7**, 19 (2013).
14. J. N. Campbell *et al.*, *Nat. Neurosci.* (2017), doi:10.1038/nn.4495.
15. R. Chen, X. Wu, L. Jiang, Y. Zhang, *Cell Rep.* **18**, 3227–3241 (2017).
16. V. F. Bumashny *et al.*, *J Clin Invest.* **122**, 4203–4212 (2012).
17. M. J. Waterson, T. L. Horvath, Neuronal Regulation of Energy Homeostasis: Beyond the Hypothalamus and Feeding. *Cell Metab.* (2015), , doi:10.1016/j.cmet.2015.09.026.
18. M. Trotta *et al.*, *Mol. Metab.* (2020), doi:10.1016/j.molmet.2020.100985.
19. B. C. Jarvie, S. T. Hentges, *J Comp Neurol.* **520**, 3863–3876 (2012).
20. M. S. Dicken, R. E. Tooker, S. T. Hentges, *J Neurosci.* **32**, 4042–4048 (2012).
21. G. Wittmann, E. Hrabovszky, R. M. Lechan, *J Comp Neurol.* **521**, 3287–3302 (2013).
22. P. T. James, N. Rigby, R. Leach, *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* **11**, 3–8 (2004).
23. S. A. Patel *et al.*, *Glob Hear.* **11**, 71–79 e4 (2016).
24. M. J. Waterson, T. L. Horvath, *Cell Metab.* **22**, 962–970 (2015).
25. S. F. Leibowitz, N. J. Hammer, K. Chang, *Physiol. Behav.* (1981), doi:10.1016/0031-9384(81)90366-8.
26. M. G. Myers, M. A. Cowley, H. Munzberg, *Annu Rev Physiol.* **70**, 537–556 (2008).
27. M. Schneeberger, R. Gomis, M. Claret, *J Endocrinol.* **220**, T25–46 (2014).
28. K. G. Mountjoy, Pro-Opiomelanocortin (POMC) Neurons, POMC-Derived Peptides, Melanocortin Receptors and Obesity: How Understanding of this System has Changed Over the Last Decade. *J. Neuroendocrinol.* (2015), , doi:10.1111/jne.12285.
29. P. Kühnen *et al.*, *N. Engl. J. Med.* (2016), doi:10.1056/NEJMoa1512693.
30. F. S. J. de Souza *et al.*, *Mol Cell Biol.* **25**, 3076–3086 (2005).
31. M. A. Cowley *et al.*, *Nature.* **411**, 480–484 (2001).
32. J. L. Wilson, P. J. Enriori, *Mol. Cell. Endocrinol.* **418**, 108–119 (2015).
33. D. D. Lam *et al.*, *Endocrinology.* **156**, 1292–1302 (2015).
34. K. W. Williams *et al.*, *J Neurosci.* **30**, 2472–2479 (2010).
35. L. K. Heisler *et al.*, *Science (80-. )*. **297**, 609–611 (2002).

36. B. Meister *et al.*, *Eur J Neurosci.* **24**, 2731–2740 (2006).
37. B. Y. H. Lam *et al.*, *Mol. Metab.* (2017), doi:10.1016/j.molmet.2017.02.007.
38. C. M. King, S. T. Hentges, *PLoS One.* **6** (2011), doi:10.1371/journal.pone.0025864.
39. D. Bagnol *et al.*, *J. Neurosci.* **19**, RC26 (1999).
40. D. Xi, N. Gandhi, M. Lai, B. M. Kublaoui, *PLoS One* (2012), doi:10.1371/journal.pone.0036453.
41. N. Balthasar, Genetic dissection of neuronal pathways controlling energy homeostasis. *Obesity (Silver Spring)*. (2006), , doi:10.1038/oby.2006.313.
42. A. Branch, P. Shen, *Appetite and Food Intake* (CRC Press, 2017; <https://www.taylorfrancis.com/books/9781498723176>).
43. C. Li, P. Chen, M. S. Smith, *Endocrinology* (1998), doi:10.1210/endo.139.4.5905.
44. R. A. Kesterson, D. Huszar, C. A. Lynch, R. B. Simerly, R. D. Cone, *Mol Endocrinol.* **11**, 630–637 (1997).
45. X.-M. Guan, H. Yu, L. H. . Van der Ploeg, *Mol. Brain Res.* **59**, 273–279 (1998).
46. X. M. Guan *et al.*, *Neuroreport* (1998), doi:10.1097/00001756-199810260-00015.
47. L. Yang *et al.*, *J. Neurosci.* (2009), doi:10.1523/JNEUROSCI.4379-08.2009.
48. D. E. Lewis *et al.*, *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* (1993), doi:10.1152/ajpendo.1993.264.2.e279.
49. P. Chen, S. M. Williams, K. L. Grove, M. S. Smith, *J. Neurosci.* **24**, 5091–100 (2004).
50. M. S. Kim *et al.*, *Diabetes* (2000), doi:10.2337/diabetes.49.2.177.
51. S. Hayashi, A. P. McMahon, *Dev Biol.* **244**, 305–318 (2002).
52. H. Taniguchi *et al.*, *Neuron.* **71**, 995–1013 (2011).
53. L. K. Burke *et al.*, *Mol. Metab.* **5**, 245–252 (2016).
54. D. D. Lam *et al.*, *Endocrinology.* **156**, 1292–302 (2015).
55. E. Keifman *et al.*, *Br. J. Pharmacol.* (2019), doi:10.1111/bph.14663.
56. K. F. George Paxinos, Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. *São Paulo, Acad. Press* (2012), p. 360 p., (available at <https://www.elsevier.com/books/paxinos-and-franklins-the-mouse-brain-in-stereotaxic-coordinates/paxinos/978-0-12-391057-8>).
57. E. D. Berglund *et al.*, *J. Clin. Invest.* (2013), doi:10.1172/JCI70338.
58. S. L. Padilla, J. S. Carmody, L. M. Zeltser, *Nat Med.* **16**, 403–405 (2010).
59. J. L. Nathanson *et al.*, *Front. Neural Circuits* (2009), doi:10.3389/neuro.04.019.2009.
60. J. Ballesterio *et al.*, *J. Neurosci.* (2011), doi:10.1523/JNEUROSCI.6788-10.2011.
61. J. Ballesterio *et al.*, *Trends Hear.* (2015), doi:10.1177/2331216515619763.
62. M. W. H. Remme *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2014), doi:10.1073/pnas.1316216111.
63. T. Altwegg-Boussac *et al.*, *Brain* (2017), doi:10.1093/brain/awx175.
64. D. E. Pafundo, T. Miyamae, D. A. Lewis, G. Gonzalez-Burgos, *Biol. Psychiatry* (2018), doi:10.1016/j.biopsych.2018.01.018.
65. D. E. Pafundo, M. A. Nicholas, R. Zhang, S. J. Kuhlman, *J. Neurosci.* (2016), doi:10.1523/JNEUROSCI.2909-15.2016.