



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS DEPARTAMENTO DE CIENCIAS
Biológicas

Trabajo de Tesis Doctoral

“ESTUDIOS DEL ROL MODULADOR DE GHRELINA
SOBRE LA ACTIVIDAD NEUROENDOCRINA: Circuitos
neuronales implicados en la activación de las neuronas
CRF hipofisiotrópicas”

Lic. en Bioquímica. AGUSTINA CABRAL
Director: Dr. Mario Perelló
Codirector: Dra. María Olga Suescun

2014

Índice	3
Prologo	4
Abreviaturas	6
Introducción	8
Objetivos.....	30
Materiales Y Métodos	31
Resultados	48
Discusión.....	87
Bibliografía.....	105

Durante mi adolescencia hice diferentes cosas, fui a pintura, a guitarra, a inglés, e hice muchos deportes: pádel, vóley, softball, gimnasia artística y corro desde los 14 años. Mi papá me pasaba a buscar por el colegio con su camioneta Ford, me llevaba las zapatillas, las calzas deportivas las tenía debajo de mi uniforme. Hacia tantas cosas que de repente empecé a perder peso, lo problemático es que me gusto verme flaca, así que durante mis 14 años cada día comía menos y hacia más deporte. ¿Por qué lo hacía? No lo sé...Creía que tenía una vida “sana”, llegue a pesar 39 kg! Una semana antes de cumplir mis 15 años me operaron de apendicitis, durante la operación hice varias arritmias, muy probablemente debía al notorio desbalance energético que tenía. Mi médico y amigo de la familia, salió muy preocupado de la operación y hablo con mis padres. Desde ese día toda mi familia empezó a controlar cómo me alimentaba y cuánto deporte hacía. Finalmente mis hermanos, de repente, me empezaron a llamar “cara de moneda”, llegue a pesar 56 kg! Poco a poco gracias a todos ellos logre un equilibrio, mi padres cumplieron un rol fundamental. Mi papá siempre me decía: “todo en la vida se puede hacer, el problema es saber cuándo, dónde y con quién”. Mi mamá: “En la vida siempre hay que plantearse objetivos”. No sé si creer en las coincidencias o creer en el destino, pero cuando les conté a mis padres en qué consistía el trabajo de mi Tesis Doctoral, mi mamá dijo: “que bárbaro, ¿no? Vos trabajando en todo eso y pensar que casi fuiste anoréxica. Y sí... La verdad que me hace pensar un poco...

Si bien me ha tocado ser la autora de esta tesis soy sumamente consiente que este es un esfuerzo de mucha gente. Mis padres y mis hermanos han estado desde siempre, han confiado en mí, me han alentado, he aprendido infinitas cosas de ellos y siempre he sentido que estarían ahí incondicionalmente. A mis abuelos ejemplo de familia a seguir. A mis tíos, primos y ahijados. A toda la familia Rey. A mis “amigas de siempre”.

A todos mis compañeros del IMBICE, especialmente a los del laboratorio de Neurofisiología, todos han contribuido en mayor o menor medida en el desarrollo de esta tesis.

A Olga que fue la primera persona que me brindo la posibilidad de empezar a hacer investigación. A mis compañeras de la cátedra de Endocrinología de la facultad de ciencias exactas de la UNLP.

Le quiero agradecer especialmente a Mario, de quien he aprendido enorme cantidad de cosas, ha sido y es un gran referente para mi, ha confiado en mi desde el primer día y me ha apoyado y contenido siempre. Sin él este trabajo no hubiese sido posible.

Debo agradecer también a las autoridades del IMBICE, a CIC-PBA y a CONICET por el apoyo brindado y el soporte financiero (PICT 2010-1954, 2011-2142).

Finalmente mi felicidad no hubiese y no es posible sin mi gran AMOR y motor que es Nachy, él ha compartido conmigo día a día, mis tristezas, mis alegrías, mis fracasos y mis logros. Perdón por el tiempo que no te he dado y GRACIAS MI AMOR.

ACTH	Hormona adrenocorticotrofina
AgRP	Péptido relacionado con agouti
AHA	Área hipotalámica anterior
AP	Área Postrema
APOM	Área preóptica medial
ARC	Núcleo arcuato
BST _c	Núcleo del lecho de la estría
CDV	Complejo dorsal del vago
CRF	Factor liberador de corticotropina
DO	Densidad óptica
EM	Eminencia media
GABA	Acido γ -aminobutírico
GH	Hormona de crecimiento
GHSR	Receptor de secretagogo de la hormona de crecimiento
HHA	Hipotálamo-Hipófiso-Adrenal
ICV	Intra-cerebro-ventricular
IHQ	Inmunohistoquímica
MSH	Hormona estimulante de melanocito
NMDV	Núcleo motor dorsal del vago
NPV	Núcleo paraventricular hipotalámico
NPY	Neuropéptido Y
NSQ	Núcleo supraquiasmático
NTS	Núcleo del tracto solitario
Pe	Núcleo periventricular
RD	Núcleo dorsal del rafe
RM	Núcleo medial del rafe
SN	Sustancia nigra

SO	Núcleo supraóptico
VMH	Núcleo ventromedial hipotalámico
VTA	Área ventro tegmental

1. Conceptos generales

La homeostasis corporal es una propiedad de los organismos que tiende a mantener las condiciones internas estables. Múltiples mecanismos, principalmente autonómicos y endocrinos hacen la homeostasis posible, y el cerebro cumple un rol fundamental en su control. Entre los ejes neuroendocrinos, uno de los más importantes encargados de mantener el medio interno es el eje Hipotálamo-Hipófiso-Adrenal (HHA). Ante la presencia de un estresor, definido como cualquier estímulo, externo o interno que, de manera directa o indirecta, favorece la desestabilización del medio interno; el eje HHA activa una serie de mecanismos tendientes a aumentar la síntesis y secreción de glucocorticoides, estos poseen diversas y complejas funciones y son los principales mediadores de la respuesta al estrés. La homeostasis energética, definida como la regulación entre las energías ingeridas y las gastadas, es fundamental en la regulación de la homeostasis corporal. La hormona ghrelina cumple un rol importante en la regulación del balance energético, como así también ejerce acciones sobre otros sistemas neuroendocrinos, entre los que se destaca al eje HHA.

De esta manera el estudio y comprensión de cómo funcionan y se integran estos mecanismos a nivel central, es clave para entender qué y cómo hacemos para lograr un equilibrio dinámico y por lo tanto una estabilidad en las propiedades de nuestro medio interno.

2. Eje Hipotálamo-Hipófiso-Adrenal

El eje HHA es un eje neuroendocrino constituido por tres niveles: uno hipotalámico, uno hipofisario y uno adrenal. Estos niveles se vinculan regulando, fundamentalmente, la secreción de glucocorticoides. En situaciones donde se produce un desequilibrio homeostático dicho eje activa una serie de mecanismos con el fin de mantener las condiciones internas estables. Durante estas situaciones, aumenta la síntesis de factor liberador de corticotrofina (CRF, de sus siglas en inglés, para *corticotropin releasing factor*) en el núcleo paraventricular del hipotálamo (NPV) y es liberado

de las terminales nerviosas presentes en la eminencia media (EM) al sistema porta-hipofisario. Cuando arriba a la adenohipófisis, el CRF se une a sus receptores específicos presentes en las células corticotropas, en las cuales estimula la expresión de la pro-hormona proopiomelancortina (POMC) y aumenta la liberación de gránulos preformados que contienen los péptidos derivados de POMC, entre ellos la hormona adrenocorticotrofina (ACTH, de sus siglas en inglés, para *adrenocorticotropin hormone*). La ACTH llega por circulación a la corteza adrenal donde induce la síntesis y liberación de glucocorticoides; en los humanos principalmente cortisol y en los roedores corticosterona. Los glucocorticoides median una enorme cantidad de funciones endocrino-metabólicas y ejercen un rol importante en la regulación del eje HHA; a través de un *feedback* o retroalimentación negativa sobre el hipotálamo, la EM, la hipófisis, e incluso la propia corteza adrenal, retro-inhibiendo así el sistema [1] (Figura 1).

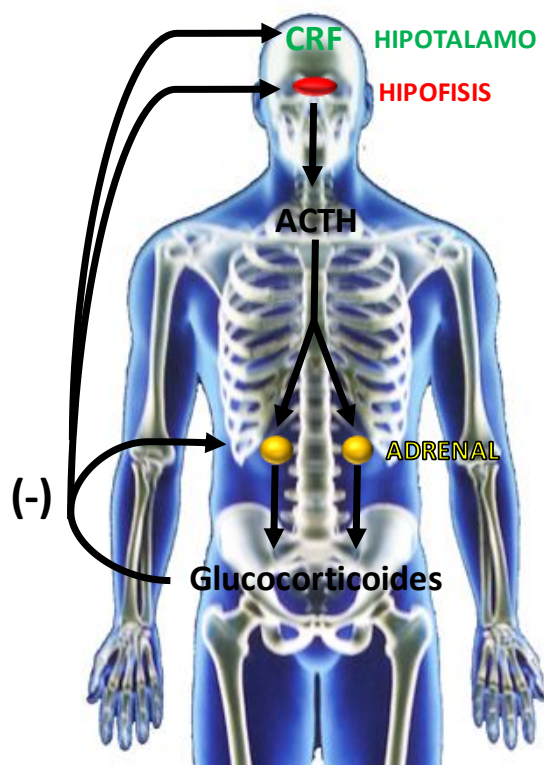


Figura 1. Esquema de mecanismos de regulación del eje Neuroendocrino HHA.

2.1 Hipotálamo y CRF

El hipotálamo es una de las regiones del cerebro de mamíferos más conservadas y evolucionadas y es la principal estructura del cerebro encargada de mantener la homeostasis. Se encuentra en el diencefalo y se extiende desde la región del quiasma óptico hasta el borde caudal de los cuerpos mamilares. Anteriormente el hipotálamo se relaciona con el área preóptica, caudalmente se fusiona en el tegmento del mesencéfalo, por arriba está limitado por el tálamo y por debajo y lateralmente está la región subtalámica. El hipotálamo se conecta con la hipófisis a través de dos vías: por medio del tracto hipotálamo-hipofisario, en el cual fibras nerviosas viajan desde los núcleos supraóptico (SO) y el NPV hasta el lóbulo posterior de la hipófisis; y por el sistema porta-hipofisario, en el cual la EM y el infundíbulo se conectan con plexos capilares en el lóbulo anterior de la hipófisis. El hipotálamo está formado por varios acúmulos celulares bien definidos, denominados núcleos hipotalámicos [2]. Entre los núcleos hipotalámicos se encuentra el NPV, el cual se ubica a ambos lados del tercer ventrículo, de allí deriva su nombre. El NPV está formado principalmente por células neuroendocrinas magnocelulares, que sintetizan y secretan oxitocina o vasopresina; y por células neuroendocrinas parvocelulares, que sintetizan y secretan CRF, hormona liberadora de tirotrófina o somatostatina. La oxitocina y la vasopresina, son empaquetadas en gránulos secretorios y transportadas por el tracto hipotálamo-hipofisario hacia la hipófisis posterior. El CRF, la hormona liberadora de tirotrófina y la somatostanina, son almacenadas en gránulos secretorios y transportadas por los axones de las células parvocelulares hacia la EM donde se liberan al sistema porta-hipofisario y llegan a la hipófisis anterior. Las neuronas que segregan sus productos al sistema porta-hipofisario se denominan neuronas hipofisiotrópicas. Particularmente para el CRF, más del 90% de las neuronas que producen y secretan CRF son hipofisiotrópicas [3]. Además de las células neuroendocrinas, el NPV contiene interneuronas que regulan localmente al NPV y/o proyectan a otras zonas del cerebro [1, 3].

El CRF humano es un péptido de 41 aminoácidos que proviene del clivaje enzimático de una pre-pro-hormona de 196 aminoácidos y está altamente conservado filogenéticamente, la secuencia del CRF de ratones y de ratas es idéntica a la del humano y en otras especies solo

difiere en unos pocos aminoácidos. El CRF pertenece a una familia de proteínas que interactúan entre sí, conformadas por el CRF, una proteína de unión al CRF y las urocortinas que son ligandos endógenos de los receptores de CRF. En el cerebro existen dos fuentes principales de CRF; una perteneciente al eje HHA secretado por las neuronas CRF hipofisiotrópicas del NPV, y otra en sitios de cerebro que no pertenecen al eje HHA, como son la amígdala, el hipocampo y la corteza. Las neuronas CRF que no pertenecen al eje HHA se relacionan con efectos sobre el comportamiento y la ansiedad [4]. Existen dos tipos de receptores de CRF (CRF-R): CRF-R1 y CRF-R2, ambos están acoplados principalmente a proteína G_s . y activan la proteína adenilato ciclasa para finalmente aumentar los niveles de AMPc y activar la cascada de señalización intracelular [4, 5]. Si bien CRF-R1 y CRF-R2 se expresan en muchos núcleos cerebrales de humanos y roedores [4]; la inducción del eje HHA está solamente mediada por la activación de los receptores CRF-R1 en las células corticotropas.

Las neuronas CRF hipofisiotrópicas reciben inervaciones de distintos sitios cerebrales y están reguladas por varios neurotransmisores, lo cual no sorprende dado la gran cantidad de estresores que pueden activar al eje HHA. Entre los neurotransmisores más importantes que controlan y regulan la actividad de las neuronas CRF se encuentran principalmente el ácido γ -aminobutírico (GABA), el glutamato, el neuropéptido Y (NPY), la hormona estimulante de melanocitos alfa (α -MSH, de sus siglas en inglés, para *α -melanocyte stimulating hormone*), las catecolaminas y la serotonina (Figura 2).

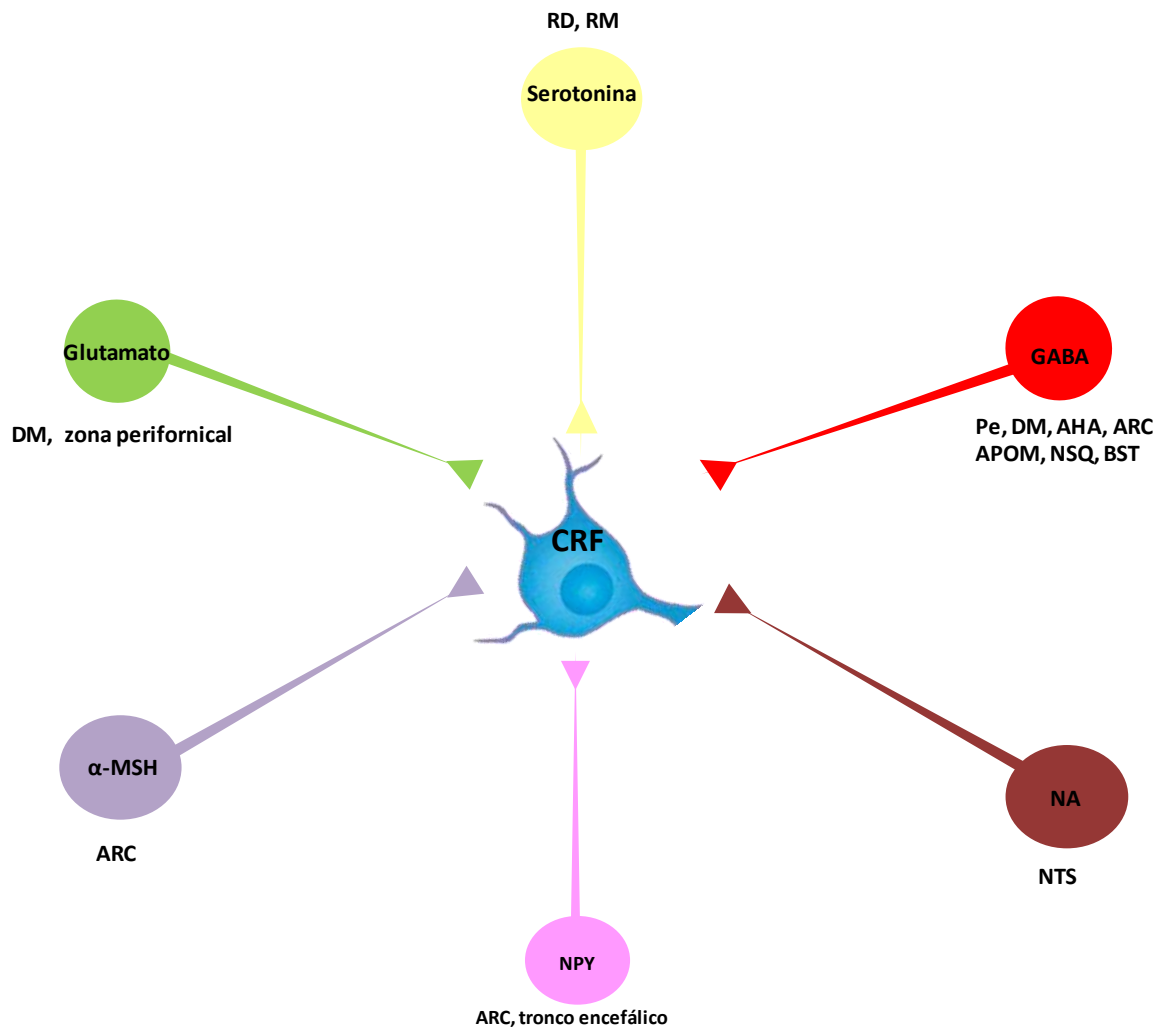


Figura 2. Principales neurotransmisores y sitios cerebrales que inervan a las neuronas CRF hipofisiotróficas del NPV. Las abreviaturas indican: ARC: núcleo arcuato, AHA: área hipotalámica anterior, APOM: área preóptica medial, BST: núcleos del lecho de la estría terminali, DM: núcleo dorsomedial, Pe: zona periventricular, NSQ: núcleo supraquiasmático, NTS: núcleo del tracto solitario, RD: rafe dorsal, RM: rafe medial, CRF: factor liberador de corticotrofina, GABA: ácido γ -aminobutírico, α -MSH: hormona estimulante de melanocitos alfa, NA: noradrenalina y NPY: neuropéptido Y

Inervaciones GABAérgicas y glutamatérgicas de las neuronas CRF hipofisiotróficas. El GABA y el glutamato son dos de los principales neurotransmisores que controlan la actividad de las neuronas CRF [6, 7]. Las neuronas parvocelulares del NPV están densamente inervadas por terminales GABAérgicas y glutamatérgicas, estos circuitos se integran con el fin de modular la actividad de las neuronas CRF [6, 8, 9]. Las inervaciones GABAérgicas constituyen aproximadamente el 50 % de todas las inervaciones del NPV y generan un importante tono inhibitorio sobre las neuronas CRF, el cual prevalece sobre el tono estimulatorio [10]. Una gran proporción de las inervaciones GABAérgicas del NPV provienen de zonas intrínsecas del hipotálamo incluyendo sitios de

inmediata proximidad al NPV como es el núcleo periventricular (Pe), como así también del núcleo hipotalámico dorsomedial (DM), el área hipotalámica anterior (AHA), el área pre-óptica medial (APOM), el núcleo arcuato (ARC) y el núcleo supraquiasmático (NSQ) [11, 12]. Por otro lado, los núcleos del lecho de la estría terminal (BST_c) también mandan una proporción significativa de terminales GABAérgicas al NPV [11, 12]. Análisis estructurales confirman que en la zona parvocelular del NPV, las aferencias GABAérgicas están principalmente innervando a las neuronas CRF [13]. Las neuronas CRF hipofisiotrópicas expresan el subtipo A del receptor de GABA (GABA_A), por lo tanto el GABA puede actuar directamente sobre las neuronas CRF [13]. Asimismo, varios estudios muestran una respuesta menor del eje HHA y de las neuronas CRF inducida por estrés agudo, en presencia de muscimol, un agonista específico de los receptores GABA_A [13-15]. Las aferencias glutamatérgicas del NPV son mucho más escasas que las GABAérgicas y provienen principalmente del núcleo DM y de la zona perifornical [12, 16]. Si bien algunas evidencias sugieren que el glutamato puede activar directamente las neuronas parvocelulares del NPV, el principal rol de las innervaciones glutamatérgicas en el NPV es regular el tono GABAérgico local [16]. Dado que gran parte de las neuronas GABAérgicas que innervan al NPV están reguladas positivamente por aferencias glutamatérgicas, el glutamato podría regular negativamente a las neuronas CRF vía activación de las neuronas GABAérgicas [6, 8].

Inervaciones del NPY y de α -MSH sobre las neuronas CRF hipofisiotrópicas. El NPY es uno de los principales neuropéptidos que regula a las neuronas CRF ejerciendo un rol estimulador sobre el eje HHA [17]. El NPY se encuentra en terminales neuronales que innervan profusamente a las neuronas CRF. Las aferencias al NPV que contienen el NPY provienen principalmente de las neuronas del núcleo ARC, las cuales también producen el péptido relacionado con agouti (AgRP, de sus siglas en inglés, para *agouti-related peptide*) y GABA. Además, las células productoras de NPY provienen del tronco encefálico, particularmente del núcleo del tracto solitario (NTS) y co-producen catecolaminas [17, 18]. El NPY es uno de los agentes orexigénicos (aumento del apetito) más potentes, aunque también está involucrado en una gran variedad de funciones fisiológicas, como la ingesta de agua, el ritmo circadiano, la ansiedad, la memoria, la liberación de

hormonas y la regulación de la presión sanguínea [19-21]. Se han descrito 5 subtipos de receptores para el NPY, llamados Y1, Y2, Y3, Y4 y Y5. De los cinco subtipos, los subtipos Y1 e Y5 son lo que mayoritariamente se expresan en el NPV de roedores [22, 23]; y las neuronas CRF expresan el receptor Y1 [24]. Por lo tanto, el NPY puede estimular al eje HHA a través de acciones directas sobre las neuronas CRF [24-26]. La α -MSH forma parte de las melanocortinas, las cuales derivan del procesamiento pos-traducciona l de POMC, sintetizado principalmente en el núcleo ARC. Asimismo, las inervaciones del NPV conteniendo α -MSH provienen principalmente del núcleo ARC [26]. Al igual que el NPY, la α -MSH ejerce un rol estimuladorio sobre el eje HHA. Una de las funciones más importantes de α -MSH son sus efectos anorexigénicos (inhibición del apetito) [27, 28]. En el sistema nervioso central de mamíferos, se han descrito 3 subtipos de receptores de melanocortinas (MCR) llamados MC3R, MC4R y MC5R, los cuales median diferentes efectos de las melanocortinas [29]. Los MC3R y MC4R están principalmente implicados en la regulación del balance energético y la ingesta de alimento; por otro, lado se conoce muy poco sobre las acciones en las que participa el MC5R [30, 31]. Las neuronas CRF del NPV expresan el receptor MC4R y la administración de agonistas de dicho receptor estimula la expresión de CRF [32]. De esta manera, α -MSH puede activar al eje HHA actuando directamente sobre las neuronas CRF. Por lo tanto, el NPY y la α -MSH pueden activar a las neuronas CRF, y ambas señales, orexigénicas y anorexigénicas respectivamente, pueden ser interpretados como estresores para el eje HHA.

Inervaciones catecolaminérgicas sobre las neuronas CRF hipofisiotrópicas. El sistema catecolaminérgico es otro importante sistema que regula a las neuronas CRF. Las inervaciones noradrenérgicas del NPV provienen principalmente de las regiones A2/C2 NTS [12]. El NTS recibe e integra información del sistema aferente visceral como somático y se activa en respuesta a varios estresores [33-36]. Algunas evidencias sugieren que la noradrenalina estimula directamente la expresión y secreción del CRF a través de los receptores adrenérgicos α_1 [37, 38]. Sin embargo, otros trabajos, muestran que la activación de las neuronas CRF inducida por noradrenalina está mediada por inter-neuronas glutamatérgicas [39]. Por otro lado, también se ha

mostrado que la noradrenalina tiene un efecto dual sobre el tono GABAérgico local. A nivel presináptico inhibe la liberación de GABA a través de los receptores adrenérgicos α_1 y el soma de estimula la liberación de GABA a través de los receptores adrenérgicos α_2 [39]. Así, si bien varios estudios muestran que la secreción de noradrenalina aumenta en el NPV en respuesta al estrés, la activación de las neuronas CRF mediada por el sistema catecolaminérgico varía según el tipo e intensidad de estímulo [40].

Inervaciones serotoninérgicas sobre las neuronas CRF hipofisiotrópicas. La aferencias serotoninérgicas de las neuronas parvocelulares del NPV, provienen principalmente de la parte dorsal y medial del núcleo del rafe, RD y RM, respectivamente [12]. La mayoría de los estudios muestran que la serotonina activa a las neuronas CRF principalmente a través de los receptores de serotonina $5HT_{2A}$ y el $5HT_{1A}$; aunque se han encontrado una cantidad limitada de fibras serotoninérgicas en el NPV [12]. Asimismo, se ha mostrado que la lesión del núcleo del rafe como de las inervaciones serotoninérgicas en el NPV disminuyen la activación del eje HHA inducida por estrés; hecho que apoya un rol estimulador de la serotonina sobre el eje HHA [12].

2.2 Hipófisis y ACTH

La hipófisis se encuentra ubicada dentro del cuerpo de la silla turca, está recubierta por el diafragma de la silla o tienda de la hipófisis la cual conecta el tallo hipofisario a la EM del hipotálamo. La hipófisis consta fundamentalmente de dos partes; un lóbulo anterior o adenohipófisis y un lóbulo posterior o neurohipófisis. En la adenohipófisis se encuentran 5 tipos de células secretoras de hormonas, las células corticotropas que expresan POMC incluyendo ACTH, las células somatotropas que expresan hormona de crecimiento (GH, de sus siglas en inglés, para *growth hormone*), las células tirotropas que expresan la hormona estimuladora de la tiroides o tirotrófina, las células gonadotropas que expresan la hormona estimuladora de folículos y la hormona luteinizante, y las células lactotropas que expresan prolactina [1, 2].

La molécula de ACTH se origina del clivaje preciso de POMC, del cual se puede generar además: β LPH, β endorfinas, γ LPH, α MSH, β MSH, γ MSH y fragmentos N-POMC [27]. Muchas

señales actúan sinérgicamente para activar la expresión de POMC en la hipófisis; se reconoce al CRF como el más potente, aunque su acción es potenciada por la vasopresina, la oxitocina, la angiotensina II, las catecolaminas y el péptido intestinal vasoactivo.

2.3 Glándula adrenal y glucocorticoides

A nivel de la corteza adrenal, la ACTH se une a los receptores de melanocortina-2 (MC2R), los cuales están acoplados a proteína G_s , e induce un aumento en los niveles de AMPc que junto con un aumento del Ca^{+2} intracelular activan la síntesis y secreción de glucocorticoides. Los glucocorticoides son esteroides derivados del ciclopentanoperhidrofenantreno y ejercen sus efectos al unirse a receptores específicos citosólicos, los cuales median las acciones de estas hormonas. Los receptores para los glucocorticoides son factores de transcripción y consisten de un dominio de unión al ligando en el extremo C-terminal, un dominio de unión al ADN central que interacciona con secuencias específicas del ADN y una región hipervariable en el extremo N-terminal. La unión de los glucocorticoides a sus receptores citosólicos resulta en la activación del complejo hormona-receptor a través de un mecanismo que lleva a la disociación de proteínas de calor (HSP90 y HSP70), de esta manera el complejo hormona-receptor entra al núcleo, se une a sitios específicos en el ADN e interacciona con otros factores de transcripción. La unión del complejo hormona-receptor al ADN induce la expresión de genes específicos, las proteínas resultantes provocan las respuestas de los glucocorticoides que pueden ser inhibitorias o estimuladoras según el gen o tejido específico afectado.

Entre los principales efectos de los glucocorticoides se destacan sus acciones sobre el metabolismo de los hidratos de carbono, lípidos y proteínas. Los glucocorticoides aumentan los niveles de glucosa plasmática (efectos hiperglucemiantes) ejerciendo acciones sobre el metabolismo de glucógeno, proteínas y lípidos. De esta manera, a nivel hepático estimulan la acumulación de glucógeno y la gluconeogénesis. En los tejidos periféricos, como el tejido adiposo y el músculo, los glucocorticoides inhiben la captación y utilización de glucosa. Asimismo, estimulan la lipólisis en el tejido adiposo, aumentando la cantidad de ácidos grasos libres, y en el

músculo esquelético, estimulan la degradación de proteínas; ambas acciones generan sustratos para ser utilizados preferentemente en la gluconeogénesis. Los glucocorticoides también tienen efectos sinérgicos con otras hormonas hiperglucemiantes, como las catecolaminas y el glucagón. Como resultado, se genera una resistencia a la insulina lo que lleva a un aumento de los niveles de glucosa circulante. Por otro lado, estimulan la diferenciación de los adipocitos, en exceso llevan a una acumulación de tejido adiposo. Además, los glucocorticoides poseen diversas acciones sobre otros órganos diana entre las que se incluyen el riñón y el tubo digestivo, en donde inhiben la reabsorción y absorción de calcio, respectivamente; en el hueso y cartílago inhiben la síntesis de colágeno. Sobre el eje tiroideo y gonadal ejercen principalmente acciones inhibitorias. Sobre el sistema inmune reducen la cantidad de linfocitos T y B circulantes, disminuyen la síntesis de inmunoglobulinas y estimulan la apoptosis de linfocitos. Asimismo, disminuyen la cantidad de eosinófilos. Por otro lado, también pueden inhibir directamente la producción de citoquinas de los linfocitos. Los glucocorticoides tienen efectos antiinflamatorios, los cuales se dan principalmente por la inhibición de la diferenciación de los monocitos a macrófagos, la inhibición de la actividad fagocítica de macrófagos y la inhibición de prostaglandinas y citoquinas proinflamatorias. En la piel inhiben la división celular de la epidermis y la síntesis de ADN, como también reducen la síntesis de colágeno. En el músculo causan atrofia y disminución de la síntesis de proteínas. Asimismo, también son importantes principalmente para el desarrollo normal del feto. Estimulan la maduración pulmonar y el desarrollo normal del cerebro. Los glucocorticoides incrementan la contractibilidad del corazón, aumentan el gasto cardíaco y aumentan el tono vascular periférico, principalmente por acrecentar los efectos vasoconstrictores de las catecolaminas, en exceso generan hipertensión. En el riñón, causan retención de sodio y excreción de potasio mediado por los receptores de mineralocorticoides. Asimismo, aumentan la velocidad de filtración glomerular a través de sus receptores específicos. Se ha demostrado que el exceso o deficiencia de glucocorticoides puede alterar profundamente el comportamiento y la función cognitiva.

2.4 Regulación del eje HHA

La regulación del eje HHA depende principalmente de tres mecanismos:

-La liberación pulsátil de CRF y ACTH ligada al ritmo circadiano, el cual es el resultado de acontecimientos en el sistema nervioso central que regulan el número y magnitud de los episodios secretores de CRF y de ACTH. En humanos, los niveles de glucocorticoides aumentan en las primeras horas de la mañana y comienzan a descender durante la tarde siendo muy bajos durante las primeras horas de sueño. El ritmo circadiano puede alterarse, por ejemplo, por cambios en el patrón de sueño o en los horarios de alimentación; por algún tipo de estrés; trastornos del sistema nervioso central; enfermedades y trastornos metabólicos; entre otros.

-Diferentes tipos de estrés pueden activar al eje HHA. La respuesta del eje HHA se origina en el hipotálamo al aumentar la secreción de CRF la cual, como detallamos anteriormente, está regulada por diferentes neurotransmisores. La secreción de CRF lleva por consiguiente al aumento de la secreción de ACTH y glucocorticoides.

- Por el *feedback* negativo que ejercen los glucocorticoides sobre la síntesis y secreción de CRF y de ACTH. A nivel hipofisario, los glucocorticoides inhiben el procesamiento de POMC y la liberación de ACTH; a nivel hipotalámico inhiben la síntesis del ARNm de CRF y de vasopresina. El *feedback* negativo de los glucocorticoides es un importante mecanismo de control del eje HHA, el cual lleva a una disminución de la actividad del eje cuando las concentraciones de los glucocorticoides son elevadas.

3. La Ghrelina

La ghrelina, descubierta por el grupo del Dr. Kangawa en el año 1999, es un péptido de 28 aminoácidos esterificado con ácido n-octanoico producido principalmente en el estómago [41]. Su nombre proviene del dialecto proto-indo-europeo, donde la raíz *ghre* significa crecimiento y el sufijo *relin* significa liberación, haciendo referencia a su capacidad de liberación de la GH, ya que fue la primera acción que se le atribuyó. La ghrelina media sus acciones a través de la activación de su receptor específico, denominado receptor de secretagogos de la hormona del crecimiento (GHSR, de sus siglas en inglés, para *growth hormone secretagogue receptor*) [42], el cual se

expresa en muchos tejidos centrales y periféricos [42, 43]. Entre las acciones de la ghrelina se destacan su capacidad para estimular la secreción de GH a nivel hipofisario y su potente efecto orexigénico a nivel del sistema nervioso central. La concentración plasmática de ghrelina depende del estado nutricional. En situaciones de balance energético negativo, la secreción de ghrelina aumenta y regula una serie de mecanismos tendientes a mantener la homeostasis, incluyendo la estimulación del apetito y la activación de respuestas neuroendocrinas tendientes a preservar energía [44-46].

3.1 Estructura de la ghrelina

El precursor de ghrelina es un péptido de 117 aminoácidos denominado pre-pro-ghrelina, que consta de un péptido señal de 23 aminoácidos y un segmento de 94 aminoácidos correspondiente a la pro-ghrelina. La pro-ghrelina está constituida por una secuencia de 28 aminoácidos que corresponde a la ghrelina y por un péptido de 66 aminoácidos denominado C-ghrelina en el extremo C-terminal [41, 47]. La ghrelina de rata y de ratón son totalmente homólogas y difieren sólo en dos aminoácidos de la ghrelina humana; lo cual refleja una alta conservación evolutiva de la ghrelina en mamíferos [48]. La ghrelina posee una acilación en el residuo serina 3, esta reacción es catalizada por la enzima denominada ghrelina O-aciltransferasa (GOAT) [49, 50]. La GOAT es una enzima miembro de las O-aciltransferasas de membrana y la ausencia de la GOAT lleva a la ausencia completa de la ghrelina bioactiva en circulación [49]. Se postula que la acilación de la ghrelina se produce en el retículo endoplasmático antes del procesamiento de la pro-ghrelina [50, 51]. La ghrelina es la única hormona acilada conocida a la fecha, y tanto el grupo n-octanoilo como los primeros 5 aminoácidos en el extremo N-terminal son esenciales para la unión de la ghrelina al GHSR, y para su bioactividad [41, 52]. Por otro lado, existen subproductos del procesamiento del gen de la ghrelina, entre los que se destacan la obestatina, la desacil-ghrelina y la desglut-14ghrelina. La obestatina proviene del clivaje del extremo C-terminal de la pro-ghrelina, la desglut-14-ghrelina se produce por un procesamiento diferente del ARNm del gen de pre-pro-ghrelina y la desacil-ghrelina no presenta la acilación postraduccional [53, 54].

3.2 Producción de la ghrelina

La ghrelina se produce principalmente en el sistema digestivo, siendo las células X/A del estómago las que producen las mayores cantidades [41, 55]. En el tracto gastrointestinal la expresión de ghrelina disminuye gradualmente desde el duodeno al colon [56]. Los niveles de ghrelina plasmática descienden alrededor del 55% en personas sometidas a una gastrectomía [57, 58] mientras que en roedores gastrectomizados el descenso es de un 80%; lo cual indica que el estómago es el mayor sitio de producción de ghrelina [59]. Por otra parte, algunos estudios sugieren que la ghrelina también es producida por neuronas hipotalámicas [60, 61]. Sin embargo, la existencia de producción central de ghrelina aún sigue en debate, debido a que otros trabajos no han podido confirmar la presencia de células productoras de ghrelina en el cerebro de roedores [62, 63] Finalmente, se ha descrito expresión de ghrelina en otros tejidos tales como la hipófisis, los riñones, las glándulas adrenales, la tiroides, las mamas, el ovario, la placenta, los testículos, la próstata, el hígado, la vesícula biliar, musculo esquelético, el miocardio, la piel, el hueso y el pulmón [64]. Sin embargo, los niveles de expresión en estos lugares son mínimos y además no expresan la enzima GOAT.

3.3 Regulación de la secreción de la ghrelina

La ghrelina y la desacil-ghrelina están presentes en el plasma [53]. Sin embargo, la desacil-ghrelina es la principal forma circulante, constituyendo el 90% de la ghrelina circulante total. En la actualidad, aún no está establecido cuáles son los mecanismos que median la secreción de ghrelina en relación a la desacil-ghrelina. Sin embargo, la ghrelina tiene menor vida media que la desacil-ghrelina; asimismo, la ghrelina circulante se transforma rápidamente a desacil-ghrelina por esterases plasmáticas, ambas razones podrían explicar la menor cantidad de ghrelina plasmática comparada con las cantidades de desacil-ghrelina [65, 66].

Los niveles de ghrelina plasmática fluctúan diariamente en relación a la ingesta de alimento, aumentan antes de la ingesta de alimento, alcanzando niveles que estimulan el apetito, y disminuyen post-prandial [67]. El aumento de los niveles de ghrelina plasmática antes de la

ingesta de alimento coincide con las acciones orexigénicas de la hormona. Por otro lado, la disminución post-prandial estaría relacionada con efectos de saciedad por la ingesta de nutrientes. Se ha planteado que otras hormonas como la insulina, la colecistoquinina, el péptido YY, y el péptido similar al glucagón tipo 1, las cuales aumentan rápidamente después de cada comida, puedan contribuir al descenso post-prandial de los niveles de ghrelina plasmática [67, 68]. De esta manera, el aumento preprandial y el descenso post-prandial de los niveles de ghrelina plasmática sustentan su rol fisiológico sobre la estimulación del apetito y el consecuente aumento de la ingesta de alimento.

El estado nutricional es un importante regulador de la concentración de ghrelina circulante [45, 69]. Los niveles de ghrelina plasmática aumentan durante restricción calórica y/o en ayuno [70]. Este aumento en ambas situaciones, tendría como fin no sólo estimular el apetito sino también disminuir el gasto energético y mantener principalmente los niveles de glucemia estables. Además, la pérdida de peso corporal lleva, por sí mismo, a un aumento de los niveles de ghrelina plasmática [67]. Numerosos estudios muestran que los pacientes con anorexia nerviosa poseen elevados niveles de ghrelina plasmática. En dichos pacientes, los niveles de ghrelina plasmática se normalizan con la ingesta de alimento y la recuperación del peso [71]. Por otro lado, las personas obesas poseen menores niveles de ghrelina plasmática, respecto a personas con un peso corporal normal [45, 72, 73]. Asimismo, ratones con obesidad inducida por sobrealimentación muestran menores niveles de ghrelina plasmática, respecto a animales con un peso corporal normal [74, 75]. También, se han reportado niveles bajos de ghrelina plasmática y resistencia a su acción central, en ratones obesos generados con una dieta con alto contenido graso, respecto a los animales con una dieta balanceada [76, 77]. La composición de la dieta en sí misma también influye sobre los niveles de ghrelina plasmática, independientemente de los cambios en el peso corporal. En particular, ratones obesos generados con una dieta balanceada o con una dieta con un 40 % menos de calorías normalizan su peso corporal, sin embargo, los niveles de ghrelina plasmática sólo se incrementan en los animales alimentados con un 40 % menos de calorías [76]. De esta manera, los niveles de ghrelina plasmática fluctúan según cambios en el peso corporal y

son afectados por el tipo de alimentación, ambos factores son claves para el control del balance energético.

3.4 El receptor de ghrelina

El GHSR pertenece a la familia de receptores acoplados a proteína G [42]. Existen dos subtipos de GHSR como resultado de empalme alternativo: el subtipo 1a y el subtipo 1b. El GHSR1a es una proteína de 366 aminoácidos con 7 dominios transmembrana; mientras que GHSR1b es una proteína de 289 aminoácidos con 5 dominios transmembrana [42]. El GHSR1a es el único receptor conocido de la hormona ghrelina. El GHSR1a se caracteriza por poseer una alta actividad constitutiva en ausencia de ligando [78], la cual tendría implicancias fisiológicas importantes [79]. Por otro lado, el GHSR1b no es activado por la ghrelina, y aún no está clara su funcionalidad [42]. Sin embargo, algunos estudios indican que el GHSR1b es capaz de formar heterodímeros con el GHSR1a y así disminuir su actividad constitutiva [80-82].

La vía $G\alpha_q$ /PLC es la principal cascada de señalización del GHSR1a [42, 83]. La activación de GHSR1a lleva a la subsecuente activación de la enzima fosfolipasa C, producción de inositol trifosfato y diacilglicerol. El inositol tri-fosfato media el aumento del Ca^{+2} intracelular y el diacilglicerol activa a la proteína quinasa C. Por otro lado, se ha reportado que el GHSR1a también puede activar la vía $G\alpha_{i/o}$ cuando actúa en forma constitutiva [84, 85].

El GHSR1a se expresa principalmente a nivel central, aunque también se ha descrito en órganos periféricos. Como es de esperar GHSR1a se expresa en la hipófisis, consistente con su función en la producción de GH, y también en diferentes sitios del cerebro, implicados principalmente en la ingesta de alimento y balance energético [42, 43, 86, 87]. En el cerebro, el GHSR1a se expresa en altos niveles en varios núcleos hipotalámicos incluyendo el núcleo ARC, el núcleo ventromedial hipotalámico (VMH), el DM, el AHA, el NPV y en el NSQ [43, 86, 87]. Asimismo, el GHSR1a se expresa en otras áreas del cerebro las que incluyen principalmente los tres componentes del complejo dorsal del vago (CDV): el área postrema (AP), el NTS y el núcleo

motor dorsal del vago (NMDV); como también en la sustancia nigra (SN), el núcleo DR, en el área ventral tegmental (VTA), y en el hipocampo [43, 86, 87]. En órganos periféricos se ha encontrado expresión del GHSR1a, en el estómago, intestino, páncreas, bazo, tiroides, gónadas, glándula adrenal, corazón; como también en varios tumores endocrinos y líneas celulares tumorales; aunque en niveles mucho más bajos comparados con los niveles del GHSR1a a nivel central [88, 89].

3.5 Funciones principales del sistema ghrelina/GHSR1a

La ghrelina está involucrada en múltiples funciones fisiológicas, las más importantes son sus acciones a nivel central, ya que como mencionamos anteriormente, el GHSR1a se expresa principalmente en la hipófisis y el cerebro. La ghrelina estimula la secreción de GH a nivel hipofisario, mientras que en el cerebro, principalmente, estimula el apetito y la ingesta de alimento; regula el sistema nervioso autónomo, gasto energético y el metabolismo de la glucosa [45, 48, 90]. Además, la ghrelina influye en el sueño, en la memoria y en el aprendizaje [64, 91]. A nivel periférico, la ghrelina estimula la motilidad y secreción gástrica, la secreción pancreática exocrina, induce hiperglucemia, disminuye la secreción de insulina y aumenta la resistencia a la misma, estimula la lipólisis [64, 92]. Asimismo, se han reportado acciones de ghrelina sobre el sistema cardiovascular, el sistema inmune y el hueso [64, 93].

Secreción de GH. La secreción de GH está regulada principalmente por la hormona liberadora de GH, la cual se produce en el núcleo ARC y por somatostatina que se produce en el NPV estimulando e inhibiendo, respectivamente, la secreción de GH por las células somatotropas de la hipófisis. Asimismo, la ghrelina se une al GHSR1a presente en las células somatotropas de la hipófisis y estimula la secreción de la GH, actuando sinérgicamente con la hormona liberadora de GH, indicando que actúan, al menos parcialmente, por mecanismos independientes. Sin embargo, la ghrelina necesita de la acción de la hormona liberadora de GH para ejercer su rol pleno sobre la secreción de GH. Probablemente la ghrelina active a las neuronas productoras de la hormona liberadora de GH en el hipotálamo [94]

Acciones orexigénicas. La ghrelina es la única hormona conocida a la fecha capaz de estimular la ingesta de alimento, ejerciendo acciones principalmente en el núcleo ARC [90, 95]. El núcleo ARC se encuentra ubicado en la base del hipotálamo a cada lado del tercer ventrículo, adyacente a la EM, el cual es un órgano circunventricular. Los órganos circunventriculares son estructuras especializadas que se encuentran en la línea media del cerebro a lo largo del tercer y cuarto ventrículo. A diferencia del resto de la vasculatura del cerebro, los vasos sanguíneos de los órganos circunventriculares poseen capilares fenestrados, que permiten que moléculas tales como proteínas y hormonas peptídicas accedan con mayor facilidad al cerebro. Por lo tanto, la ghrelina y demás hormonas periféricas pueden tener, a través de la EM, mayor accesibilidad al núcleo ARC [96]. El GHSR se expresan principalmente en las neuronas que co-producen NPY/AgPR/GABA del núcleo ARC. La activación directa de estas neuronas por la ghrelina lleva rápidamente a un aumento del apetito y de la ingesta de alimento [97, 98]. Por el contrario, las neuronas productoras de POMC del núcleo ARC no expresan el GHSR y se ha planteado que la ghrelina inhibe a estas neuronas aumentando la liberación local de GABA en las terminales de las neuronas NPY [60]. Por lo tanto, la inhibición de las neuronas POMC potenciaría el efecto orexigénico de la ghrelina. De esta manera, la acción de la ghrelina sobre en el núcleo ARC es fundamental en la regulación del balance energético [99]. Además, el núcleo ARC recibe y envía inervaciones desde y hacia diferentes núcleos cerebrales encargados, principalmente, de regular la homeostasis energética. En el hipotálamo, como mencionamos en la presente introducción, tanto las neuronas NPY/AgRP/GABA como las neuronas POMC del núcleo ARC inervan al NPV. Además, ambos grupos de neuronas también proyectan y reciben inervaciones desde el AHA, el VMH y el DM, los cuales integran y reciben señales relacionados principalmente con el control del apetito y la ingesta de alimento [17, 100, 101]. Por otro lado, el núcleo ARC inerva y recibe aferencias desde el troco cerebral, principalmente del NTS [100].

Como ya hemos mencionado, el GHSR se expresan profusamente en el CDV y se activa en respuesta a la ghrelina [43, 102, 103]. El AP del CDV, es otro órgano circunventricular que le permite al cerebro tener mayor comunicación con las señales periféricas. Además, el CDV recibe

información de aferencias viscerales, ya que se encuentra innervado principalmente por el nervio vago. Además se ha encontrado expresión del GHSR en neuronas aferentes del ganglio nodoso del vago, así la ghrelina puede transmitir señales desde el aparato digestivo al sistema nervioso central [104, 105]. De esta manera, se postula que la ghrelina también puede estimular el apetito a través de la activación del GHSR en aferencia vagales, que llegan al CDV, el cual se comunica con el hipotálamo para inducir la ingesta de alimento. Por lo tanto, el CDV al igual que el núcleo ARC, cumplen un rol fundamental en la coordinación y control de la ingesta de alimento inducida por la ghrelina [106].

Metabolismo de la glucosa. La ghrelina aumenta los niveles de glucosa plasmáticos, principalmente, por sus acciones a nivel central. La ghrelina modula la sensibilidad a la glucosa de las neuronas del cerebro que censan o responde a dicho metabolito [107]. Así, el GHSR se expresa en varios núcleos cerebrales que regulan el metabolismo de la glucosa, entre los que se encuentran, como mencionamos anteriormente, el núcleo ARC y el CDV. Asimismo, el aumento de la secreción de la GH y de la ingesta de alimento inducidos por la ghrelina, llevan a un incremento de los niveles de glucosa plasmática. Por otro lado, a nivel periférico, la ghrelina estimula e inhibe la liberación de glucagón e insulina, respectivamente, lo que tienden a aumentar los niveles de glucosa plasmáticos [85, 108].

4. Eje HHA y la ghrelina

La ghrelina estimula el eje HHA tanto en humanos como en roedores. Al poco tiempo del descubrimiento de dicha hormona, Takaya *et al.* evaluaron los efectos endocrinos de la administración intravenosa de ghrelina en hombres adultos [109]. Encontraron que la administración de ghrelina aumenta los niveles de la GH, como se esperaba, y también los niveles de ACTH y cortisol plasmáticos, en forma dependiente de la dosis de ghrelina administrada. Posteriormente, Arvat *et al.* reportaron que la administración periférica de ghrelina aumenta los niveles de ACTH y cortisol plasmáticos en mujeres, este aumento fue más alto que lo observado

con la administración de hexarelina, un agonista sintético de GHSR [110]. Asimismo, Arvat *et al.* reportaron que el aumento en los niveles de la ACTH inducido por la ghrelina era similar al observado luego de la administración del CRF [110]. Por otro lado, la administración central de ghrelina en roedores, estimula la hipertrofia y proliferación de células corticotropas, que lleva a un aumento en la secreción de ACTH y de corticosterona [111-113]. A pesar de convincentes evidencias que muestran un rol estimulador de la ghrelina sobre el eje HHA, el mecanismo por el cual esto ocurre permanece en estudio. Se ha mostrado que la ghrelina estimula la secreción del CRF en explantes hipotalámicos [113, 114], como así también que aumenta los niveles del ARNm de CRF en neuronas hipotalámicas [115]. Por el contrario, no se han encontrado efectos directos de la ghrelina o agonistas de GHSR sobre la secreción hipofisaria de ACTH [116, 117], lo cual coincide con el hecho que GHSR se exprese principalmente en las células somatotropas [118]. Asimismo, no se ha reportado un rol directo de la ghrelina en la esteroidogénesis adrenal [117, 119], aunque sí expresión del GHSR en dicha glándula [89, 119]. Por lo tanto, los antecedentes apoyan la idea de que la ghrelina probablemente actúa como una señal de estrés a nivel central, activando a las neuronas CRF.

La relevancia fisiológica de la activación de las neuronas CRF y del eje HHA inducida por la ghrelina sería en situaciones de balance energético negativo. Como mencionamos anteriormente, en situaciones de balance energético negativo, como el ayuno y la restricción calórica, la secreción de ghrelina aumenta, lo que lleva a una estimulación de la secreción de GH, un aumento de la ingesta de alimento y un aumento de los niveles de glucosa plasmáticas. De esta manera, las principales acciones de la ghrelina tienen como principal fin mantener la glucemia y preservar la energía. Asimismo, los glucocorticoides ejercen acciones metabólicas que llevan a un aumento de los niveles de glucosa plasmáticos. Por lo tanto la activación del eje HHA es un mecanismo potencial por el cual la ghrelina regula algunas de sus funciones fisiológicas. En particular, los efectos de la ghrelina sobre el metabolismo de la glucosa estarían mediados, en parte, por los glucocorticoides.

El circuito y los mecanismos neuronales que median el efecto estimulador de ghrelina sobre las neuronas CRF aun no están esclarecidos. **Una posibilidad es que la ghrelina active a las neuronas CRF directamente (Figura 4. I).** El NPV expresa niveles elevados del ARNm de GHSR [43, 86], aunque se desconoce si las neuronas CRF expresan este receptor y si pueden responder directamente a la ghrelina. Otra posibilidad es que las neuronas CRF se activen en respuesta a la ghrelina indirectamente, a través de otros núcleos neuronales que median efectos de la hormona. Como mencionamos en la sección 3 de esta introducción, el núcleo ARC es uno de los principales núcleos que median las acciones orexigénicas de la ghrelina. **Por lo tanto el núcleo ARC es un potencial candidato a mediar la activación de las neuronas CRF inducida por la ghrelina.** El GHSR se expresa profusamente en las neuronas productoras de NPY/AgRP/GABA del ARC y en sus terminales y la ghrelina activa directamente dichas neuronas [60, 97, 98]. **El NPY podría mediar la activación de neuronas CRF inducida por ghrelina (Figura 4. II y III).** Como describimos anteriormente, las neuronas NPY inervan a las neuronas CRF del NPV. Además, las neuronas CRF expresan receptores para NPY y son directamente activadas por NPY. Por otro lado, el NPY inhibe las neuronas inhibitorias GABAérgicas del NPV, por cuanto el NPY podría también activar indirectamente las neuronas CRF vía este mecanismo [60]. **Otra posibilidad es que la ghrelina active a las neuronas CRF a través de la inhibición del tono GABAérgico que modula a las neuronas CRF (Figura 4. IV).** Como describimos en la sección 2 de la presente introducción, el tono GABAérgico es uno de los principales reguladores de las neuronas CRF. Esta posibilidad es apoyada por evidencias que la ghrelina disminuye el tamaño de las corrientes postsinápticas inhibitorias mediadas por GABA (IPSC) en neuronas del NPV [60].

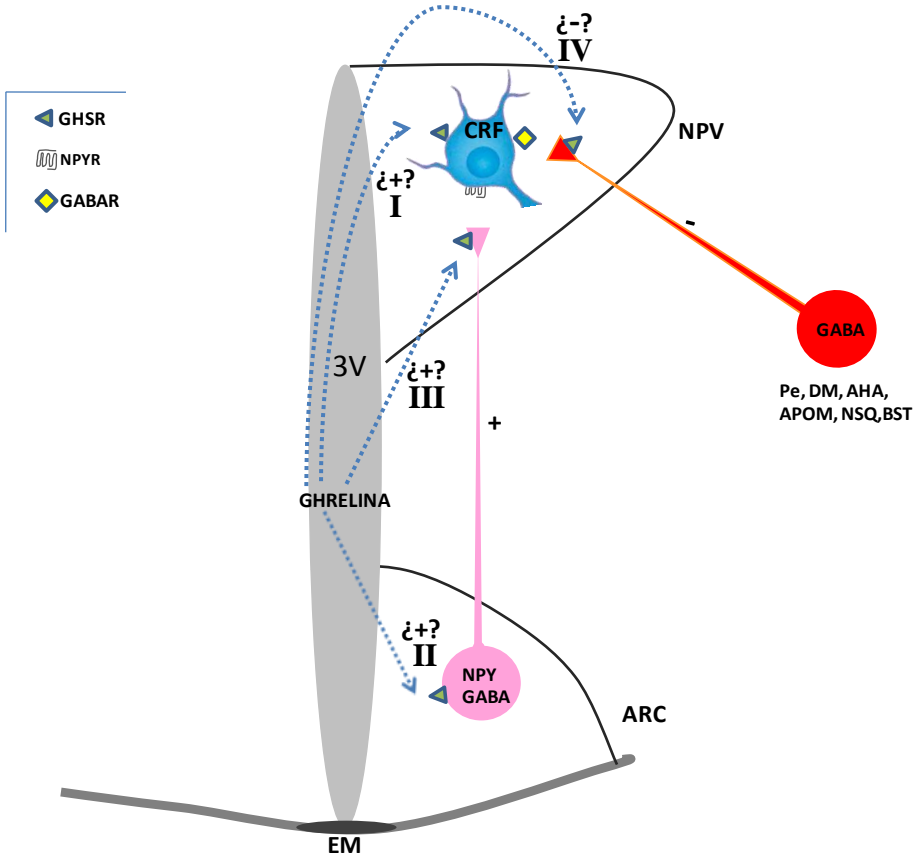


Figura 3. Mecanismos potenciales por el cual la ghrelina podría activar a las neuronas CRF hipofisotrópicas. Las abreviaturas indican: ARC: núcleo arcuato, AHA: área hipotalámica anterior, APOM: área preóptica medial, BST: núcleos del lecho de la estría terminali, DM: núcleo dorsomedial, EM: eminencia media, NPV: núcleo paraventricular, NSQ: núcleo supraquiasmático Pe: zona periventricular, CRF: factor liberador de corticotrofina, GABA: ácido γ -aminobutírico, GABAR: receptor de GABA, GHSR: receptor de ghrelina, NPY: neuropéptido Y, NPYR: receptor de NPY,,3V: tercer ventrículo.

Por lo tanto, en esta Tesis Doctoral utilizamos una combinación de experimentos *in vivo* y *ex vivo* con distintos modelos de ratones manipulados farmacológicamente para determinar cómo la ghrelina activa las neuronas CRF del NPV y el eje HHA. Dilucidar cómo dicha hormona modula la actividad de las neuronas CRF puede ser importante para intentar manipular las acciones de la ghrelina en situaciones donde se encuentra muy elevada, como se observa en la anorexia nerviosa. La anorexia nerviosa es un desorden psiquiátrico de etiología desconocida que se caracteriza por el rechazo a mantener un peso mínimo saludable, miedo intenso a ganar peso y una percepción distorsionada de la figura corporal. La inanición y el estado de estrés permanente que presentan estos pacientes producen disfunciones neuroendocrinas severas que contribuyen al mantenimiento de dicho desorden [120]. La anorexia nerviosa es una patología de alta incidencia mundial que afecta principalmente a los adolescentes; es la tercera enfermedad crónica más

común en la adolescencia [121]. En Argentina los índices de anorexia nerviosa están entre los más altos a nivel mundial ya que 1 de cada 10 adolescentes sufren de anorexia en algún grado [122] y posee una alta tasa de mortalidad que oscila entre el 5 y el 18 % por década. Asimismo, ha demostrado que los pacientes con anorexia nerviosa poseen niveles elevados del CRF [123, 124]. Así, tanto la ghrelina como el CRF se encuentran muy elevadas debido al marcado desbalance energético. Si bien las causas y consecuencias de la hiperghrelinemia observada en estos pacientes son pocas claras, el aumento del CRF puede ser, en parte, una consecuencia de los niveles elevados de la ghrelina. Las características clínicas de la anorexia nerviosa que se le atribuyen al aumento de CRF y de la actividad del eje HHA son ansiedad, interacción social restringida, actividad física excesiva y la supresión de las hormonas reproductivas que resulta en amenorrea y reducción del deseo sexual. Así, conocer cómo la ghrelina activa a las neuronas CRF puede ser muy importante para intentar modular las acciones de la ghrelina sobre las neuronas CRF. Existen amplios programas de tratamiento para la anorexia nerviosa, entre los que se incluyen tratamiento dietético, tratamiento psicológico y tratamiento farmacológico. Se ha mostrado que la administración de ghrelina en dichos pacientes aumenta el apetito y la ingesta de alimento [125, 126]. Así, el tratamiento con ghrelina es considerado una potencial opción terapéutica para dicho desorden. Por lo tanto, esperamos que el desarrollo de esta Tesis Doctoral pueda contribuir al uso confiable de futuras terapias para tratar las anorexia nerviosa basadas en el sistema de la ghrelina.

Asimismo, creemos que el esclarecimiento de cómo ghrelina modula la actividad de las neuronas CRF hipofisiotrópicas nos permitirá entender cómo el eje HHA media las acciones de la ghrelina. De esta manera, creemos que el entendimiento de estos circuitos puede ser relevante para entender cómo se interrelacionan el eje HHA y la ghrelina, ambos fisiológicamente muy importantes para el mantenimiento de la homeostasis corporal.

Objetivo General

En la presente Tesis Doctoral estudiamos los circuitos neuronales que median los efectos de la ghrelina sobre las neuronas CRF hipofisiotrópicas del NPV y el eje HHA. Esperamos que el esclarecimiento de estos circuitos pueda ayudar a entender cómo funcionan y cómo se integran la homeostasis energética y el estrés. Así como también, contribuir al desarrollo de futuras terapias que intenten manipular las acciones de la ghrelina.

A continuación, indicamos en forma independiente, los objetivos específicos que abordamos.

Objetivos específicos

- 1- Determinar los núcleos cerebrales que responden a la ghrelina periférica o central.**
 - a- Determinar qué núcleos cerebrales se activan en respuesta a ghrelina periférica o central.
 - b- Determinar qué núcleos cerebrales son accesibles a ghrelina periférica y central.

- 2- Estudiar los efectos de ghrelina sobre las neuronas CRF del NPV y el eje HHA.**
 - a- Determinar si la ghrelina periférica activa las neuronas CRF del NPV y el eje HHA.
 - b- Determinar si la ghrelina central activa las neuronas CRF del NPV y el eje HHA.
 - c- Determinar si la ghrelina administrada en el NPV activa las neuronas CRF del NPV y el eje HHA.
 - d- Determinar si la ghrelina puede regular directamente las neuronas CRF del NPV.

- 3- Estudiar los circuitos neuronales por los cuales ghrelina activa las neuronas CRF del NPV.**
 - a- Determinar si la ghrelina requiere la acción del NPY para activar las neuronas CRF.
 - b- Determinar si la ghrelina requiere la presencia del núcleo ARC para activar las neuronas CRF.
 - c- Determinar si la ghrelina requiere la inhibición del tono GABAérgico local del NPV para activar las neuronas CRF.

1. Animales Experimentales

Para realizar la presente Tesis Doctoral utilizamos ratones machos adultos (2-3 meses de edad) de la cepa C57BL6/J generados en el bioterio del IMBICE. Mantuvimos a los ratones en cuartos con ciclos de luz-oscuridad de 12 y 12 hs (de 7:00 hs a 19:00 hs), a temperatura constante (22 ± 1 °C) con libre acceso a agua y alimento, excepto cuando se indique lo contrario. Los alimentamos con dieta balanceada comercial para ratón. En este estudio, también utilizamos ratones adultos de la misma cepa pero deficientes de GHSR, estos fueron obtenidos del cruzamiento entre animales heterocigotas con una base genética C57BL6/J [127]. Para generar animales con el núcleo ARC lesionado inyectamos crías macho de cuatro días de vida por vía subcutánea con glutamato monosódico a una dosis de 2,5 mg/g de peso corporal (Animales experimentales con el ARC-lesionado) o con solución 10% de NaCl estéril (Animales control). Los diferentes grupos experimentales los alojamos en jaulas colectivas, no más de 5 animales por jaula, hasta dos días antes del experimento correspondiente cuando transferimos los animales a jaulas individuales.

2. Reactivos

- Acido p-hidroximercuribenzoico, inhibidor de proteasa (Sigma-Aldrich, cat. 12425).
- Anticuerpo anti-c-fos generado en conejo (Calbiochem/Oncogene, cat. PC38).
- Anticuerpo anti-CRF generado en conejo provisto por la Profesora Dra. María Castro de la Universidad de Michigan.
- Anticuerpo anti-fluoresceína conjugado a Alexa Fluor 488 generado en cabra (Molecular Probes, cat. A-11096).
- Anticuerpo anti-fluoresceína generado en cabra (Molecular Probes, cat. A-11095).
- Anticuerpo anti-GAD67 generado en ratón (Millipore, mab 5406, cat. 92590).
- Anticuerpo anti-ghrelina generado en cabra (Santa Cruz, cat. sc-10368).
- Anticuerpo anti-NPY generado en conejo (Abcam, cat. ab30914).
- Anticuerpo anti-cabra biotinilado (Vector Laboratories, cat. BA-1000).

- Anticuerpo anti-conejo biotinilado (Jackson Immuno Research Laboratories, cat. 711-065-152).

- Anticuerpo anti-ratón conjugado a Alexa 594 (Molecular Probes, cat. A-11096).

- *Bufferes* y medios, todos los reactivos los obtuvimos de Biopack excepto cuando especificamos:

Buffer fosfato salino (PBS, de sus siglas en inglés, para *phosphate buffered saline*) 0,01 M pH 7,4: Na₂HPO₄ 1,9 g, NaH₂PO₄ 0,32 g y NaCl 8,16 g/l.

Buffer prok: 40 ml de agua Millipore tratada con dietil pirocarbonato, 5 ml de EDTA 0,5 M pH: 8, 5 ml de tris-HCl pH: 8 y 0,3 µg/ml de proteinasa K (Sigma, 6556).

Buffer de hibridización: 1 g de sulfato de tetraxano (Sigma, D8906-50G), 1 ml de PBS 1M, 1,5 ml de buffer citrato de sodio 20X, 1 ml agua Millipore tratada con dietil pirocarbonato, 5 ml de formamida, 200 µl de solución *Denhardt's* (50X, Sigma, D2532-5 ml), 100 µl de ARNt de levadura (12,5 mg/ml, Invitrogen, P/N54016) y 100 µl de ADN de esperma de salmón.

Buffer citrato de sodio 20X pH 7: 17, 53 g de NaCl, 8,82 g de citrato de sodio, 100 ml de agua Millipore tratada con dietil pirocarbonato.

Buffer TNE: 5 ml de tris-HCl 1M PH 7,6; 14,6 g de NaCl, 1ml de EDTA 0,5 M pH 8 y agua Millipore tratada con dietil pirocarbonato.

Anhídrido acético 0,25 % en 0,1 M de TEA: 5 ml de trietanolamine 1 M pH: 8, 45 ml de agua Millipore tratada con dietil pirocarbonato y 125 µl de anhídrido acético.

Medio Krebs-Ringer Bicarbonato, medio base: NaH₂PO₄ 180; Na₂HPO₄ 100; MgCl₂ 46,8; KCl 340; NaCl 7000; glucosa 1800; CaCl₂ 280; Ascórbico 10; NaHCO₃ 100, mgr/l.

Medio base con 56 mM de KCl: NaH₂PO₄ 180; Na₂HPO₄ 100; MgCl₂ 46,8; KCl 4170; NaCl 4000; glucosa 1800; CaCl₂ 280; Ascórbico 10; NaHCO₃ 100, mgr/l.

- BIBO3304 y CGP71683 (Tocris productos # 2412 y 2199).

- Formaldehido (Biopack).

- Ghrelina esterificada con ácido n-octanoico (Global Peptide, cat. PI-G-03).

- Ghrelina marcada con fluoresceína (F-ghrelina) fue sintetizada por el laboratorio del Dr. L.

Luyt del Departamento de Química de la Universidad de Western Ontario, Canadá [128].

- Glutamato monosódico (Sigma-Chemical, cat. G1626).
- [3H]GABA (Perkin Elmer, producto NET191X250UC).
- Heparina (Calciparine. Sanofi Aventis).
- *kit* comercial de complejo avidina-peroxidasa “VectaStain Elite ABC” (Vector Laboratories, PK-6200).
- *Kit* comercial de EIA para la determinación de ghrelina (Cayman Chemical Company cat. 10006307).
- *Kit* comercial de ELISA para la determinación de corticosterona (Assay Designs cat. ADI-900-097).
- Líquido de centelleo (Ecolite cat. 882475).
- Primers random y reactivos de SuperCript II (Invitrogen cat. 48190011 y 18064022).
- Reactivos SYBR-green (Applied-Biosystems cat. 4309155).
- RNA STAT-60 para aislamiento de ARN total (Tel-Test Inc. cat. Cs-110).
- Sacarosa (Biopack).
- Solución de RNasa (Roche Molecular Biochemical producto 11667165001s).
- Suero Normal de Burro (Equitech-Bio.INC lote SD 30-2090).
- Tionina (Sigma, cat. T7029).
- TritonX (Biopack).
- Trizol (Invitrogen cat. 15596018).

3. Cirugías Estereotáxicas

Todas las cirugías las realizamos en el cuarto de cirugías del bioterio del IMBICE, con material de cirugía adecuado y en las condiciones de asepsia normalmente requeridas. En todos los casos utilizamos animales anestesiados con una mezcla de Ketamina (150 mg/Kg de peso i.p) y Xilacina (15 mg/Kg de peso i.p).

Implantación de cánula intra-cerebro-ventricular (ICV). Para esta cirugía colocamos a los ratones en el estereotáxico para poder colocar una cánula guía permanente (4 mm de largo, calibre 22 G, Plastics One) dentro del ventrículo lateral cerebral. Primero realizamos un corte en la piel de la

calota y liberamos las membranas que recubren el hueso para poder visualizar el punto de bregma y establecer las coordenadas estereotáxicas de éste. A partir de éstas, establecimos las coordenadas: -0,34 mm antero-posterior; +1 mm lateral; -2,3 mm ventral que se corresponden al ventrículo lateral según el Atlas de Paxino y Franklin [129]. En este lugar perforamos el cráneo, implantamos la cánula, y la fijamos al hueso con segmentante dental. Finalmente saturamos la piel y tapamos el extremo libre de la cánula con un obturador adecuado. Después de la cirugía, alojamos los animales en cajas individuales y los dejamos recuperar durante al menos 5 días. Para minimizar el estrés del día experimental manipulamos los ratones diariamente.

Implantación de cánulas bilaterales en el NPV hipotalámico. Colocamos a los ratones en el estereotáxico para poder colocar una cánula guía doble permanente (10 mm de largo, calibre 26, Plastics One) sobre el NPV. Este caso proseguimos de igual forma que para las cirugías ICV pero utilizamos las coordenadas: -0,82 mm antero-posterior; $\pm 0,5$ mm lateral y -2,0 mm ventral para el NPV según el Atlas de Paxino y Franklin [129]. Después de la cirugía, manipulamos los ratones como describimos anteriormente.

Implantación de una cánula ICV y cánulas bilaterales en el NPV hipotalámico. Finalmente, en otro grupo de ratones implantamos estereotáxicamente dos cánulas guías una en el NPV y otra ICV. Para colocar ambas cánulas utilizamos los mismos protocolos descritos anteriormente para cada cánula individual. Con el fin de evitar que ambas cánulas se solaparan, en este caso colocamos las cánulas ICV con un ángulo de 50 ° con las siguientes coordenadas: -0,34 mm antero-posterior; +1 mm lateral; -3,8 mm ventral. Para la cánula en el NPV utilizamos las mismas coordenadas que describimos anteriormente.

En todos los casos determinamos la posición final de la cánula por observación histológica al final del experimento.

4. Procedimientos Experimentales

Todos los experimentos los realizamos entre las 8:00 y 10:00 am, cuando los niveles de corticosterona plasmática son bajos en roedores y el eje HHA muestra mayor reactividad a estresores [130, 131].

Administración periférica de ghrelina. Administramos subcutáneamente vehículo (solución salina) conteniendo o no ghrelina en una dosis baja (0,06 nmol/g de peso corporal), o en una dosis alta (0,6 nmol/g de peso corporal). Después del tratamiento, expusimos a los ratones a dieta balanceada comercial. Cuantificamos la ingesta de alimento durante 120 minutos después del tratamiento (a los 30, 60 y 120 minutos). Luego de los 120 minutos, anestesiamos a los ratones, los perfundimos, extrajimos los cerebros y los procesamos como describimos posteriormente.

Administración ICV de ghrelina. Inyectamos en el ventrículo lateral 3 μ l de vehículo (solución salina) conteniendo o no ghrelina; 0,6 nmol/ratón. Estos estudios los realizamos en animales control y en animales con el núcleo ARC lesionado. Realizamos todas las inyecciones durante 2 minutos con un inyector, el cual se extendía 0,5 mm por debajo de la cánula guía y estaba conectado a una jeringa Hamilton de 5 μ l. Luego de la inyección, dejamos el inyector durante 2 minutos dentro de la cánula para evitar el reflujo de la solución inyectada. Finalmente después del tratamiento, expusimos a los ratones a dieta balanceada comercial y proseguimos de igual forma que para la administración periférica de ghrelina

Administración sobre el NPV de ghrelina. En la mañana del día experimental, inyectamos los animales con un inyector que se extendía de 2,8 mm por debajo de la cánula guía puesta sobre el NPV, que nos permitió hacer las inyecciones a 500 μ m dorsal al NPV. En este caso utilizamos una jeringa Hamilton de 2 μ l conectada al inyector para administrar a través de la cánula puesta sobre el NPV 0,5 μ l de vehículo (solución salina estéril) conteniendo o no ghrelina; 0,03 nmol/cada NPV. Luego de la inyección dejamos el inyector 2 minutos dentro de la cánula y proseguimos de igual forma que como describimos anteriormente.

Administración periférica de F-ghrelina. Para determinar los sitios accesibles a la ghrelina plasmática administramos subcutáneamente F-ghrelina. La F-ghrelina (2741 Da) es un análogo de 18-aminoácidos de la ghrelina conjugada con isotiocianato de fluoresceína a través de la adición de una lisina en su extremo C-terminal ([Dproctanoil] 3, Lys (fluoresceína) 19]-ghrelina [128]. Administramos subcutáneamente vehículo (solución salina) conteniendo o no F-ghrelina en una dosis baja; 0,06 nmol/g de peso corporal; o en una dosis alta 0,6 nmol/g de peso corporal. Luego de 15 minutos, anestesiamos a los ratones, los perfundimos y extrajimos sus cerebros y los procesamos como describimos posteriormente.

Administración ICV de F-ghrelina. Inyectamos en el ventrículo lateral 3 µl de vehículo (solución salina) conteniendo o no ghrelina o F-ghrelina; 0,6 nmol/ratón. Luego de la inyección, dejamos el inyector durante 2 minutos dentro de la cánula para evitar el reflujo de la solución inyectada. Expusimos a los ratones a dieta balanceada comercial y cuantificamos la ingesta de alimento durante 120 minutos. Dado que la señal de fluoresceína 120 minutos post-tratamiento desaparece por completo, para poder determinar los sitios accesibles a F-ghrelina central anestesiamos un grupo de ratones a los 15 minutos post-tratamiento, extrajimos los cerebros y los procesamos como describimos posteriormente. Para determinar la especificidad de unión de la F-ghrelina, en otro grupo de ratones inyectamos en el ventrículo lateral F-ghrelina 0,6 nmol/ratón más 6 nmol/ratón de ghrelina; 15 minutos después del tratamiento anestesiamos y proseguimos como describimos anteriormente.

Administración ICV de antagonistas del receptor de NPY y de ghrelina. Inyectamos en el ventrículo lateral 3 µl de vehículo 1 (DMSO al 4% en solución salina) conteniendo o no una combinación de antagonistas específicos contra los receptores Y1 e Y5 de NPY (BIBO3304 y CGP71683 1 µg de cada uno/ratón) y 30 minutos más tarde, inyectamos en el ventrículo lateral 3 µl de vehículo 2 (solución salina) conteniendo o no ghrelina (0,6 nmol/ratón). Después del tratamiento cuantificamos la ingesta de alimento durante 120 minutos y finalmente obtuvimos los cerebros.

Administración en el NPV de muscimol y administración ICV de ghrelina. Inyectamos sobre el NPV solución salina conteniendo o no muscimol (500 ng/ratón) y 2 minutos después inyectamos en el ventrículo lateral solución salina conteniendo o no ghrelina (0,6 nmol/ratón). Después del tratamiento, cuantificamos la ingesta de alimento durante 120 minutos y finalmente obtuvimos los cerebros como describimos posteriormente.

En cada experimento, cuantificamos la ingesta de alimento a los 30, 60 y 120 minutos después de cada tratamiento. Para esto restamos el peso del alimento al finalizar el experimento al peso del alimento que colocamos a cada animal al comienzo del experimento. Expresamos los resultados como mg consumidos por g de peso corporal de cada ratón (mg/g peso corporal) o en mg consumidos, ya que no encontramos diferencias significativas en los pesos corporales de los ratones de cada grupo experimental.

5. Perfusión y preparación de muestras de cerebro

Para realizar la fijación de las muestras de cerebro, perfundimos los animales con formaldehído al 4% como fijador. Para ello, sujetamos a los animales anestesiados a una mesa de cirugía por las extremidades con el abdomen hacia arriba. Luego, abrimos la cavidad torácica con el objetivo de acceder al corazón. Conectamos el sistema de perfusión directamente al ventrículo izquierdo del corazón con una aguja. Luego, realizamos una incisión en la aurícula derecha para permitir el escape de la circulación de retorno de los líquidos de lavado. Inicialmente, perfundimos a los animales con una solución de lavado (PBS 0,01 M pH 7,4 conteniendo 10 UI/ml de heparina) a un flujo de 5 ml/minuto durante 2 minutos. Luego, los perfundimos con el fijador, formaldehído al 4%, durante 10 minutos a un flujo de 5 ml/minuto. Al finalizar la perfusión, aislamos los cerebros y los post-fijamos en solución de formaldehído al 4% durante 2 horas y finalmente los crio-preservamos mediante la incubación en una solución de sacarosa al 20% durante toda la noche. Al día siguiente, congelamos los cerebros y los cortamos en secciones coronales de 25 μ m de espesor utilizando un crióstato. En los cerebros provenientes de ratones inyectados con F-ghrelina

realizamos la crio-preservación con solución de sacarosa al 20% más formaldehído al 1%, posteriormente proseguimos de igual forma que lo que describimos anteriormente.

6. Inmunohistoquímicas (IHQs) y tinciones

Todas las IHQs las realizamos sobre secciones coronales de cerebro en flotación.

6.1 IHQs cromogénicas simples

Protocolo general para todas las IHQs cromogénicas simples: Primero lavamos las secciones 3 veces durante 10 minutos cada una con PBS, luego incubamos con 0,5% de H₂O₂ en PBS durante 30 minutos. Luego de otros tres lavados, incubamos las secciones coronales de cerebro con solución bloqueante (3% suero normal de burro y 0,25% TritonX en PBS) durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, las incubamos con el anticuerpo primario específico para cada IHQ en las condiciones experimentales que especificamos en la Tabla 1. Realizamos otros tres lavados y las incubamos durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario (Tabla1), lavamos e incubamos durante 1 hora con el complejo avidina-peroxidasa biotinilada. Finalmente revelamos con el sustrato 3,3'-diaminobencidina comercial en presencia de Níquel, lo cual produjo un precipitado negro-violeta. El tiempo de revelado para cada IHQ cromogénica simple lo especificamos en la Tabla 1.

IHQ contra sitios de unión a ghrelina exógena: Incubamos las secciones secuencialmente con H₂O₂ y solución bloqueante como describimos anteriormente y luego con ghrelina (1µg/ml) en PBS a 37°C. A continuación, las incubamos con 0,5% de formaldehído durante 30 minutos a temperatura ambiente y luego realizamos 6 lavados de 10 minutos cada uno con PBS. Posteriormente, incubamos las secciones con anticuerpo anti-ghrelina generado en cabra (Tabla 1). Al día siguiente, lavamos 3 veces durante 10 minutos cada una en PBS e incubamos con anticuerpo anti-cabra biotinilado 1 hs a temperatura ambiente (Tabla 1). Finalmente, incubamos con el complejo peroxidasa biotinilada-avidina como detallamos anteriormente y por último con el sustrato 3,3'-diaminobencidina en presencia de Níquel, obteniendo un precipitado negro/violeta

(Tabla1). Para determinar la especificidad de la reacción, incubamos las secciones coronales con concentraciones decrecientes de ghrelina (0-1 µg/ml) y posteriormente medimos la intensidad de la señal.

Tabla 1. Condiciones experimentales para cada IHQ cromogénica.

Anticuerpo primario	Anti-c-fos, generado en conejo	Anti-fluoresceína, generado en cabra	Anti-NPY, generado en conejo	Anti-ghrelina, generado en cabra	Anti-CRF, generado en conejo
Concentración	1:15000	1:1500	1:10000	20 µg/ml	1:2000
Temperatura de incubación	4°C.	4°C	Temperatura ambiente	Temperatura ambiente	4°C
Tiempo de incubación	48 horas	48 horas	Toda la noche	Toda la noche	Toda la noche
Anticuerpo secundario	Anti-conejo biotinilado, 1:1000	Anti-cabra biotinilado, 1:1000	Anti conejo biotinilado, 1:1000	Anti-cabra biotinilado, 1:1000	Anti-conejo biotinilado 1:1000
Tiempo de revelado	10 minutos	7 minutos	5 minutos	5 minutos	7 minutos

Es importante destacar que la señal fluorescente de la fluoresceína decae rápidamente, por esto con el objetivo de prolongar dicha señal realizamos las IHQs contra fluoresceína. Realizamos dos tipos de IHQ contra fluoresceína, una IHQ cromogénica como detallamos anteriormente y una IHQ fluorescente que detallaremos posteriormente.

6.2 IHQ cromogénica doble

IHQ doble contra c-fos y CRF: La IHQ contra c-fos y CRF la realizamos durante tres días. Los dos primeros días realizamos sobre las secciones de cerebro la IHQ contra c-fos como describimos anteriormente, luego realizamos tres lavados durante 10 minutos cada uno con PBS y las

tratamos durante toda la noche con anticuerpo anti-CRF (Tabla 1). Este anticuerpo reconoce CRF maduro como así también la prohormona, pre-proCRF. Al día siguiente, lavamos e incubamos las secciones con anticuerpo anti-conejo biotinilado hecho en burro (Tabla 1) y con el complejo peroxidasa biotinilada-avidina como detallamos anteriormente. Por último, incubamos con solución de 3,3'-diaminobencidina, obteniendo un precipitado marrón (Tabla 1). La inmunotinción marrón para CRF fue confinada al citoplasma y dendritas, lo que permitió la visualización del núcleo, con o sin señal negro/violeta para c-fos.

6.3 IHQs fluorescentes simples

IHQ para fluoresceína: Lavamos las secciones de cerebro 3 veces durante 10 minutos cada una con PBS. Luego las tratamos con la misma solución bloqueante descrita previamente durante 1 hs a temperatura ambiente e incubamos con anticuerpo anti-fluoresceína conjugado a Alexa Fluor 488 (1:100) durante dos días a 4°C.

IHQ para Glutamato descarboxilasa 67 (GAD67): Lavamos las secciones de cerebro 3 veces durante 10 minutos cada una con PBS y luego las tratamos con solución bloqueante como describimos anteriormente, e incubamos con anticuerpo anti-GAD67 (1:1500) dos días a 4 °C. Finalmente incubamos con anticuerpo anti-ratón conjugado a Alexa 594 (1:1000) por 2 hs a temperatura ambiente.

6.4. IHQs fluorescente doble

IHQ para fluoresceína y para GAD67: Tratamos las secciones de igual forma que describimos para cada IHQ fluorescente simple pero en este caso incubamos los dos anticuerpos, el anti-fluoresceína y el anti-GAD67 juntos. Finalmente incubamos con el anticuerpo anti-ratón conjugado a Alexa 594 (1:1000) por 2 hs a temperatura ambiente.

Para todas las IHQ realizamos controles, en los cuales procesamos las secciones de cerebro con los mismos protocolos que describimos para cada caso en particular, pero sin el agregado de anticuerpo primario o secundario.

Luego de cada IHQ montamos las secciones secuencialmente en portaobjetos de vidrio y colocamos el cubreobjetos con medio de montaje para finalmente observarlas al microscopio.

6.5. Coloración de Nissl: En primera instancia montamos las secciones secuencialmente en portaobjetos de vidrio, luego las lavamos durante 1 minuto en H₂O destilada e incubamos con solución de Tionina al 0,1% durante 20 min. Finalmente deshidratamos las secciones pasándolas 1 vez durante 1 minuto por H₂O destilada, luego 2 veces de 1 minuto por alcohol 96°, 2 veces de 1 minuto por alcohol 100° y por último 5 minutos por xilol. Finalmente colocamos los cubreobjetos con medio de montaje. Esta coloración sirve para teñir los cuerpos de Nissl que son acumulaciones basófilas y se encuentran en el citoplasma de las células nerviosas.

7. Histoquímica de Hibridación *in situ* para el ARNm de GHSR e IHQ para CRF

Para llevar a cabo esta técnica primero montamos las secciones secuencialmente en portaobjetos de vidrio y lavamos con PBS 3 veces durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego las tratamos con *buffer prok* durante 15 minutos a 37°C para descongelarlas y lavamos. A continuación, las tratamos con anhídrido acético 0,25% en TEA 0,1 M durante 10 minutos a temperatura ambiente y lavamos. Posteriormente las incubamos con una ribosonda marcada con ³⁵S que se une al ARNc de GHSR de ratón (10⁶ cpm/ml en buffer de hibridación), generada por el Dr. Perelló, toda la noche a 57 °C. Al segundo día, lavamos las secciones con buffer citrato de sodio en formamida al 50% 3 veces durante 15 minutos a 57 °C, luego lavamos con buffer TNE durante 10 minutos. Posteriormente las tratamos con solución de RNasa 20 µg/ml en buffer TNE durante 30 minutos a 37 °C, e hicimos sucesivos lavados con solución de buffer TNE. Por último, utilizamos éstas secciones para realizar la IHQ contra CRF como describimos anteriormente. Sobre algunas de las secciones de cerebro en las que realizamos la histoquímica de hibridación *in situ* contra el ARNm de GHSR realizamos una

coloración de Nissl. La señal de la histoquímica de hibridación *in situ* la visualizamos en placas radiográficas.

8. Análisis Neuroanatómico Cuantitativo

Utilizamos el atlas del cerebro de ratón de Paxinos y Franklin (2001) para identificar las secciones coronales del cerebro e identificar y denominar a los núcleos del cerebro de ratón [129]. El NPV lo estudiamos entre los bregmas -0,70 mm y -0,94 mm, sitio en el que el NPV se encuentra enriquecido en las neuronas CRF hipofisiotrópicas. El núcleo ARC y la EM lo estudiamos entre los bregmas -1.58 and -1.94 mm y el NTS y el AP entre los bregmas -7.32 and -7.56 mm.

Determinamos el número total de células inmuno-reativas para c-fos en cada región del cerebro. Cuantificando las células que contenían el núcleo celular de color negro/violeta, producto de la reacción cromogénica utilizada para revelar la presencia de c-fos, en 1 de 3 series completas de secciones coronales de 25 μ m de cada núcleo cerebral. Para cada uno, expresamos el resultado como el número de células inmuno-reativas para c-fos por sección (células/sección).

La inmuno-reatividad para fluoresceína en las IHQs cromogénicas la determinamos en 1 de 3 series completas de secciones coronales de 25 μ m desde el nivel de los bulbos olfatorios hasta la médula espinal cervical. El análisis cualitativo de la inmuno-reatividad para fluoresceína en los diferentes sitios del cerebro las realizamos teniendo en cuenta tanto la intensidad de señal como el número de células marcadas, en comparación con la señal observada en las muestras de los controles negativos. En este caso, además de los controles sin el agregado de anticuerpo primario o secundario, también utilizamos como control negativo la IHQ que realizamos contra fluoresceína en secciones de cerebro de ratones inyectamos centralmente con vehículo. Utilizamos las secciones coronales para hacer los dibujos sobre el que ilustramos las células inmuno-reativas para fluoresceína. Para el análisis cuantitativo de la intensidad de la señal inmuno-reativa para fluoresceína utilizamos las imágenes de áreas cerebrales comparable, en las mismas condiciones

ópticas de luz. Transformamos las imágenes a escala de grises de 8 bit, las invertimos y cuantificamos la densidad óptica (DO) de cada región utilizando el software Image J. la señal inmuno-reactiva para fluoresceína como la DO, la cual es la media de los pixeles grises, en una escala de grises de 256 como referencia.

La cantidad de neuronas inmuno-reactivas para CRF y positivas para c-fos en cada situación experimental la expresamos como porcentaje y representa las neuronas inmuno-reactivas para CRF positivas para c-fos en comparación con el número total de neuronas inmuno-reactivas para CRF que observamos. Con el fin de obtener el número real de neuronas activadas en cada grupo, corregimos la doble contabilización de acuerdo con el método de Abercrombie, en el cual el número de neuronas contabilizado se multiplica por un factor que se calcula con la formula: $T/(T+h)$, donde T= espesor del corte, y h= el diámetro medio de la neurona a lo largo del eje perpendicular al plano de la sección [132]. El diámetro medio de las neuronas lo determinamos con el programa Image J. Para el análisis, subdividimos el NPV del ratón en cinco partes, que nombramos: compacta, periventricular, anterior, medio y posterior. Determinamos el porcentaje de las neuronas inmuno-reactivas para CRF conteniendo núcleos teñidos en la parte compacta del NPV.

Utilizamos la coloración de Nissl para cuantificar el número de núcleos celulares marcados con tiónina en el ARC y el NPV de ratones control y con el ARC lesionado. Realizamos la cuantificación de igual forma que para c-fos y expresamos los resultados como núcleos celulares/sección.

La intensidad de señal de inmuno-reactividad para NPY en el ARC y el NPV de ratones control y con el ARC lesionado, la cuantificamos de igual forma que lo que describimos para la señal inmuno-reactiva para fluoresceína, expresamos el resultado como porcentaje de DO relativo al grupo control.

Para GAD67 contamos la cantidad de puntos con perfil presináptico inmuno-reactivos para GAD67 en el NPV. También contamos los puntos con perfil presinápticos inmuno-reactivos para fluoresceína en el NPV. Expresamos los resultados como porcentaje de puntos inmuno-reactivos para GAD67 con perfil pre-sinápticos positivos también para fluoresceína, respecto de los puntos inmuno-reactivos para GAD67 con perfil pre-sináptico total.

9. Obtención de Imágenes

Las imágenes fluorescentes las adquirimos con un microscopio Leica con láser confocal de barrido TSC SP5. Fluoresceína y el fluoróforo Alexa 488 fueron excitados a 488 nm, mientras que el fluoróforo Alexa 594 fue excitado a 594 nm. Todas las imágenes de campo claro las adquirimos a baja y alta magnificación, 20 y 100x respectivamente, usando un microscopio Nikon Eclipse 50i y una cámara digital Nikon DN100, en 8 bit y en formato tif.

Utilizamos dos programas de edición de imágenes, Adobe Photoshop CS3 para ajustar el tamaño, contraste y brillo de las microfotografías, e Image J para cuantificar la DO.

10. Determinaciones plasmáticas

Determinación de ghrelina. En cada grupo experimental, determinamos los niveles plasmáticos de ghrelina inducidos luego de la administración de ghrelina. Luego de 30 y 120 minutos de la administración de ghrelina obtuvimos las muestras de sangre por decapitación de los ratones y las colocamos en tubos conteniendo EDTA y en hielo. Agregamos a cada muestra el inhibidor de proteasa, ácido p-hidroximercuribenzoico en una concentración final de 1mM. Centrifugamos las muestras e inmediatamente tratamos el plasma con una décima parte de HCl 1M y lo almacenamos a -80°C hasta usarlo. Determinamos los niveles de ghrelina utilizando un *kit* de EIA, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Determinación de corticosterona. Determinamos los niveles plasmáticos de corticosterona después de la administración de ghrelina. Luego de 0, 15, 30, 60 y 120 minutos de la administración exógena de ghrelina sacrificamos a los animales por decapitación y obtuvimos las

muestras de sangre, las centrifugamos y separamos los plasmas para medida de corticosterona por medio de un Kit de ELISA, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

11. Determinación del ARNm de CRF en el NPV

Luego de la administración de ghrelina, extrajimos los cerebros, los colocamos rápidamente en una caja de petri conteniendo dietilpirocarbonato-PBS donde los seccionamos en cortes coronales de 1 mm utilizando una matriz para cerebro de ratón. A continuación sobre las secciones coronales realizamos micro-disecciones (cilindros de 1 mm de altura y 1 mm de diámetro) del NPV utilizando una aguja 15G. Recogimos las micro-disecciones del NPV en reactivo Trizol. Aislamos el ARN total utilizando RNA STAT-60 y lo cuantificamos mediante la absorbancia a 260 nm. Tratamos el ARN total con RNasa libre de DNasa y lo transformamos en ADNc con primers random y reactivos de SuperCript II. Posteriormente realizamos una PCR tiempo real la con el sistema iCycler de BioRad y los reactivos SYBR-green. El nivel de ARNm de CRF lo cuantificamos con los primers sense: 5'-TCTGGATCTCACCTTCCACCT-3' y antisense: 5'-CCATCAGTTTCCTGTTGCTGT-3' [GenBank Accession No_NM_205769. tamaño del producto 95 bp]. Los valores los normalizamos utilizando la expresión del gen de Ciclofilina A con los primers sense: 5' -TGGTCTTTGGGAAGGTGAAAG-3 y antisense: 5'-TGTCACAGTCGGAAATGGT-3' [GenBank Accession No. NM_008907, tamaño del producto 109]. Expresamos los valores de ARNm de CRF en relación al gen de la Ciclofilina A calculados por el método comparativo del ciclo umbral (Ct) y presentamos los resultados como porcentaje de los niveles observados en las micro-disecciones del NPV. Todas las reacciones las realizamos por triplicado en placas de reacción de 96 pocillos ópticos sellados (Applied Biosystems). Las curvas de calibración para CRF y ciclofilina A de los niveles de transcripción las generamos utilizando ADNc de hipotálamo ratón con ABI 7500 Sistema Fast SDS Software versión 1.3.1 (Applied Biosystems). Para determinar los niveles de expresión relativos, los niveles promediados de CRF normalizados a los de la ciclofilina A en cada grupo experimental, los comparamos con los valores similares obtenidos a partir de ratones tratados con vehículo.

12. Determinación ex vivo de la secreción de [3H]GABA en explantes del NPV

Sacrificamos por decapitación a un grupo de ratones, extraímos sus cerebros y los colocamos rápidamente en una caja de petri conteniendo solución salina. Utilizando una matriz para cerebro de ratón, cortamos los cerebros en secciones coronales de 1 mm. A continuación, sobre las secciones coronales realizamos micro-disecciones (cilindros de 1 mm de altura y 1 mm de diámetro) del NPV usando una aguja 15G. Rápidamente, colocamos las micro-disecciones del NPV (ambos NPV de cada ratón por tubo) en medio base Krebs-Ringer Bicarbonato y las mantuvimos en incubación durante 10 minutos a 37°C bajo burbujeo de 95% O₂ y 5% CO₂. Luego las incubamos con [3H]GABA (367cpm/μl, con una actividad específica de 92,1 Ci/mmol) durante 20 minutos para llenar las vesículas sinápticas con el trazador y realizamos dos lavados con medio base (1 minuto cada uno). Posteriormente, incubamos las micro-disecciones durante 10 minutos con medio base conteniendo o no ghrelina (100 nM). Finalmente tomamos el medio base y lo mezclamos con 150 μl de líquido de centelleo y medimos la radioactividad presente en el medio en un contador β (secreción basal). La radioactividad en el medio es proporcional al [3H]GABA liberado. Estabilizada la secreción basal, realizamos una incubación de 10 minutos con medio base con 56 mM de KCl conteniendo o no ghrelina y medimos la radioactividad en las alícuotas conteniendo el [3H]GABA liberado (secreción estimulada por KCl) como indicamos antes.

13. Análisis Estadístico.

Los análisis estadísticos los realizamos con el programa GraphPad Prism versión 5.0 para Windows (GraphPad software, San Diego, CA). Expresamos todos los datos como la media ± SEM. El análisis estadístico que utilizamos dependió de cada condición experimental. Utilizamos un Test.t cuando comparamos dos grupos. Utilizamos un test de ANOVA de una vía para comparar varios grupos respecto al grupo control y un test de ANOVA de dos vías cuando hubo dos grupos experimentales sometidos a distintos tratamientos. En todos los casos utilizamos un Test de Newman Keuls como post-test para determinar si existían diferencias significativas entre grupos. Consideramos diferencias significativas cuando $p \leq 0.05$.

14. Nota

Sacrificamos a los animales de acuerdo a las normas internacionales aceptadas del “National Institutes of Health” (NIH). Todos los protocolos experimentales, que comprendieron el uso de animales, fueron aprobados por la Comisión de Bioterio del Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE), la cual actúa como comisión de bioética en la utilización de animales.

1- Núcleos cerebrales que median los efectos de ghrelina

Con el objetivo de definir cuáles podrían ser los potenciales circuitos a través de los cuales ghrelina regula las neuronas CRF del NPV decidimos primero evaluar que núcleos cerebrales activa (a) y a que núcleos cerebrales puede acceder (b) la ghrelina administrada exógenamente. Para ello administramos la ghrelina en forma subcutánea, utilizando dos dosis diferentes, o en forma central.

a) Núcleos cerebrales que se activan en respuesta a la ghrelina exógena

Administramos subcutáneamente vehículo conteniendo o no ghrelina en una dosis baja o en una dosis alta (0,06 o 0,6 nmol/g de peso corporal; respectivamente). En otro grupo de ratones inyectamos vehículo conteniendo o no ghrelina (0,6 nmol/ratón) en el ventrículo lateral cerebral. Inicialmente, determinamos las concentraciones de ghrelina que se alcanzan en cada situación experimental. Sacrificamos por decapitación 4 animales de cada condición experimental a los 30 y 120 minutos post-tratamiento. En el grupo tratado con vehículo las concentraciones de ghrelina fueron 250 ± 32 y 268 ± 26 pg/ml luego de 30 a 120 minutos post-tratamiento, respectivamente. En ratones tratados subcutáneamente con la dosis baja de ghrelina los valores plasmáticos de ghrelina ascendieron a 584 ± 76 pg/ml luego de 30 minutos post-tratamiento ($p < 0.05$, comparado con el grupo tratado con vehículo) y retornaron a 301 ± 23 pg/ml, 120 minutos post-tratamiento. En ratones tratados subcutáneamente con la dosis alta de ghrelina, los niveles plasmáticos de ghrelina fueron 4207 ± 583 y 1030 ± 154 pg/ml, luego de 30 a 120 minutos post-tratamiento, respectivamente ($p < 0.01$ comparado con el grupo tratado con vehículo). En ratones inyectados en el ventrículo lateral con ghrelina, las concentraciones plasmáticas de ghrelina fueron 317 ± 39 y 240 ± 32 pg/ml, luego de 30 y 120 minutos post-tratamiento, respectivamente. En grupos independientes de ratones evaluamos el consumo de alimento a los 30, 60 y 120 minutos luego de la administración periférica o central de ghrelina. Para la administración periférica utilizamos un total de 37 ratones agrupados de la siguiente forma: 13 ratones inyectados con vehículo; 12 ratones inyectados con la dosis baja de ghrelina y 12 ratones inyectados con la dosis alta de ghrelina. Para la administración central utilizamos un total de 18 ratones; 5 ratones inyectados con

vehículo y 13 ratones inyectados con ghrelina. Todos los grupos tratados con ghrelina tuvieron un aumento de la ingesta de alimento (Figura 4). No encontramos diferencias significativas en dichas variables en los grupos tratados periféricamente o centralmente con vehículo ($p>0.09$), por lo que agrupamos sus datos y los denominamos grupo vehículo. La administración periférica de ghrelina produjo un aumento de la ingesta de alimento dependiente de la dosis ($3,2\pm 0,7$; $13,3\pm 1,0$ y $20,2\pm 1,7$ mg/g de peso corporal para vehículo, baja y alta dosis de ghrelina, respectivamente, $p<0.05$). La administración ICV de ghrelina estimuló la ingesta de alimento de igual forma que la administración subcutánea de la dosis alta de ghrelina ($18,1\pm 1,5$ mg/g de peso molecular; $p<0.05$ vs grupo vehículo).

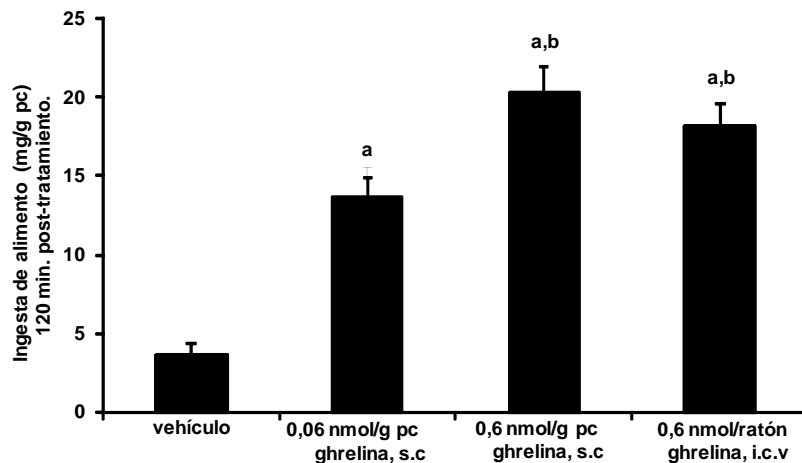


Figura 4. Consumo de alimento 120 minutos (min.) después de la administración subcutánea o ICV de vehículo conteniendo o no ghrelina en ratones alimentados *ad libitum*. Los datos representan la media \pm SEM. a, $p<0.05$ vs. grupo vehículo. b, $p<0.05$ vs. grupo con dosis baja de ghrelina s.c. pc: peso corporal.

Para determinar los núcleos cerebrales que se activan en respuesta a ghrelina en cada condición experimental, anestesiámos a los ratones 120 minutos después del tratamiento, los perfundimos, obtuvimos los cerebros, los cortamos en secciones coronales y realizamos una IHQ contra el marcador de activación neuronal c-fos. Elegimos este tiempo en base a evidencias previas que muestran que la presencia de la proteína c-fos nuclear requiere no sólo de la expresión génica sino también de la biosíntesis y movilización de proteínas desde el citoplasma al núcleo de la célula [14]. En ratones tratados periféricamente con la dosis baja de ghrelina

observamos células inmuno-reactivas para c-fos exclusivamente en el ARC. En ratones tratados periféricamente con la dosis alta de ghrelina, observamos células inmuno-reactivas para c-fos en el ARC y en otras áreas del cerebro, tales como el NTS y el NPV. En ratones inyectados centralmente con ghrelina, observamos células inmuno-reactivas para c-fos no sólo en los núcleos mencionados anteriormente si no también en otras áreas cerebrales como el AHA, el DM y el VTA, entre otras (Tabla 2).

Tabla 2. Análisis cualitativo de c-fos1 en núcleos cerebrales de ratón.

	Vehículo	0.06 nmol/g pc ghrelina s.c	0.6 nmol/g pc ghrelina s.c	0.6 nmol/ratón ghrelina i.c.v
Núcleo hipotalámico arcuato–ARC	-	++	+++	+++
Núcleo dorsomedial–DM	-	-	-	+
Núcleo paraventricular–NPV	-	-	++	++
Núcleo ventromedial–VMH	-	-	-	+
Área postrema–AP	-	-	+	+
Núcleo motor dorsal del vago–NMDV	-	-	+	+
Núcleo del tracto solitario–NTS	-	-	+	+
Sustancia nigra–SNC	-	-	-	+
Área tegmental ventral–VTA	-	-	+/-	+

¹ Realizamos la estimación semi-cuantitativa de c-fos considerando tanto la intensidad de señal como el número de células marcadas: +++, densidad alta; ++, densidad moderada; +, baja densidad ; +/-, visualización inconsistente.

Luego, realizamos el análisis cuantitativo detallado en el NPV (Figura 5), donde se encuentran las neuronas CRF hipofisiotrópicas y en el ARC y el NTS los cuales no sólo regulan la ingesta de alimento sino que también inervan el NPV [12, 17, 25] (Figura 6). En el NPV, los ratones inyectados periféricamente con vehículo o con la dosis baja de ghrelina mostraron un número similar de células inmuno-reactivas para c-fos (38 ± 6 y 34 ± 6 células/sección, respectivamente; $p=ns$). En contraste, la administración periférica de la dosis alta de ghrelina o ghrelina ICV causaron un incremento significativo del número de células inmuno-reactivas para c-fos (144 ± 35 y 197 ± 25 , células/sección, respectivamente; $p < 0.05$ vs. grupo tratado con vehículo). Es importante destacar, que el número de células inmuno-reactivas para c-fos en el NPV no fue estadísticamente diferente en los ratones inyectados con ghrelina periféricamente con la dosis alta

o en el ventrículo lateral. En el ARC, ratones tratados periféricamente con ghrelina, mostraron un incremento del número de células inmuno-reactivas para c-fos dependiente de la dosis comparado con el grupo tratado con vehículo (5 ± 1 , 37 ± 7 y 57 ± 3 células/sección para vehículo, dosis baja y alta de ghrelina, respectivamente; $p < 0.05$). Ratones inyectados con ghrelina en el ventrículo lateral mostraron el mayor número de células inmuno-reactivas para c-fos en el ARC (87 ± 9 células/sección, $p < 0.05$; comparado con los otros grupos experimentales). En el NTS, al igual que en el NPV, los ratones inyectados periféricamente con vehículo o con la dosis baja de ghrelina mostraron un número similar de células inmuno-reactivas para c-fos (18 ± 2 y 21 ± 4 células/sección, respectivamente; $p = ns$). En contraste, la administración periférica de ghrelina a dosis alta o ICV causó un incremento significativo del número de células inmuno-reactivas para c-fos en el NTS (60 ± 9 y 75 ± 12 células/sección, $p < 0.05$ vs. grupo tratado con vehículo; respectivamente). El número de células inmuno-reactivas para c-fos en el NTS no fue estadísticamente diferente en estos dos últimos grupos experimentales.

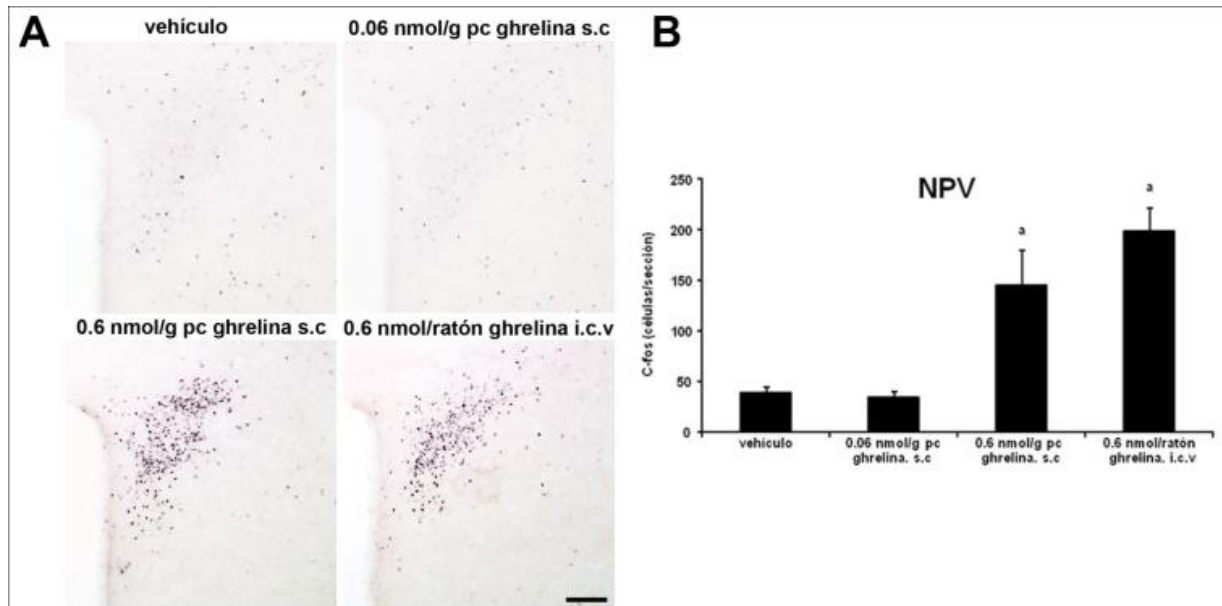


Figura 5. Panel A muestra microfotografías a baja (20 x) magnificación representativas de la inmunotinción de c-Fos en el NPV de ratones tratados con vehículo conteniendo o no ghrelina. Barra de escala: 100 µm. Panel B muestra el análisis cuantitativo del número de células inmuno-reactivas para c-fos en el NPV de ratones tratados con vehículo conteniendo o no ghrelina. Los datos representan la media \pm SEM. a, $p < 0.05$ vs. grupo control. pc: peso corporal.

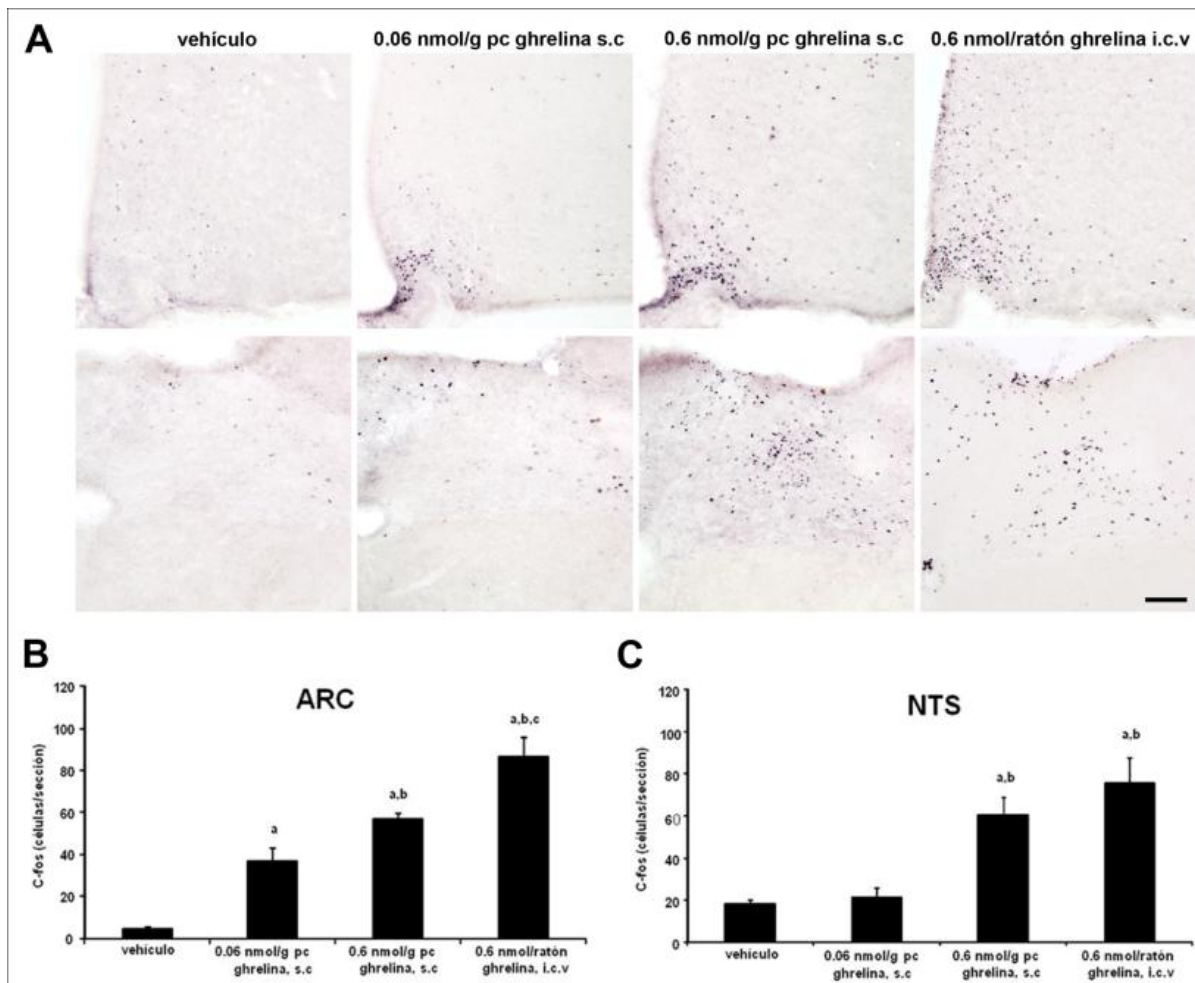


Figura 6. Panel A muestra microfotografías a baja (20x) magnificación representativas de la inmunotinción de c-Fos en el ARC (línea superior) y en el DVC (línea inferior) de ratones tratados con vehículo y con ghrelina. Barra de escala: 100 μ m. Los gráficos de barra muestran el análisis cuantitativo del número de células inmuno-reactivas para c-Fos en el ARC (panel B) y en el NTS (panel C) de ratones tratados con vehículo y con ghrelina. Los datos representan la media \pm SEM. a, $p < 0.05$ vs. grupo control. b, $p < 0.05$ vs. grupo con dosis baja de ghrelina s.c. c, $p < 0.05$ vs. grupo con dosis alta de ghrelina s.c. pc: peso corporal.

b) Núcleos cerebrales accesibles a ghrelina periférica o central

Para determinar las áreas cerebrales accesibles a ghrelina periférica o central utilizamos un análogo de 18-aminoácidos de la ghrelina conjugada con isotiocianato de fluoresceína (F-ghrelina). En primera instancia evaluamos la bioactividad de F-ghrelina. A tal fin, inyectamos vehículo conteniendo o no ghrelina (0,6 nmol/ratón) o F-ghrelina (0,6 nmol/ratón) en el ventrículo lateral de ratones y comparamos la ingesta de alimento en los diferentes grupos. Utilizamos un total de 4 ratones por cada condición experimental. Los ratones inyectados en el ventrículo lateral con ghrelina o F-ghrelina tuvieron un aumento significativo en la ingesta de alimento (199 ± 19 y

203±30 mg, respectivamente), en comparación con los ratones tratados con vehículo (18±11 mg) (Figura 7A). La magnitud de la ingesta de alimento inducida por F-ghrelina no fue estadísticamente diferente de la inducida por ghrelina. Luego de 120 minutos post-tratamiento anestesiámos a los ratones, perfundimos, obtuvimos sus cerebros y los cortamos en secciones coronales que montamos para su examen al microscopio de fluorescencia. Bajo esta condición, no observamos células con señal fluorescente verde. Con el fin de testear los sitios accesibles a ghrelina central, inyectamos centralmente vehículo conteniendo o no ghrelina o F-ghrelina en un grupo independiente de ratones, los anestesiámos 15 minutos post-inyección y proseguimos como describimos anteriormente. Utilizamos 4 ratones por cada condición experimental. Bajo esta condición, observamos células con una fuerte señal fluorescente verde, exclusivamente en ratones inyectados con F-ghrelina y no observamos señal fluorescente en ratones tratados con vehículo o con ghrelina. A pesar de que cubrimos las muestras con medio de montaje comercial, la fluorescencia de F-ghrelina decayó rápidamente hasta desaparecer por completo. Con el fin de estabilizar la señal fluorescente y aumentar la sensibilidad del sistema para realizar una detallada caracterización neuroanatómica de los sitios positivos para F-ghrelina, realizamos las IHQs fluorescente y cromogénica contra fluoresceína. Ambos tipos de IHQs mostraron especificidad dado que no observamos ninguna señal cuando omitimos los anticuerpos primario o secundario del ensayo o cuando utilizamos muestras de cerebro de ratones tratados con vehículo o ghrelina. Asimismo, para confirmar esta especificidad del ensayo, administramos 0,6 nmol/ratón de F-ghrelina más 6 nmol/ratón de ghrelina en el ventrículo lateral de ratones (n=3). La presencia de F-ghrelina en los diferentes sitios del cerebro fue específica ya que la señal de inmuno-reactividad positiva para fluoresceína se redujo significativamente por un exceso de ghrelina no fluorescente (Figura 7B). Ambos tipos de IHQ contra fluoresceína mostraron patrones muy similares y consistentes de la señal. Sin embargo, la inmuno-tinción cromogénica fue más sensible debido a los pasos adicionales de amplificación de la señal. Por lo tanto, utilizamos la señal cromogénica de las células inmuno-reactivas para fluoresceína en muestras de cerebro de los ratones inyectados centralmente con F-ghrelina para el detallado análisis neuroanatómico de los sitios accesibles a ghrelina central.

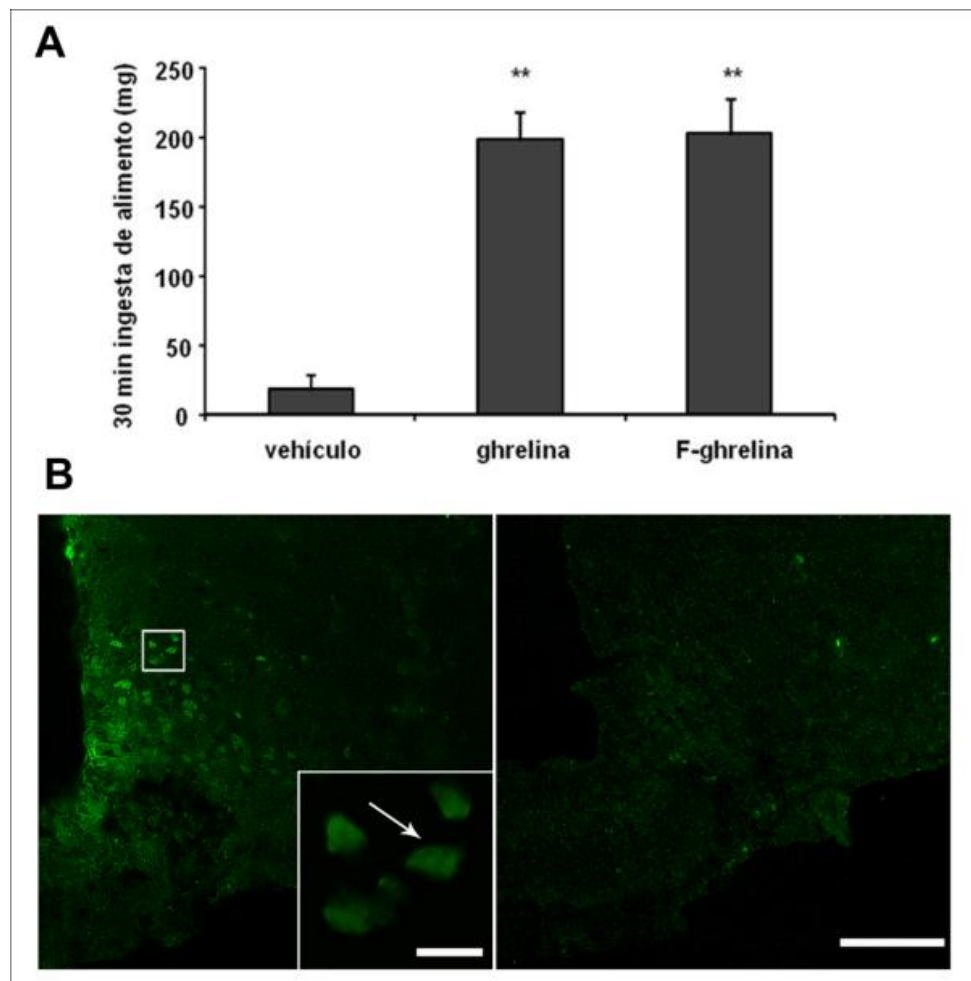


Figura 7. El panel A muestra la ingesta de alimento a los 30 minutos (min.) en ratones inyectados en el ventrículo lateral sólo con vehículo o conteniendo 0,6 nmol/ratón de ghrelina o F-ghrelina. Los datos representan la media \pm SEM. **, $p \leq 0.01$. El panel B muestra microfotografías confocales representativas de la señal inmunoreactiva para fluoresceína en secciones coronales del ARC de ratones inyectados en el ventrículo lateral sólo con 0,6 nmol/ratón de F-ghrelina (izquierda) o además con 6 nmol/ratón de ghrelina (a la derecha). El inserto muestra a mayor magnificación la zona marcada en la imagen de menor aumento. La flecha señala las células inmunoreactivas para fluoresceína. Las barras representan, 100 μ m (menor magnificación), 10 μ m (mayor magnificación).

En general, el patrón de células inmunoreactivas para fluoresceína en ratones inyectados centralmente con F-ghrelina fue consistente con los informes anteriores de la distribución del ARNm de GHSR-1a [43]. Los patrones de células inmunoreactivas para fluoresceína que observamos los resumimos en la [Tabla 3](#) y se muestran visualmente en los diagramas esquemáticos en la [Figura 8](#).

Tabla 3. Densidad Relativa de células inmuno-reactivas para Fluoresceína en el Sistema Nervioso Central de Ratones inyectados centralmente con F-ghrelina²

Hipocampo y septum	
Astas de Ammon, CA1	+
Astas de Ammon, CA2	+
Astas de Ammon, CA3	+
Núcleo septal lateral -SL	+
Tálamo	
Núcleo Talamico paraventricular –PV	++
Hipotálamo	
Área hipotalámica anterior –AHA	+
Núcleo hipotalámico arcuato –ARC	+++
Núcleo dorsomedial –DM	+
Núcleo paraventricular –NPV	++
Núcleo hipotalámico periventricular–Pe	++
Núcleo premamilar ventral–PMV	++
Núcleo supramamilar –SuM	+
Núcleo supraquiasmático –NSQ	+/-
Núcleo ventromedial –VMH	+++
Area pre-óptica ventromedial –APOM	+++
Órgano subfornical –OSF	++
Cerebro medio, protuberancia y bulbo raquídeo	
Área postrema –AP	++
Núcleo motor dorsal del vago –NMDV	+
Núcleo rafe dorsal–RD	++
Núcleo tegmental dorsal –TgD	++
Núcleo edinger westphal–EW	+/-
Núcleo tegmental laterodorsal–TgLD	++
Locus coeruleus –LoC	++
Núcleo magnocelular de la comisura posterior –MCPC	+/-
Núcleo ambiguo –Amb	+/-
Núcleo del tracto solitario –NTS	++
Sustancia nigra –SN	+/-
Area tegmental ventral –VTA	+

² Realizamos las estimaciones cualitativas de la inmuno-reactividad para fluoresceína considerando tanto la intensidad de señal como el número de células marcadas: +++,densidad alta; ++, densidad moderada; +, baja densidad ; +/-, visualización inconsistente .

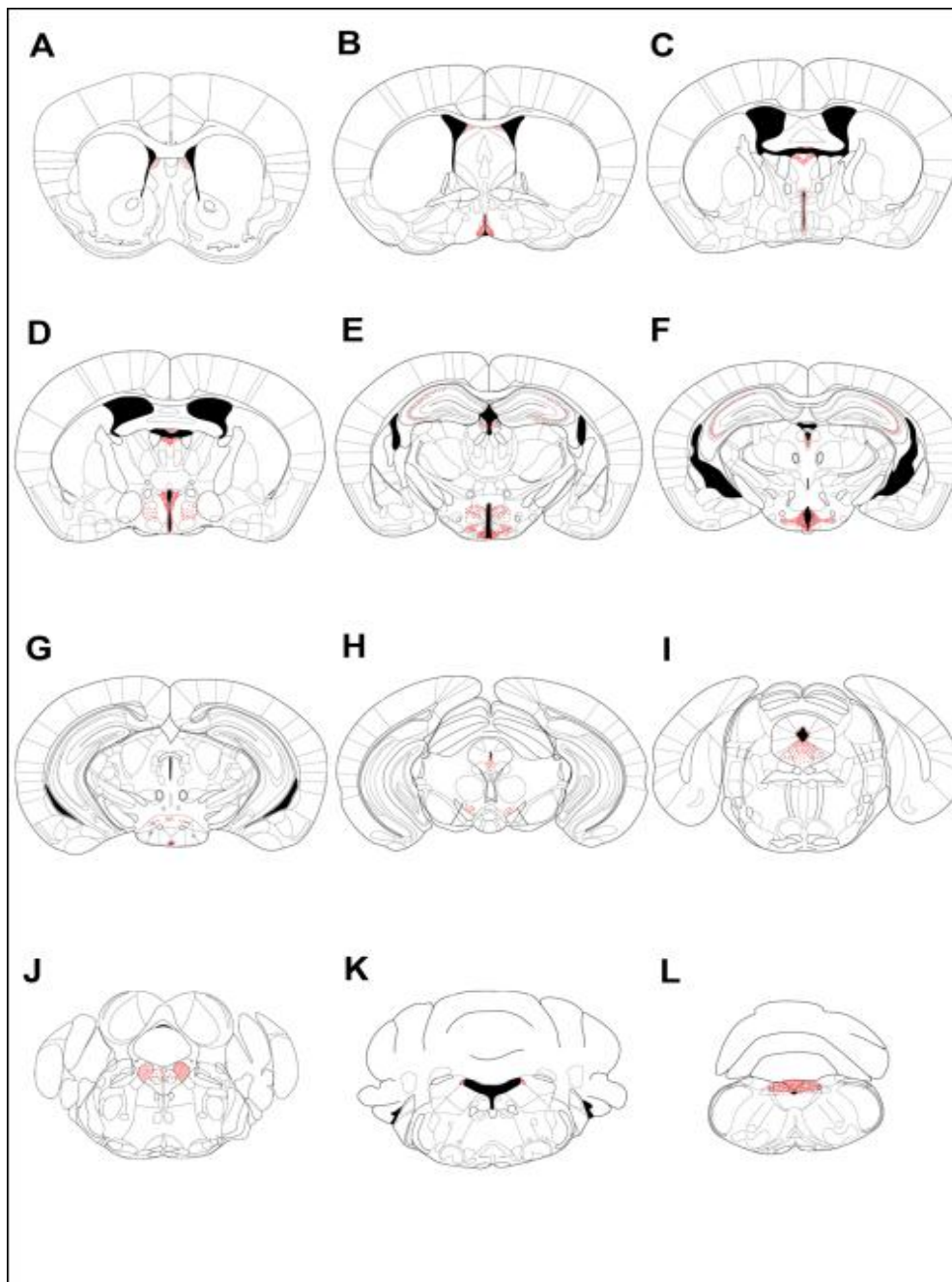


Figura 8. Serie de dibujos que ilustran los sitios con señal inmuno-reactiva para fluoresceína en ratones inyectados centralmente con F-ghrelina. Las secciones están dispuestas de manera rostral-caudal. Los paneles A a L ilustran los siguientes niveles de bregma: 1,10; 0,26; -0,34; -0,58; -1,82; -2,30; -2,80; -3,52; -4,60; -5,20; -5,80; -7,48 mm, respectivamente. Cada punto representa una célula positiva.

Observamos mayor número y mayor intensidad de células inmuno-reactivas para fluoresceína en el hipotálamo. El ARC fue una de las zonas con mayor cantidad de células inmuno-reactivas para fluoresceína, ubicadas en todo el eje rostral-caudal del núcleo y más concentradas en su parte medial (Figura 9A). En el VMH y el APOM detectamos una inmuno-reactividad densa para fluoresceína, que también abarcó la extensión rostral caudal de ambos núcleos (Figura 9A y 9B,

respectivamente). El Pe mostró células inmuno-reactivas para fluoresceína a través de toda la zona que rodea el tercer ventrículo (Figura 9C). Dentro del NPV la células inmuno-reactivas para fluoresceína fueron moderadas y enriquecidas en la parte medial del núcleo (Figura 9D). El DM también mostró inmuno-reactividad para fluoresceína y la mayoría de las células positivas se localizaron en la parte caudal del núcleo (Figura 9E). El PMV, AHA y SUM también mostraron una cantidad significativa de células inmuno-reactivas para fluoresceína de intensidad moderada (Figura 9F-H). El NSQ tuvo una presencia escasa de células inmuno-reactivas para fluoresceína.

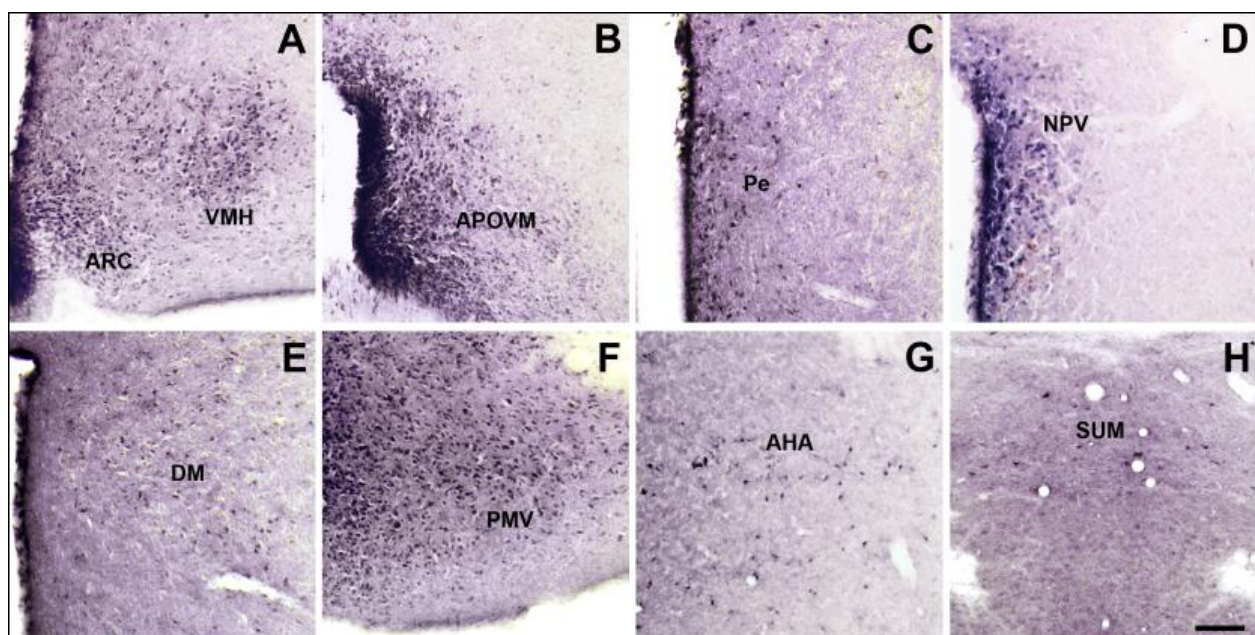


Figura 9. Los paneles muestran una serie de microfotografías representativas de secciones coronales de las diferentes regiones del hipotálamo después de la IHQ cromogénica para fluoresceína (señal negro / violeta). Paneles A a G muestran el ARC y VMH (A, bregma -1,82 mm), APOVM (B, bregma 0,26 mm), Pe (C, bregma -0,34 mm), NPV (D, bregma -0,58 mm), DM (E, bregma -1,82 mm), PMV (F, bregma -2,30 mm), AHA (G, bregma -0,58 mm) y SUM (H, bregma -2,80 mm). Barra de escala: 100 µm.

Muchas áreas extra-hipotalámicas mostraron inmuno-reactividad para fluoresceína. Encontramos células positivas en las astas de Ammon del hipocampo (Figura 10A), SL del septum (Figura 10B), PN del tálamo (Figura 10C) y OSF (Figura 10D). En el cerebro medio, observamos células inmuno-reactivas para fluoresceína en el VTA (Figura 10E) y DR (Figura 10F). En estas regiones, encontramos el número más abundante de células inmuno-reactivas para fluoresceína en la DR y menos en el VTA. En la protuberancia, encontramos células inmuno-reactivas para

fluoresceína en el LoC (Figura 10G). El TgLD y el TgD del tronco cerebral también mostraron una cantidad significativa de células inmuno-reativas para fluoresceína (Figura 10H). En el bulbo raquídeo, observamos células inmuno-reativas para fluoresceína en los tres componentes del CDV: el AP, el NTS y el NMDV (Figura 10I). Es de destacar, que encontramos pocas o inconsistentes células inmuno-reativas para fluoresceína en la SN, el EW, el Amb y el MCPC, donde se ha reportado la expresión del ARNm GHSR-1a [43].

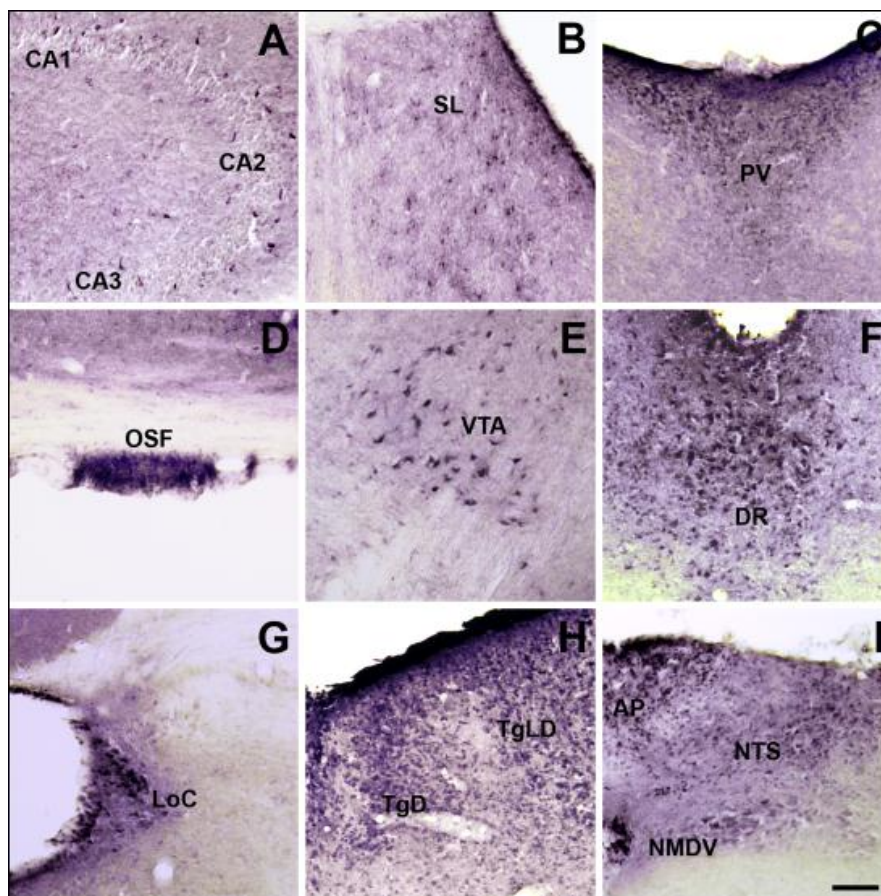


Figura 10. Los paneles muestran una serie de microfotografías representativas de secciones coronales de diferentes regiones extra hipotálamicas después de la IHQ cromogénica para fluoresceína (señal negro /violeta). Panels A a G muestran las Astas de Ammon del hipocampo (A, bregma -1,82 mm), SL del septum (B, bregma 1,10 mm), PN del tálamo (C, bregma -0,58 mm), OSF (D, bregma -0,58 mm), VTA (E, bregma -3,52 mm), DR (F, bregma -4,60 mm) y el LoC (G, bregma -5,80 mm). Panel H muestra el TgLD y el TgD (bregma -5,20 mm), y panel I muestra el AP, NTS y NMDV componentes del CDV (bregma -7,48 mm). Barra de escala: 100 µm.

Como se puede observar en las figuras 9 y 10, también detectamos inmuno-reactividad para fluoresceína en las células endoteliales que recubren el sistema ventricular del cerebro, donde GHSR aún no se ha descrito [43, 86]. Observamos células inmuno-reativas para fluoresceína en

las células ependimarias del tercer ventrículo, el ventrículo lateral, cuarto ventrículo, el acueducto de Silvio y el canal central. En la parte inferior del tercer ventrículo, la mayoría de las células ependimarias que revisten el suelo de la cavidad del infundíbulo, donde se encuentran los tanicitos, fueron inmuno-reactivas para fluoresceína (Figura 11A). En estas células, detectamos inmuno-reactividad para fluoresceína en el cuerpo celular así como en sus proyecciones que se extienden profundamente en la EM (Figura 11A). En contraste, la distribución de la inmuno-reactividad para fluoresceína en el resto de la capa ependimaria, incluyendo la parte superior del tercer ventrículo, mostraron un perfil irregular con señal positiva presente exclusivamente en el cuerpo celular de algunas células, pero no en todas las células ependimarias (Figura 11B-D). Finalmente para completar la validación de la especificidad de la inmuno-reactividad para F-ghrelina, administramos centralmente vehículo conteniendo o no F-ghrelina (0,6 nmol/ratón) en ratones deficientes del receptor de ghrelina (n=3) (Figura. 12). Es interesante destacar, que en los ratones deficientes de GHSR inyectados centralmente con F-ghrelina detectamos exclusivamente inmuno-reactividad para fluoresceína en las células ependimarias que recubren el sistema ventricular del cerebro (Figura 12).

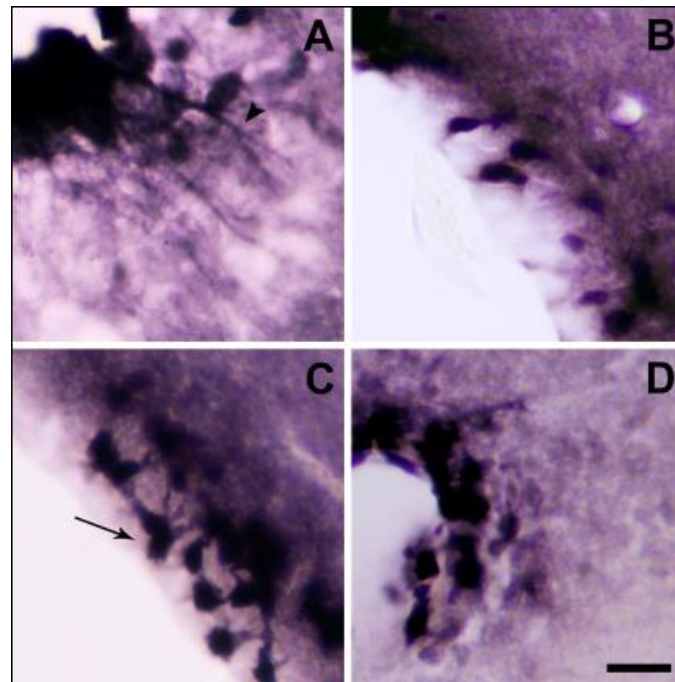


Figura 11. Los paneles muestran una serie de microfotografías representativas de secciones coronales de diferentes regiones del sistema ventricular del cerebro de ratón después de la IHQ para fluoresceína (señal negro / violeta). Los paneles A a D muestran las células ependimarias que revisten la parte inferior (A) o superior (B) del tercer ventrículo, el acueducto de Silvio (C) y el canal central (D). La cabeza de flecha indica las proyecciones celulares inmuno-reactivas para fluoresceína y la flecha señala los cuerpos celulares inmuno-reactivos para fluoresceína. Barra de escala: 20 μ m

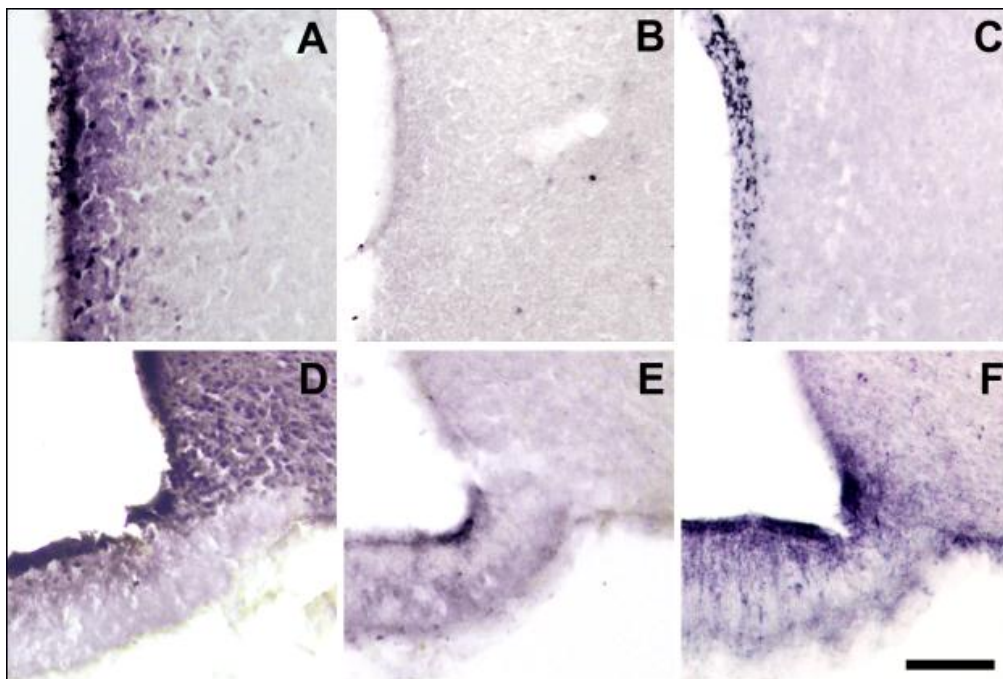


Figura 12. Los Paneles izquierdo (A y D) y los del centro (B y E) muestran microfotografías representativas de la señal inmuno-reactiva para fluoresceína en la capa ependimaria de los ratones salvaje tratados centralmente sólo con F-ghrelina o con una combinación de F-ghrelina más ghrelina, respectivamente. Paneles de la derecha (C y F) muestran microfotografías representativas de señal inmuno-reactiva para fluoresceína en la capa ependimaria de los ratones deficientes de GHSR tratados centralmente con F-ghrelina. Paneles superiores (A-C) e inferior (D-F) muestran la parte superior e inferior del tercer ventrículo, respectivamente. Barra de escala: 100 μ m

Una vez que validamos la especificidad del uso de F-ghrelina para detectar la presencia de GHSR, decidimos evaluar qué áreas del cerebro son accesibles a la ghrelina periférica. Para esto, administramos subcutáneamente vehículo conteniendo o no F-ghrelina en una dosis baja o alta; 0,06 o 0,6 nmol/g de peso corporal, respectivamente. Quince minutos post-tratamiento anestesiamos a los ratones, los perfundimos, obtuvimos sus cerebros y los cortamos en secciones coronales sobre las cuales realizamos una IHQ contra fluoresceína. Utilizamos un total de 4 animales por cada condición experimental. En ratones tratados periféricamente con la dosis baja de F-ghrelina, encontramos inmuno-reactividad para fluoresceína sólo en el ARC y en células de la EM que probablemente sean tanicitos basado en sus características morfológicas y en su ubicación. En ratones tratados periféricamente con la dosis alta de ghrelina, no sólo encontramos células inmuno-reactivas para fluoresceína en el ARC y en las células de la EM, sino también en el AP y en el NPV. No encontramos diferencias significativas en la intensidad de señal inmuno-reactiva para fluoresceína en los núcleos cerebrales de ratones tratados periféricamente o centralmente con vehículo ($p > 0.09$), por este motivo agrupamos sus datos y los denominamos grupo vehículo. En el NPV de ratones tratados centralmente con F-ghrelina encontramos una señal inmuno-reactiva para fluoresceína compatible con el aspecto y tamaño de cuerpos celulares, mientras que en los ratones tratados periféricamente con la dosis alta de F-ghrelina observamos una señal inmuno-reactiva para fluoresceína difusa (ver insertos en [Figura 13A](#)). En el NPV de ratones inyectados periféricamente con vehículo o con la dosis baja de F-ghrelina mostraron similares niveles de intensidad de señal inmuno-reactiva para fluoresceína ($31,4 \pm 1,1$ y $31,1 \pm 0,4$ DO, respectivamente; $p = ns$). En contraste, ratones inyectados con F-ghrelina periféricamente con la dosis alta o centralmente mostraron un incremento significativo en la intensidad de señal inmuno-reactiva para fluoresceína en el NPV ($37,2 \pm 1,3$ y $124,9 \pm 21,8$ DO, respectivamente; $p < 0.05$ vs. grupo tratado con vehículo). Los ratones inyectados centralmente con F-ghrelina mostraron significativamente mayores niveles de intensidad de señal inmuno-reactiva para fluoresceína, comparado con los ratones inyectados periféricamente con la dosis alta de F-ghrelina ([Figura 13B](#)).

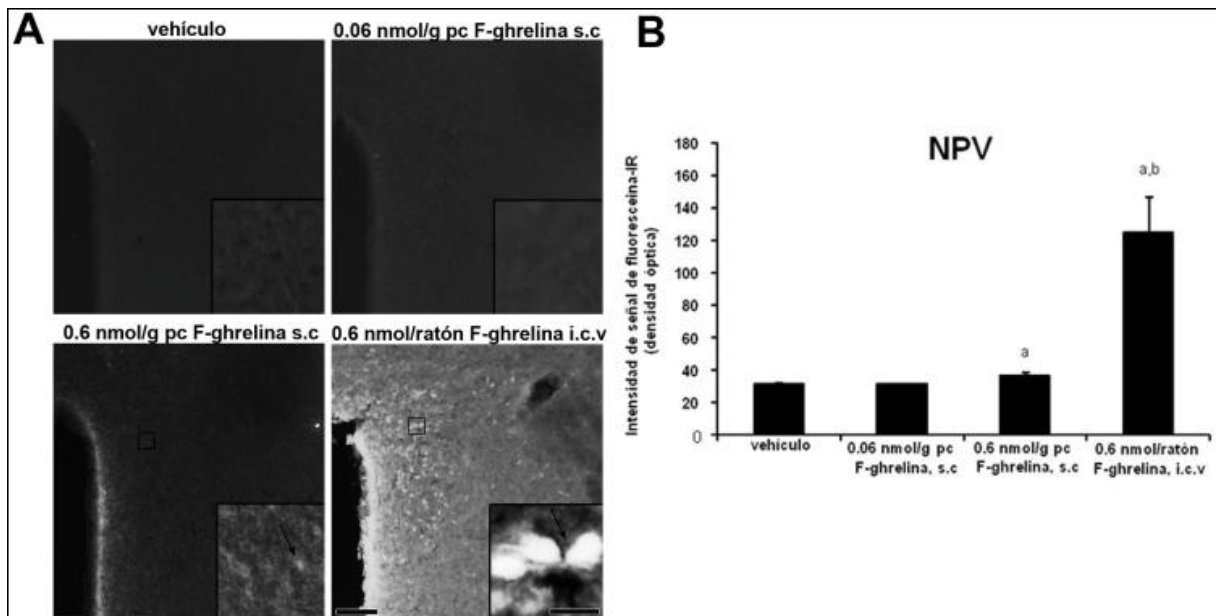


Figura 13. Panel A muestra una serie de microfotografías invertidas a baja magnificación (20x) representativas de la IHQ cromogénica para fluoresceína en el NPV de ratones tratados con vehículos o con F-ghrelina. Barras de escala: 100 μ m (menor magnificación), 10 μ m (mayor magnificación). Panel B muestra el análisis cuantitativo de la intensidad de señal inmuno-reactiva para fluoresceína en el NPV de ratones tratados con vehículo o con F-ghrelina. Los datos representan la media \pm SEM. a, $p < 0.05$ vs grupo control. b, $p < 0.05$ vs grupo con dosis alta de F-ghrelina s.c. pc: peso corporal

Por otro lado, el ARC de ratones tratados periféricamente con la dosis baja de F-ghrelina mostró una señal inmuno-reactiva para fluoresceína difusa, mientras que en los ARC de ratones tratados periféricamente con la dosis alta de F-ghrelina o centralmente encontramos una inmunoreactividad para fluoresceína compatible con el aspecto y tamaño al de cuerpos celulares (ver insertos en [Figura 14A](#)). En el ARC, los ratones tratados periféricamente con F-ghrelina mostraron un incremento, dosis-dependiente, en la intensidad de señal inmuno-reactiva para fluoresceína (18,5 \pm 2,8; 32,0 \pm 4,4 y 46,9 \pm 1,4 DO para el ARC de vehículo, dosis baja o alta de F-ghrelina, respectivamente; $p < 0.05$). Los ratones tratados centralmente con F-ghrelina mostraron el mayor nivel de intensidad de señal inmuno-reactiva para fluoresceína en el ARC (151,8 \pm 14,6 DO, $p < 0.05$, comparado con los otros grupos experimentales, [Figura 14B](#)). En la EM, ratones tratados periféricamente con F-ghrelina mostraron un incremento significativo de intensidad de señal inmuno-reactiva para fluoresceína comparado con el grupo tratado con vehículo (24,7 \pm 3,1; 60,9 \pm 12,9 y 74,7 \pm 5,0 DO para la EM de vehículo, dosis baja y alta de ghrelina, respectivamente; $p < 0,05$). De igual forma a lo que encontramos en el ARC, los ratones tratados centralmente con F-

ghrelina mostraron el mayor nivel de intensidad de señal inmuno-reactiva para fluoresceína en la EM ($146,5 \pm 28,5$ DO, $p < 0,05$) comparado con los otros grupos experimentales (Figure 14C). En el NTS, los ratones inyectados periféricamente con vehículo, la dosis baja o alta de F-ghrelina, mostraron niveles similares de intensidad de señal inmuno-reactiva para fluoresceína ($25,0 \pm 4,8$; $26,1 \pm 1,1$ y $26,4 \pm 1,0$ DO, respectivamente; $p = ns$), mientras que los ratones inyectados centralmente con F-ghrelina mostraron un incremento significativo en la intensidad de señal inmuno-reactiva para fluoresceína ($75,1 \pm 12,3$ DO; $p < 0,05$), comparado con los otros grupos experimentales (Figura 14D). En el AP, al igual que el NPV, los ratones inyectados periféricamente con vehículo o con la dosis baja de ghrelina mostraron niveles similares de intensidad de señal inmuno-reactiva para fluoresceína ($26,6 \pm 3,4$ y $28,2 \pm 2,1$ DO, respectivamente; $p = ns$). En contraste, ratones inyectados con F-ghrelina periféricamente a la dosis alta o centralmente mostraron un incremento significativo en la intensidad de señal inmuno-reactiva para fluoresceína en el AP ($40,0 \pm 0,9$ y $105,9 \pm 2,0$ DO, respectivamente; $p < 0,05$ comparado el grupo tratado con vehículo). Los niveles de intensidad de señal inmuno-reactiva para fluoresceína fueron estadísticamente diferentes en estos dos últimos grupos experimentales (Figura 14E).

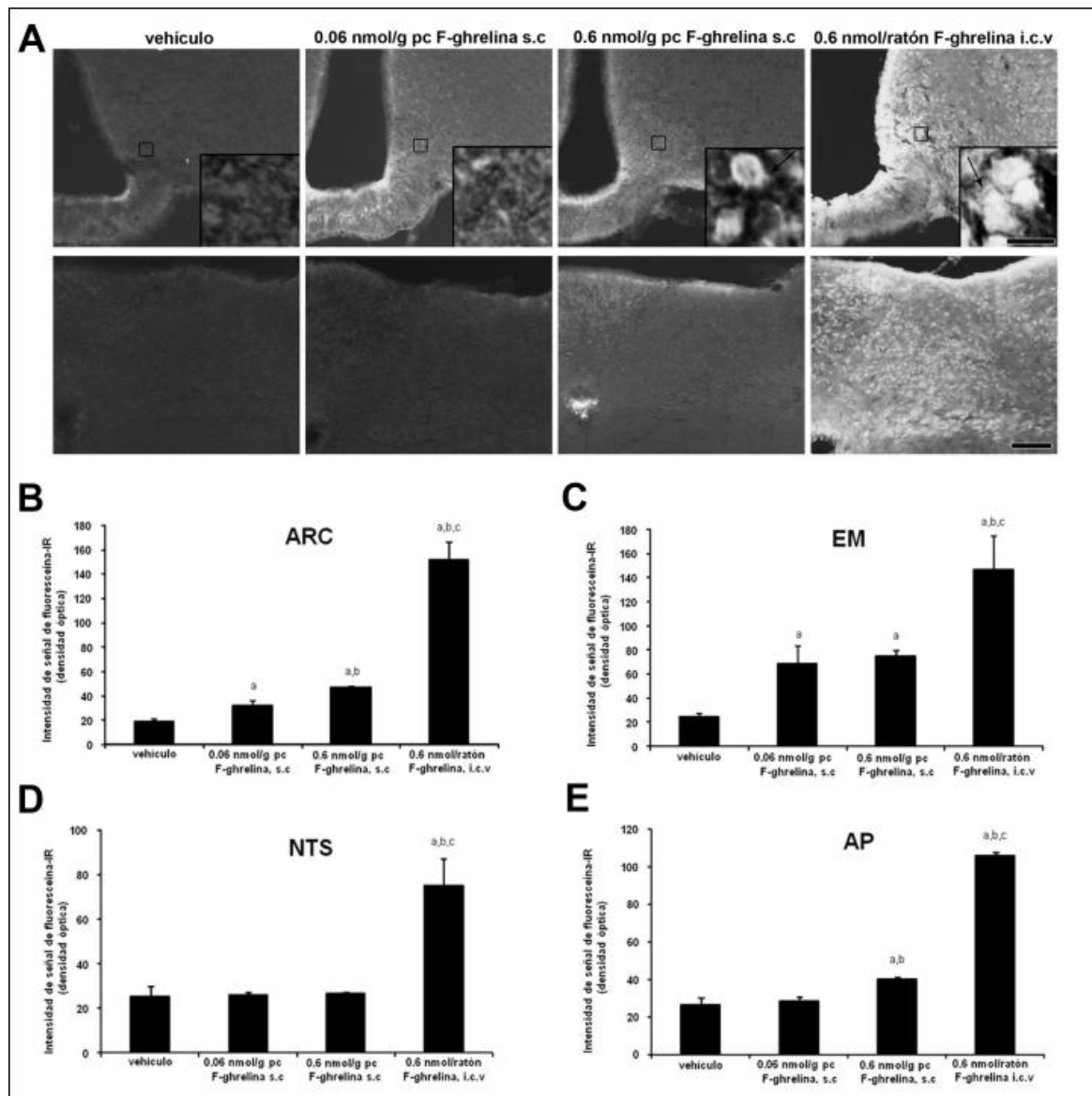


Figura 14. Panel A muestra una serie de microfotografías invertidas a baja magnificación (x20) representativas de la IHQ cromogénica para fluoresceína en el ARC y EM (línea superior) y el CDV (línea inferior) de ratones tratados con vehiculos o con F-ghrelina. Barras de escala: 100 μ m (menor magnificación), 10 μ m (mayor magnificación). Gráficos de barra muestran el análisis cuantitativo de la intensidad de señal de inmuno-reactividad para fluoresceína en el ARC (panel B), EM (panel C), NTS (panel D) y AP (panel E) de ratones tratados con vehículo o con F-ghrelina. Los datos representan la media \pm SEM. a, $p < 0.05$ vs grupo control. b, $p < 0.05$ vs grupo con dosis baja de F-ghrelina s.c. c, $p < 0.05$ vs grupo con dosis alta de F-ghrelina s.c. pc: peso corporal.

2- Estudio de los efectos de ghrelina periférica o central sobre las neuronas CRF del NPV y el eje HHA

Como se muestra en el primer capítulo de esta Tesis Doctoral, una dosis alta de ghrelina periférica y ghrelina administrada centralmente pueden acceder y activar el NPV, donde se localizan las neuronas CRF. Así, decidimos estudiar si las neuronas CRF y el eje HHA se activan en respuesta a ghrelina administrada ya sea en forma subcutánea, a dosis altas (a) o centralmente (b y c). También, decidimos estudiar si las neuronas CRF pueden responder directamente a ghrelina (d).

a) La administración periférica de ghrelina activa las neuronas de CRF del NPV y el HHA

Para determinar si ghrelina periférica activa las neuronas CRF y el eje HHA, inyectamos subcutáneamente ghrelina (0,6 nmol/g de peso corporal) o solución salina a ratones alimentados *ad libitum*. Utilizamos 3 animales por cada condición experimental. Luego de 120 minutos post-tratamiento anestesiamos los ratones, los perfundimos, obtuvimos sus cerebros, los cortamos en secciones coronales y realizamos una IHQ doble contra c-fos y contra CRF. En nuestras condiciones experimentales, detectamos 2962 ± 276 neuronas inmuno-reactivas para CRF en el NPV del ratón, con un diámetro citoplasmático promedio de $10,5 \pm 0,6$ μm . Encontramos neuronas en todo el eje rostral-caudal del NPV, con un enriquecimiento de las mismas en la parte compacta a nivel medial del núcleo. Encontramos el $67,4 \pm 1,8\%$ de todas las neuronas inmuno-reactivas para CRF en la parte compacta del NPV. Como mostramos anteriormente, ghrelina indujo un profundo aumento del número de células inmuno-reactivas para c-fos en el ARC, (Figura 15A-B) y en el NPV (Figura 15C-D), 120 minutos después de su administración periférica. Los ratones tratados con ghrelina mostraron un aumento significativo del porcentaje de neuronas inmuno-reactivas para CRF positivas para c-fos, particularmente en la parte compacta del NPV comparado a los animales tratados con vehículo (Figura 15E-F). En esta zona, el análisis cuantitativo indicó que $12,1 \pm 6,6\%$ de las células inmuno-reactivas para CRF fueron positivas para c-fos en los animales con vehículo. Por el contrario, $72,9 \pm 5,4\%$ de las células inmuno-reactivas para CRF fueron positivas para c-fos en los animales tratados con ghrelina ($p < 0.01$ vs el grupo tratado con

vehículo). Para determinar si la activación de las neuronas CRF inducida por ghrelina periférica depende de la ingesta de alimento, administramos subcutáneamente ghrelina en la dosis alta en ratones sin acceso a alimento y analizamos la activación de las neuronas CRF. Los ratones tratados con ghrelina que no tuvieron acceso al alimento tuvieron $64,1 \pm 6,3\%$ de células inmuno-reactivas para CRF positivas para c-fos en la parte compacta del NPV ($p < 0.01$ vs el grupo tratado con vehículo), sugiriendo que la activación de las neuronas CRF del NPV inducida por ghrelina es independiente de la ingesta de alimento. Por otro lado, cuantificamos la respuesta del eje HHA mediante la medición de glucocorticoides plasmáticos. Para esto, administramos subcutáneamente vehículo conteniendo o no ghrelina a la misma dosis en un grupo independiente de ratones y los sacrificamos por decapitación a los 15, 30, 60 y 120 minutos post-tratamiento. Utilizamos un total de 7 animales para cada condición experimental. La administración periférica de ghrelina produjo un aumento significativo de los niveles de corticosterona plasmática 60 minutos después del tratamiento a $10,3 \pm 2,4$ ng/ml, en comparación con los ratones tratados con vehículo que tuvieron $2,1 \pm 0,4$ ng/ml ($p < 0.01$). Asimismo, evaluamos la respuesta del eje HHA en ratones tratados con ghrelina y sin acceso al alimento. En este grupo de animales, los niveles de corticosterona plasmática también aumentaron 60 minutos después del tratamiento ($11,4 \pm 1,9$ ng/mL, $n=4$).

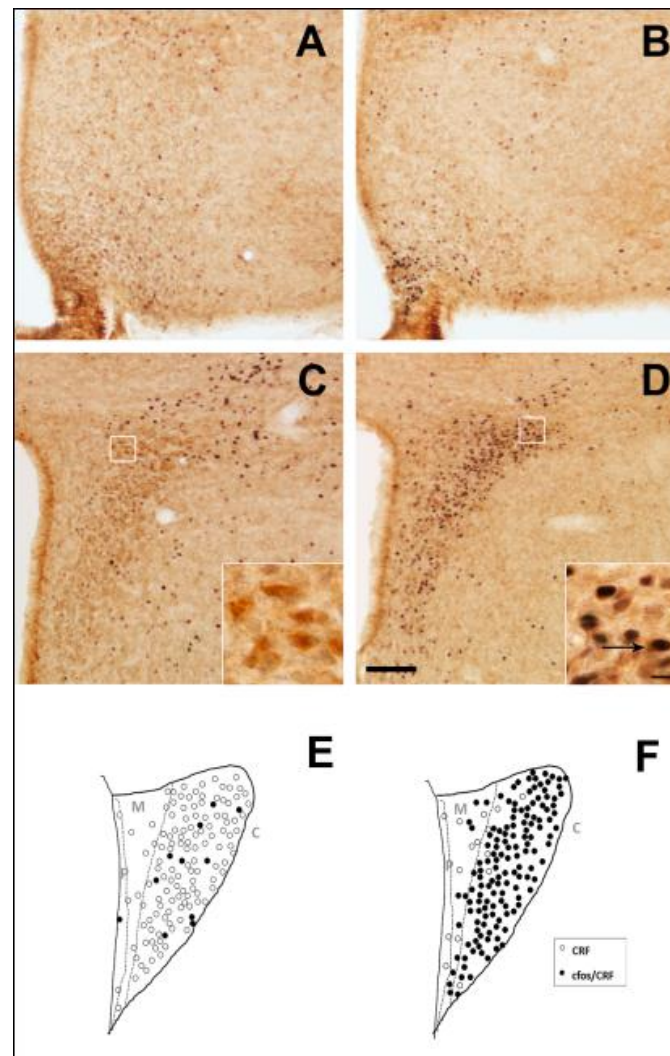


Figura 15. Los paneles A a D muestran microfotografías representativas de secciones de cerebros sometidas a doble IHQ utilizando anticuerpos anti-c-fos (coloración negro-violeta) y anti-CRF (tinción marrón). Los paneles superiores muestran el ARC y los paneles inferiores muestran el NPV. Imágenes de panel A y C son de ratones tratados con vehículo y las imágenes de panel B y D de ratones tratados con ghrelina. Insertos en las imágenes del NPV muestran a alta magnificación las áreas marcadas en imágenes a baja magnificación. La flecha indica las células doblemente positivas. Barras de escalas, 100 μm (baja magnificación), 10 μm (alta magnificación). Los paneles E y F muestran dibujos esquemáticos del nivel medio del NPV de ratones tratados con vehículo y ghrelina, respectivamente. Los símbolos en negro representan neuronas inmuno-reactivas para CRF positivas para c-fos, y los círculos abiertos indican sólo los cuerpos celulares inmuno-reactivos para CRF. Las letras de color gris indican las subdivisiones del NPV: P: periventricular; M: medial, C: compacta.

b) La administración ICV de ghrelina activa las neuronas de CRF del NPV y el eje HHA

Con el fin de descartar cualquier posible contribución de las acciones periféricas de ghrelina a nuestras observaciones y, como demostramos anteriormente, dado que ghrelina centralmente administrada tiene mayor accesibilidad a los núcleos cerebrales, estudiamos la respuesta de las neuronas CRF del NPV y el eje HHA a la administración ICV de la hormona. En estos

experimentos, inyectamos ratones alimentados *ad libitum* con ghrelina (0,6 nmoles/ratón, ICV) o con vehículo. Utilizamos 4 animales por cada condición experimental. Luego de 120 minutos post-tratamiento anestesiábamos a los ratones, los perfundimos, obtuvimos sus cerebros, cortamos en secciones coronales y realizamos una IHQ contra c-fos y contra CRF. Como esperábamos, la administración ICV de ghrelina aumentó el número de células inmuno-reactivas para c-fos en el ARC (Figura 16A-B). En la parte compacta del NPV, observamos un aumento significativo del porcentaje de neuronas inmuno-reactivas para CRF positivas para c-fos (Figura 16C-D). En esta parte, $10,4\pm 1,6\%$ de las células inmuno-reactivas para CRF fueron positivas para c-fos en los animales tratados con vehículo, mientras que el $72,2\pm 11,1\%$ de neuronas inmuno-reactivas para CRF fueron positivas para c-fos en los ratones tratados con ghrelina ($p < 0,01$ vs el grupo tratado con vehículo). Por otro lado, administramos ghrelina (0,6 nmol/ratón) en el ventrículo lateral de ratones sin acceso al alimento. Encontramos que el porcentaje de las neuronas inmuno-reactivas para CRF positivas para c-fos en el NPV aumentó en los ratones tratados centralmente con ghrelina que no tuvieron acceso al alimento ($87,6\pm 4,6\%$, $p < 0,01$ vs el grupo tratado con vehículo, $n=3$ por grupo). Por lo tanto, la activación de las neuronas CRF del NPV inducida por la administración ICV de ghrelina parece ser independiente del aumento en la ingesta de alimento, tal como observamos con la administración periférica de la hormona. Para un estudio más profundo del papel de la ghrelina sobre las neuronas productoras de CRF y para determinar específicamente la respuesta del eje HHA, sacrificamos un grupo independiente de animales a diferentes tiempos luego de la administración ICV de ghrelina y analizamos los cambios en la expresión génica de CRF y los niveles de corticosterona. Utilizamos un total de 5 animales por cada condición experimental. La ghrelina indujo un aumento significativo en la expresión de CRF en el NPV a los 15 y 30 minutos post-tratamiento (Figura 17A), el cual aumentó de $1,42\pm 0,09$ unidades relativas de ARNm de CRF en el control a $2,15\pm 0,24$ unidades relativas 15 minutos post-tratamiento con ghrelina ($p < 0,05$). Asimismo, la ghrelina indujo un aumento significativo en los niveles de corticosterona plasmática a los 15, 30 y 60 minutos post-tratamiento. Observamos la respuesta máxima a los 60 minutos después del tratamiento (Figura 17B), donde la corticosterona

plasmática fue de $8,7 \pm 1,5$ ng/ml en los ratones tratados con ghrelina y $1,7 \pm 0,4$ ng/ml en los ratones tratados con solución salina ($p < 0,05$).

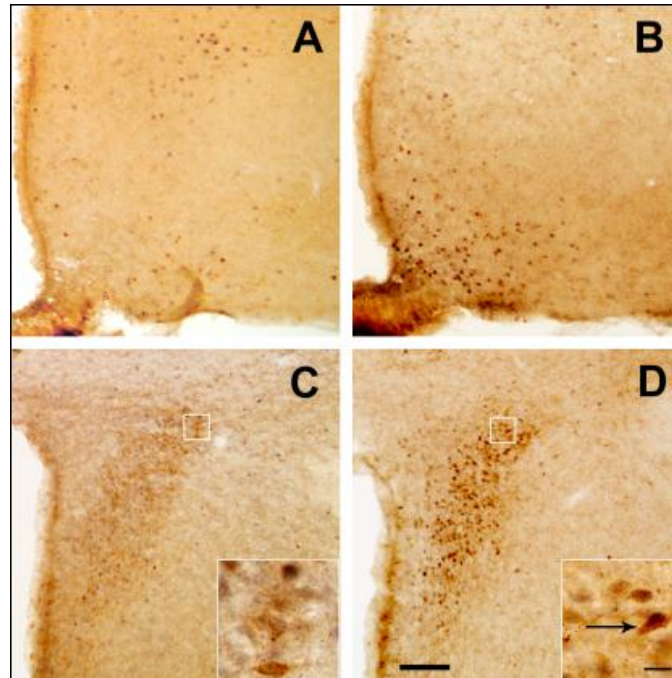


Figura 16. Los paneles muestran microfotografías representativas de secciones de cerebros sometidas a doble IHQ utilizando anticuerpos anti-c-fos (coloración negro-violeta) y anti-CRF (tinción marrón). Los paneles superiores muestran el ARC y los paneles inferiores muestran el NPV. Las imágenes de los panel A y C corresponden a ratones tratados con vehículo y las imágenes de panel B y D de ratones tratados con ghrelina. Insertos en imágenes del NPV muestran a mayor magnificación las áreas marcadas en las imágenes de baja magnificación. La flecha indican las células de doblemente positivas. Las barras de escala, 100 μ m (baja magnificación), 10 μ m (alto magnificación).

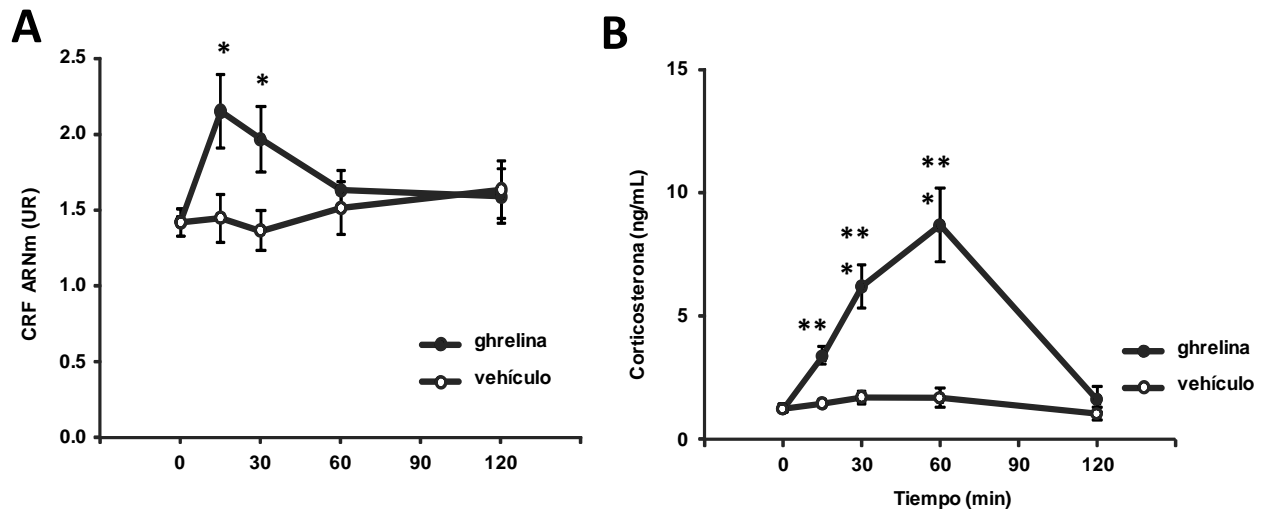


Figura 17. Panel A muestra los valores comparativos de RT-qPCR para el ARNm de CRF de micro-disecciones obtenidas del NPV de animales tratados con vehículo o con ghrelina y sacrificados a diferentes tiempos. Los datos se muestran como los niveles de ARNm de CRF en relación con el gen de la ciclofilina A. El panel B muestra los valores comparativos de corticosterona plasmática obtenidos a partir de ratones con vehículos o con ghrelina y sacrificados a diferentes tiempos. Los datos representan la media \pm SEM * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

c) La administración de ghrelina en el NPV activa las neuronas CRF y el eje HHA, sin afectar el consumo de alimento

Para determinar si la ghrelina puede activar la neuronas CRF independientemente de su acceso a otros núcleos cerebrales administramos ghrelina directamente en el NPV; para esto, implantamos una cánula guía permanente en el cerebro a través de la cual se puede introducir un inyector que queda ubicado a unos 500 μ m sobre el NPV (Figura 18A-B). El día experimental, inyectamos a los ratones alimentados *ad libitum* a través de estas cánulas con vehículo conteniendo o no ghrelina (0,03 nmol/cada NPV/ratón). Luego de 120 minutos post-tratamiento, perfundimos los animales y procesamos los cerebros para IHQ, como se detalla anteriormente. Agrupamos los ratones con las cánulas en posición correcta inyectados con vehículo o con ghrelina (n=3 y 4, respectivamente), mientras que los ratones con las cánulas en posición incorrecta inyectados con ghrelina los agrupamos por separado (n=3). La administración de ghrelina directamente en el NPV produjo un incremento masivo de neuronas inmuno-reactivas para c-fos exclusivamente en el NPV de los ratones tratados con ghrelina y las cánulas en posición correcta (Figura 18C-E). En contraste, no observamos neuronas inmuno-reactivas para c-

fos en el ARC de los animales tratados con ghrelina, sugiriendo que la infusión y difusión de ghrelina fue limitada al NPV (Figura 19B). La ghrelina indujo un incremento significativo en el porcentaje de neuronas inmuno-reactivas para CRF positivas para c-fos, en la zona compacta del NPV ($52\pm 4\%$; $p < 0.01$ vs el grupo tratado con vehículo Figura 19D). A pesar de la inducción de c-fos en el NPV, encontramos que la administración de ghrelina en el NPV no afectó la ingesta de alimento en comparación con los ratones tratados con vehículo o con los animales tratados con ghrelina pero con las cánulas en posición incorrecta. Para determinar la respuesta del eje HHA, sacrificamos a un grupo independiente de animales a los 30 minutos luego de la administración de vehículo o ghrelina en el NPV y analizamos los cambios en la expresión génica de CRF y los niveles de corticosterona. Utilizamos un total de 4 animales por cada condición experimental. La ghrelina administrada en el NPV indujo un aumento significativo en la expresión de CRF en el NPV a los 30 minutos post-tratamiento en los animales con las cánulas en posición correcta ($2,13\pm 0,29$ UR), comparado con los animales inyectados con vehículo ($1,32\pm 0,10$ UR) y con los animales inyectados con ghrelina pero con las cánulas en posición incorrecta ($1,24\pm 0,13$ UR) ($p < 0.05$; Figura 20A). Asimismo, la ghrelina indujo un aumento significativo en los niveles de corticosterona a los 30 minutos post-tratamiento en los animales con las cánulas en posición correcta ($7,1\pm 1,5$ ng/ml), comparado con los animales inyectados con vehículo ($1,5\pm 0,2$ ng/ml) y con los animales inyectados con ghrelina pero las cánulas en posición incorrecta ($2,1\pm 0,5$ ng/ml) ($p < 0.05$; Figura 20B).

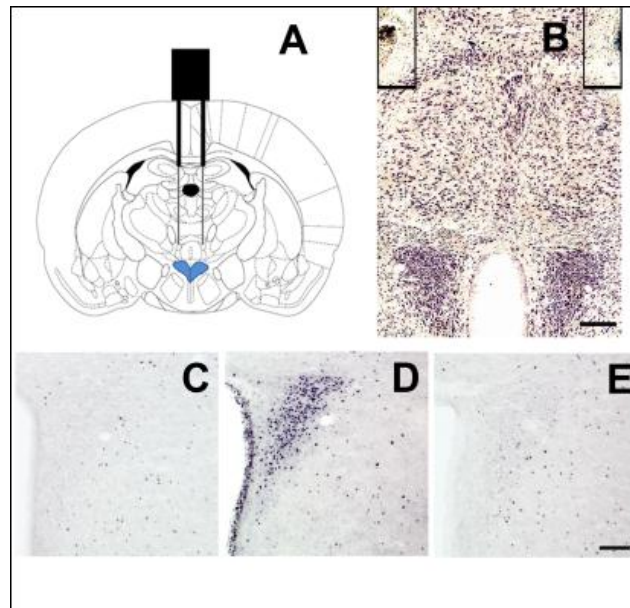


Figura 18. El panel A muestra un diagrama esquemático de una sección coronal de cerebro de ratón con una cánula implantada correctamente (negro). Esta estrategia experimental nos permitió administrar vehículo conteniendo o no ghrelina, 500 μm por encima del NPV (azul) a través del inyector de la cánula (gris). Panel B, microfotografía representativa de la coloración de Nissl mostrando la zona de entrada de la cánula (recuadros) sobre ambos NPV. Paneles C, D y E muestran microfotografías representativas de secciones de cerebro, que contienen el NPV, sometidos a una IHQ utilizando anticuerpos anti-c-fos (coloración negro-violeta) en "animales tratados con solución salina", "animales tratados con ghrelina y las cánulas en posición correcta" y "animales tratados con ghrelina y las cánulas en posición incorrecta", respectivamente. Barra de escala 100 μm .

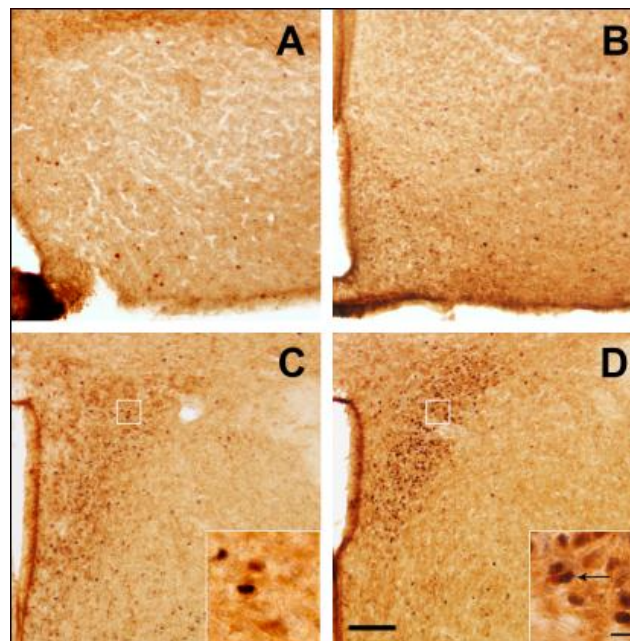


Figura 19. Los paneles A a B muestran microfotografías representativas de secciones de cerebros sometidas a doble IHQ utilizando anticuerpos anti-c-fos (coloración negro-violeta) y anti-CRF (coloración marrón). Los paneles superiores muestran el ARC y los paneles inferiores muestran el NPV. Imágenes de panel A y C son de ratones tratados con vehículo y las imágenes de panel B y D animales tratados con ghrelina. Insertos en C y D muestran a mayor aumento las áreas marcadas en imágenes de baja magnificación. La flecha señala células doblemente positivas. Barras de escala, 100 μm (baja magnificación), 10 μm (mayor magnificación).

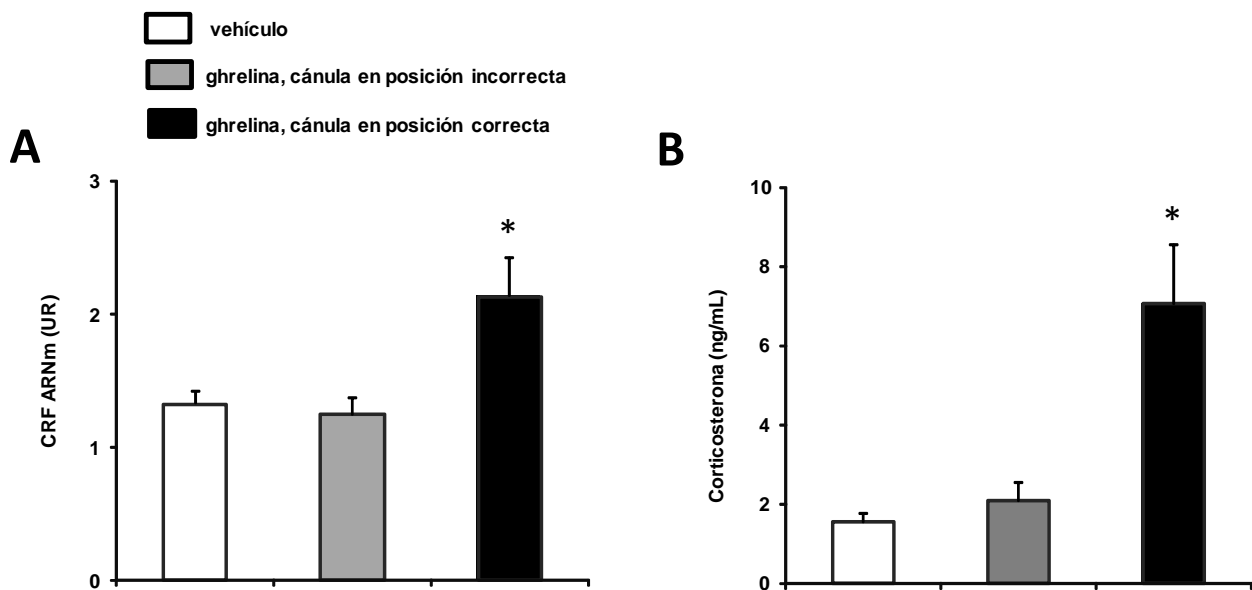


Figura 20. Panel A muestra los valores comparativos de RT-qPCR para el ARNm de CRF de micro-disecciones obtenidas del NPV de animales tratados en el NPV con vehículo o con ghrelina y sacrificados a los 30 minutos. Los datos se muestran como los niveles de ARNm de CRF en relación con el gen de la ciclofilina A. El panel B muestra los valores comparativos de corticosterona plasmática obtenidos a partir de ratones tratados en el NPV con vehículos o con ghrelina y sacrificados a los 30 minutos. Los datos representan la media \pm SEM * $p < 0.05$.

d) La activación del eje HHA inducida por ghrelina no ocurre vía acción directa en neuronas CRF del NPV

Para determinar si las neuronas CRF pueden responder directamente a ghrelina primero analizamos la inmuno-reactividad para fluoresceína en el NPV de ratones inyectados con F-ghrelina en el ventrículo lateral. Casi no encontramos células inmuno-reactivas para fluoresceína en la zona compacta del NPV (Figura 21). Sin embargo, encontramos abundante inmuno-reactividad para fluoresceína con un perfil punteado compatible con señal presináptica en el NPV (ver inserto en Figura 21). Luego, estudiamos la unión de ghrelina incubada directamente con las secciones coronales de cerebro de ratón para descartar que la falta de células, observada en los experimentos descritos previamente, se deba a falta de accesibilidad de la hormona al NPV. En estas condiciones experimentales y en forma similar a lo observado en animales inyectados en el ventrículo lateral con F-ghrelina, casi no se encontraron células que unieran ghrelina en la zona compacta del NPV. Por lo que concluimos que la falta de unión de ghrelina al NPV se debe a que

las células presentes en el mismo no unen ghrelina y no a una falta de accesibilidad de la hormona a esta zona del hipotálamo.

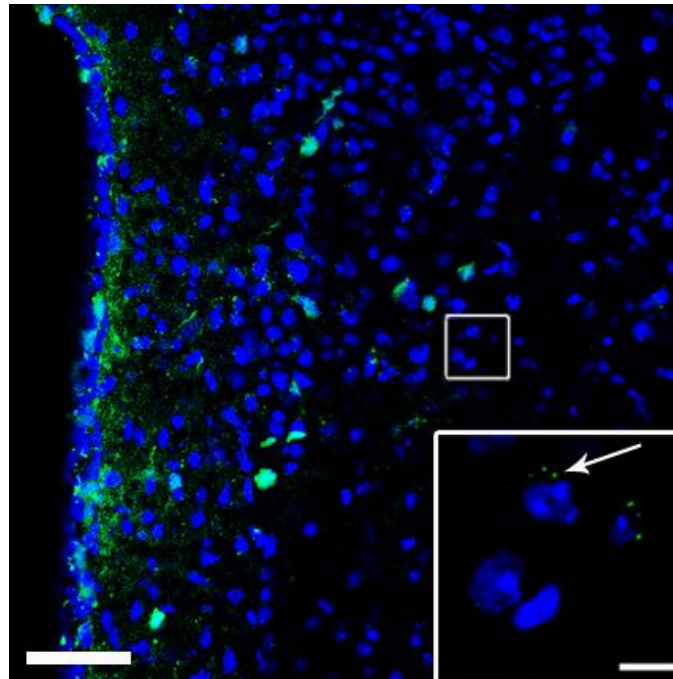


Figura 21. Esta figura muestra una microfotografía representativa de F-ghrelina (verde) en el NPV de ratones inyectados en el ventrículo lateral con F-ghrelina. Señal azul: DAPI. Inserto muestra a mayor aumento el área marcada en imágenes de memoria. La flecha señala puntos con perfil presináptico inmovilizado para fluoresceína. Barras de escala, 60 μm (baja magnificación), 10 μm (mayor magnificación).

Para analizar si las neuronas CRF expresan el receptor de ghrelina realizamos una histoquímica de hibridación *in situ* para ARNm del GHSR en secciones de cerebro de ratones. En primera instancia confirmamos resultados previos, ya que observamos abundante unión de la sonda para GHSR en toda la región rostral-caudal del núcleo ARC ([Figura 22A](#)). Por el contrario, en la zona compacta del NPV encontramos pocas células positivas para el ARNm de GHSR ([Figura 22B](#)). En las coloraciones de Nissl encontramos que menos del 5% de todas las células presentes en la parte compacta del NPV fueron positivas para GHSR. Para determinar si las neuronas CRF expresan el receptor de ghrelina realizamos una combinación de histoquímica de hibridación *in situ* para ARNm del GHSR e IHQ para CRF. Nuevamente, encontramos abundante señal de GHSR en el ARC ([Figura 22C](#)) y mínima en la parte compacta del NPV donde no detectamos ninguna célula inmuno-reactiva para CRF y para ARNm de GHSR ([Figura 22D](#)).

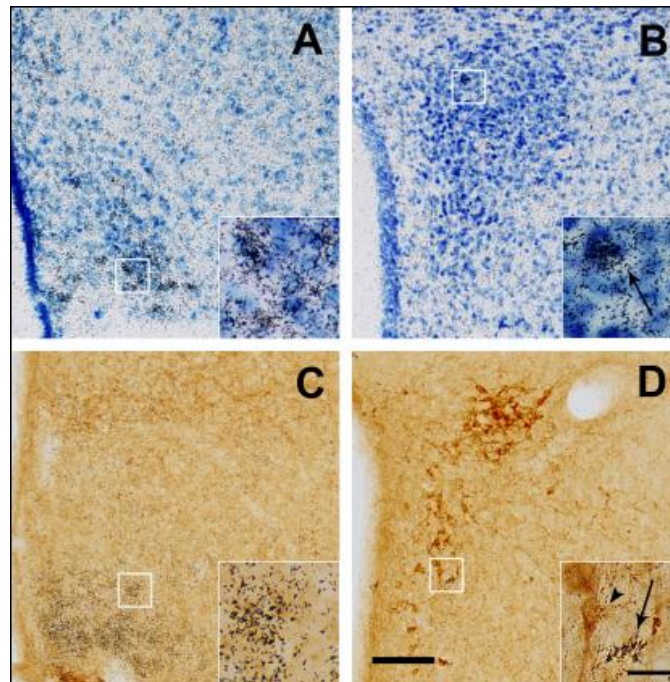


Figura 22. Los paneles superiores muestran microfotografías representativas de histoquímica de hibridación *in situ* con contratinción de tiónina en secciones coronales de cerebro de ratón. Paneles A y B muestran el ARC y el NPV, respectivamente. Gránulos negros de plata representan la unión de la ribosonda antisentido para GHSR. Paneles inferiores muestran microfotografías representativas de histoquímica de hibridación *in situ* para GHSR (gránulos negros de plata) e IHQ para CRF (tinción marrón) en secciones coronales de cerebro de ratón. Panel C y D muestran el ARC y el NPV, respectivamente. Insertos en cada imagen muestran a mayor magnificación las áreas marcadas en imágenes de baja magnificación. Las flechas señalan células marcadas con la ribosonda para GHSR. La cabeza de flecha señala células immuno-reactivas para CRF. Barras de escala, 100 μm (baja magnificación), 10 μm (mayor magnificación).

3- Estudio de los circuitos neuronales por el cual ghrelina activa las neuronas CRF

Los resultados presentados en los capítulos anteriores de esta Tesis Doctoral demuestran que las neuronas CRF del NPV no expresan GHSR y que la administración de ghrelina directamente en este núcleo hipotalámico es suficiente para activar las neuronas CRF, sugiriendo que el mecanismo por el cual la ghrelina activa estas neuronas es indirecto y local. Por otro lado, demostramos que el núcleo ARC es la zona del cerebro más sensible a ghrelina periférica y la que presenta la mayor accesibilidad a la hormona periférica. Entre las neuronas del ARC, las productoras de NPY son reconocidas por expresar altos niveles de GHSR y además por inervar a las neuronas CRF del NPV. Con el objetivo de establecer si la activación de las neuronas NPY del ARC es necesaria para mediar los efectos de la ghrelina sobre las neuronas CRF, decidimos evaluar si estas neuronas se activan en animales con el bloqueo farmacológico de la acción de NPY (a) o en animales con el núcleo ARC lesionado (b). Como se describe en la introducción,

otro importante mecanismo de regulación de las neuronas CRF del NPV está dado por el tono GABAérgico, dado que más del 50% de las inervaciones del NPV contienen GABA. Dado que en el segundo capítulo de esta Tesis Doctoral demostramos que la unión de F-ghrelina ocurre en las terminales que inervan el NPV, decidimos estudiar también si ghrelina activa las neuronas CRF mediante la inhibición del tono GABAérgico local (c).

a) La acción de NPY no es necesaria para que ghrelina active las neuronas CRF

Para determinar si el NPY es necesario para que la ghrelina active las neuronas CRF del NPV estudiamos la respuesta de estas neuronas a la administración ICV de ghrelina en presencia de antagonistas específicos de los receptores de NPY. En primera instancia evaluamos la dosis de los antagonistas de los receptores de NPY (BIBO3304 y CGP71683) a utilizar en nuestros experimentos. Para esto, ayunamos a un grupo de ratones durante 18 hs y la mañana del día experimental, los inyectamos en forma ICV con vehículo (n=3) conteniendo o no diferentes dosis de los antagonistas del receptor de NPY. Testeamos 4 dosis: 25/12,5 (n=2), 5/2,5 (n=2), 2/2 (n=3) y 1/1 (n=3) $\mu\text{g}/\text{ratón}$ de BIBO3304/CGP71683; respectivamente. Luego de la inyección dejamos que los animales tuvieran libre acceso a alimento y cuantificamos la ingesta de alimento durante 120 minutos post-tratamiento. Todas las dosis testeadas de los antagonistas del receptor del NPY redujeron la hiperfagia que se observa en respuesta al ayuno. La dosis de 1 μg de BIBO3304 y CGP71683 por ratón produjo una disminución del $68,2 \pm 16,5\%$ de la ingesta de alimento, en comparación con los ratones tratados con vehículo ($p < 0.05$). Es importante destacar, que la disminución de la hiperfagia inducida por ayuno fue de magnitud estadísticamente similar en los animales tratados con las diferentes dosis de los antagonistas del receptor de NPY. Por lo tanto, continuamos nuestros experimentos utilizando esta dosis de BIBO3304 y CGP71683. En segunda instancia, inyectamos vehículo conteniendo o no 1 $\mu\text{g}/\text{ratón}$ de BIBO3304 y CGP71683 en el ventrículo lateral de un grupo independiente de ratones y evaluamos la inducción de c-fos (n=2 por condición experimental). Encontramos que la administración ICV de esta dosis de BIBO3304 y CGP71683 no produjo aumento en el número de células inmuno-reactivas para c-fos en el NPV en comparación con el grupo control. Por lo tanto, la respuesta de las neuronas CRF a ghrelina se

estudió en presencia de 1 μg de BIBO3304 y 1 μg de CGP71683 por ratón, ya que fue la menor dosis de antagonistas que redujo la hiperfagia inducida por ayuno sin producir inducción de c-fos, en nuestras condiciones experimentales.

En un grupo independiente de ratones, inyectamos vehículo conteniendo o no una combinación de los antagonistas del receptor de NPY en el ventrículo lateral y 30 minutos más tarde, ghrelina (0,6 nmol/ratón). Utilizamos un total de 4 animales por cada condición experimental. Encontramos que el bloqueo farmacológico de la acción de NPY disminuyó en un $40,5\pm 4,1\%$ la ingesta de alimento inducida por ghrelina, en comparación con los ratones tratados con ghrelina únicamente ($p < 0.05$) (Figura 23). En la parte compacta del NPV, encontramos que 39 ± 11 células/sección fueron positivas para c-fos en los animales tratados con vehículo, mientras que 197 ± 47 células/sección fueron positivas para c-fos en los animales tratados con ghrelina únicamente ($p < 0.01$). En la parte compacta del NPV de los ratones con bloqueo farmacológico de la acción de NPY, encontramos que 50 ± 13 células/sección fueron positivas para c-fos en los animales tratados con vehículo, mientras que 159 ± 50 células/sección fueron positivas para c-fos en los animales tratados con ghrelina ($p < 0.01$). El número de células inmuno-reactivas para c-fos en el NPV de animales tratados con ghrelina con o sin bloqueo de la acción de NPY no fue estadísticamente diferente (Figura 24). Asimismo, encontramos que el bloqueo farmacológico de NPY no afectó el porcentaje de células inmuno-reactivas para CRF positivas para c-fos en la parte compacta del NPV de los grupos tratados con vehículos y los tratados con ghrelina (Figura 25).

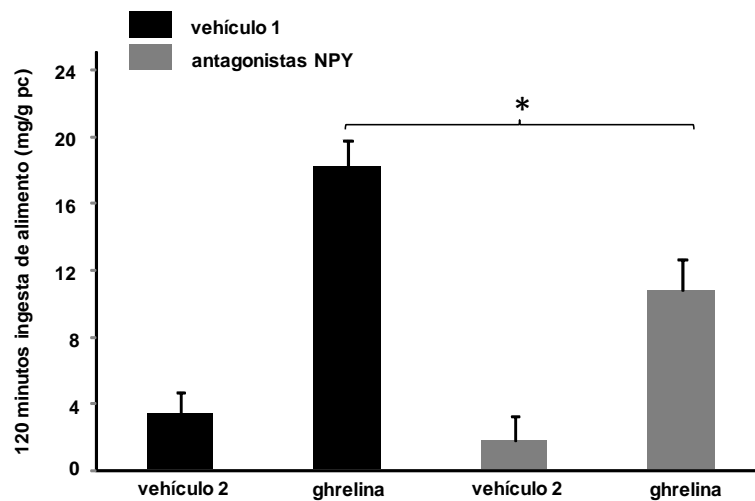


Figura 23. Ingesta de alimento en ratones inyectados en el ventrículo lateral inicialmente con vehículo 1 (DMSO 4% en solución salina) conteniendo o no una combinación de los antagonistas específicos del receptor Y-1 e Y-5 de NPY (BIBO3304 y CGP71683, respectivamente, 1 µg de cada uno/ratón) y, 30 minutos más tarde, inyectados en el ventrículo lateral con vehículo 2 (solución salina) conteniendo o no ghrelina (0,6 nmol / ratón). *p≤0.05. pc: peso corporal.

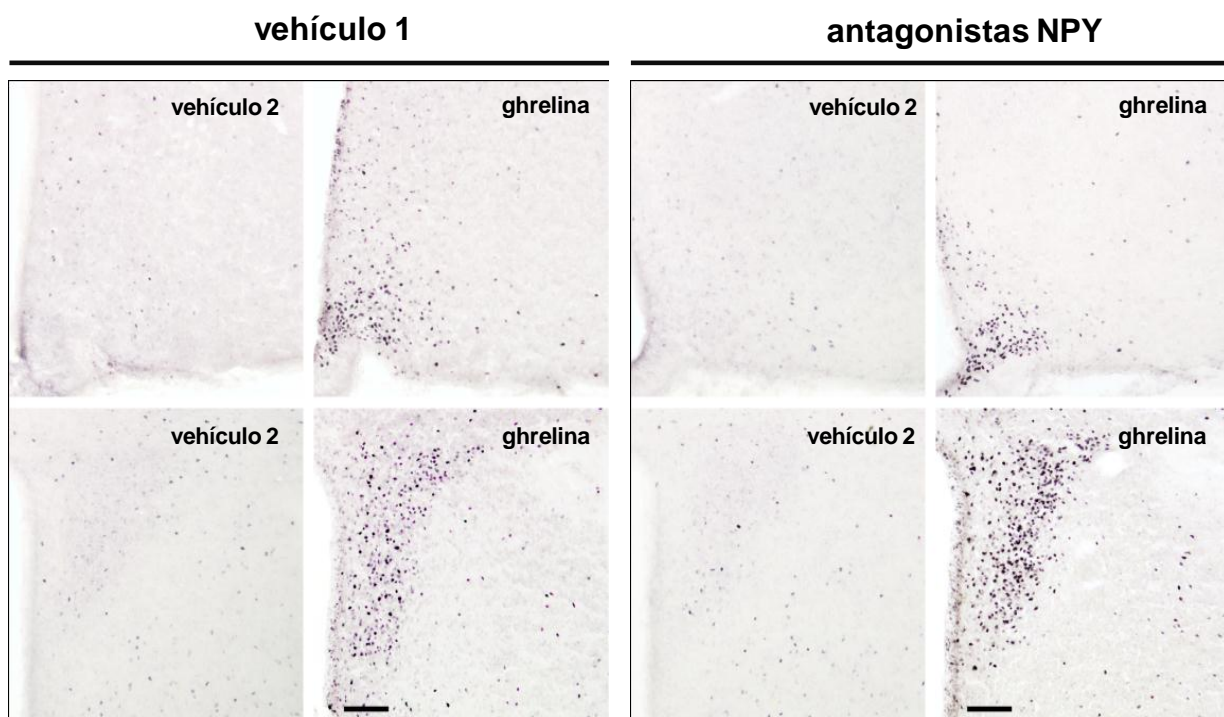


Figura 24. Los paneles muestran microfotografías representativas de secciones de cerebro sometidas a IHQ para c-fos (señal de color negro-violeta). Los ratones inicialmente fueron inyectados en el ventrículo lateral con vehículo 1 (DMSO 4% en solución salina) o con antagonistas selectivos de los receptores del NPY y posteriormente con vehículo 2 (solución salina) o con ghrelina. Las microfotografías muestran el ARC (superior) y NPV (inferior) en ratones tratados con vehículo, panel de microfotografías a la izquierda, o con antagonistas del NPY, paneles de microfotografías a la derecha. Barra de escala 100 µm.

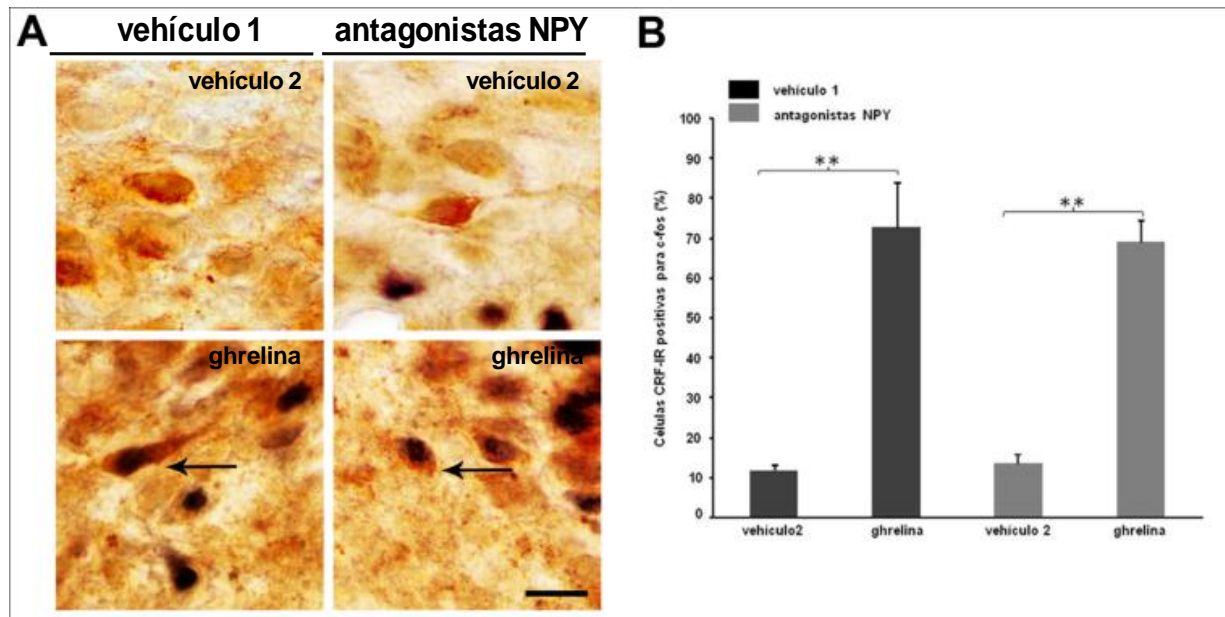


Figura 25. El panel A muestra microfotografías representativas de la parte compacta del NPV de secciones de cerebros sometidas a doble IHQ para c-fos (señal de color negro-violeta) y CRF (señal marrón). Los ratones inicialmente fueron inyectados en el ventrículo lateral con vehículo 1 (DMSO 4% en solución salina) o con antagonistas selectivos de los receptores del NPY y posteriormente con vehículo 2 (solución salina) o con ghrelina. Las flechas señalan a las células doblemente positivas. Barra de escala: 10 μ m. El panel B muestra el análisis cuantitativo de las células inmunoreactivas para CRF positivas para c-fos en la parte compacta del NPV. ** $p \leq 0.01$.

b) El núcleo ARC no es necesario para que ghrelina active las neuronas CRF del NPV

Para evaluar la importancia del ARC en la activación de las neuronas CRF inducida por ghrelina, realizamos una lesión neurotóxica del núcleo ARC. Estos estudios los realizamos con ratones de 7 a 9 semanas de edad, antes de que los animales con el ARC lesionado desarrollen anomalías del balance energético. En efecto, la lesión del ARC no afectó el peso corporal ($23,9 \pm 0,5$ vs. $24,9 \pm 0,6$ g en ratones controles; $n=4$ por grupo) ni el consumo nocturno de alimento (136 ± 3 vs. 154 ± 14 mg/g peso corporal, en ratones controles) a la edad en estudio. Luego evaluamos la extensión de la lesión mediante la coloración de Nissl y mediante IHQ contra NPY las cuales nos permitieron determinar que el glutamato mono sódico produjo lesión neurotóxica específica en el ARC, manteniéndose intacto la morfología del NPV y demás áreas cerebrales (Figura 26 y Figura 27). En el análisis cuantitativo de la coloración de Nissl encontramos que los ratones tratados con glutamato mono sódico tuvieron una disminución significativa del número de células en el ARC (77 ± 14 y 244 ± 12 células/sección, $p < 0.05$ comparado con el grupo control; $n=4$ por grupo); mientras que el número de células en el NPV

no fue afectado (193 ± 13 vs. 209 ± 31 células/sección para el NPV de ratones con el ARC lesionado y controles, respectivamente, $p = ns$; $n = 4$ por grupo). En el ARC de ratones con el núcleo ARC lesionado, encontramos un $17,7 \pm 7,5$ % de intensidad de señal inmuno-reactiva para NPY comparado con los ratones control ($100,0 \pm 8,0$ %, $p < 0,05$; $n = 4$ por grupo). En el NPV de ratones con el núcleo ARC lesionado encontramos un $38,4 \pm 4,9$ % de intensidad de señal inmuno-reactiva para NPY comparado con los ratones control ($100,0 \pm 26,9$ %, $p < 0,05$; $n = 4$ por grupo).

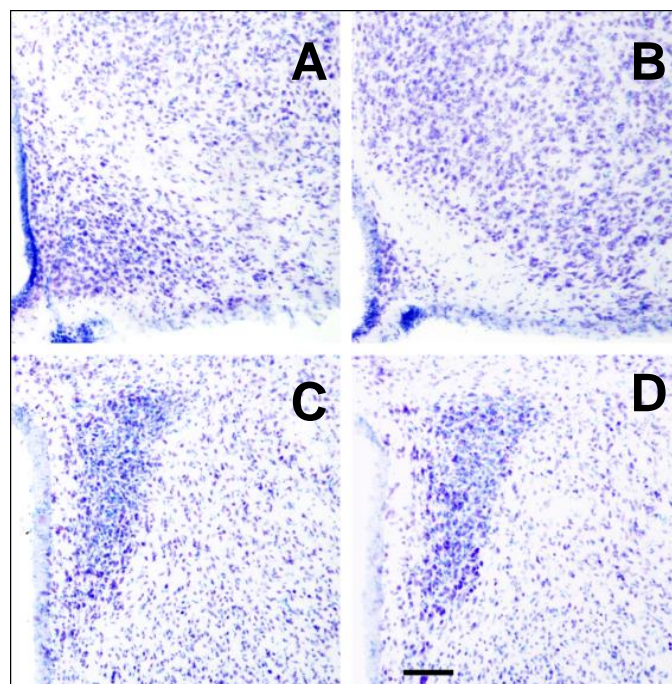


Figura 26. Conjunto de paneles muestran microfotografías representativas de secciones de cerebro sometidas a tinción de Nissl. Paneles superiores muestran el ARC y las imágenes inferiores muestran el NPV. A y C son microfotografías representativas de los ratones control, B y D microfotografías representativas de los ratones con lesión del núcleo ARC. Barra de escala: 100 μ m.

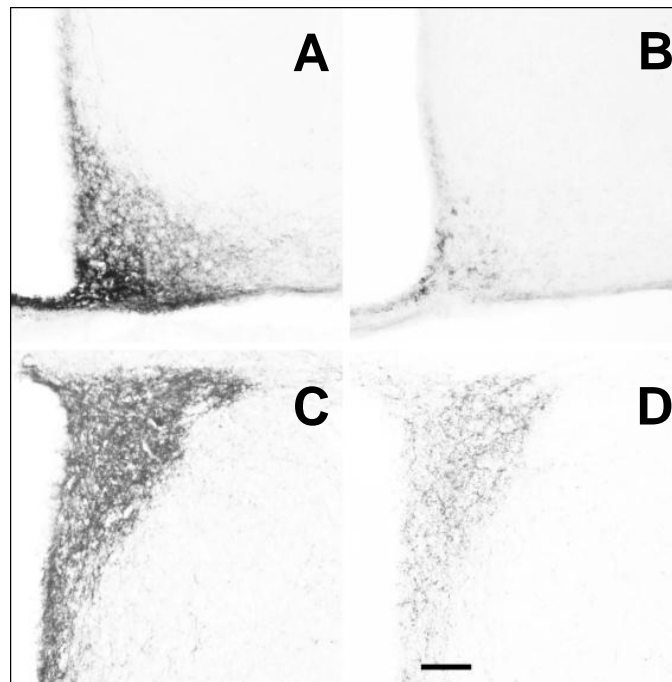


Figura 27. Conjunto de paneles muestran microfotografías representativas de secciones de cerebro sometidas a IHQ para NPY (coloración negro-violeta). Paneles superiores muestran el ARC y las imágenes inferiores muestran el NPV. A y C son microfotografías representativas de los ratones control, B y D microfotografías representativas de los ratones con lesión del ARC. Barra de escala: 100 μ m

Para determinar si las neuronas del núcleo ARC median en la activación de las neuronas CRF inducida por ghrelina, evaluamos la respuesta a esta hormona en ratones con el núcleo ARC lesionado. Para esto, inyectamos vehículo conteniendo o no ghrelina (0,6 nmol/ratón) en el ventrículo lateral de ratones con el ARC lesionado. Utilizamos un total de 14 animales, 5 ratones inyectados con vehículo y 9 con ghrelina. Los ratones con el ARC lesionado aumentaron la ingesta de alimento cuando la ghrelina fue inyectada centralmente ($13,2 \pm 2,2$ g; $p < 0.05$ comparado con los animales tratados con vehículo, [Figura 28](#)). Con respecto a la inducción de c-fos, encontramos que ghrelina no aumentó el número de células inmuno-reactivas para c-fos en el núcleo ARC de los animales tratados con glutamato mono sódico como se observa en la [Figura 29](#). Por el contrario, la lesión del ARC no afectó el número basal de células positivas para c-fos en la parte compacta del NPV ni el número de células positivas para c-fos detectado en animales tratados con ghrelina (20 ± 12 y 115 ± 31 células/sección, respectivamente) cuando estos valores son comparados con el nivel basal y estimulado observado en animales control tratados con vehículo y ghrelina (34 ± 19 y 199 ± 46 células/sección, respectivamente). Asimismo, la lesión del

ARC no afectó el porcentaje de células inmuno-reactivas para CRF positivas para c-fos que se observa en respuesta a ghrelina ICV (Figura 30).

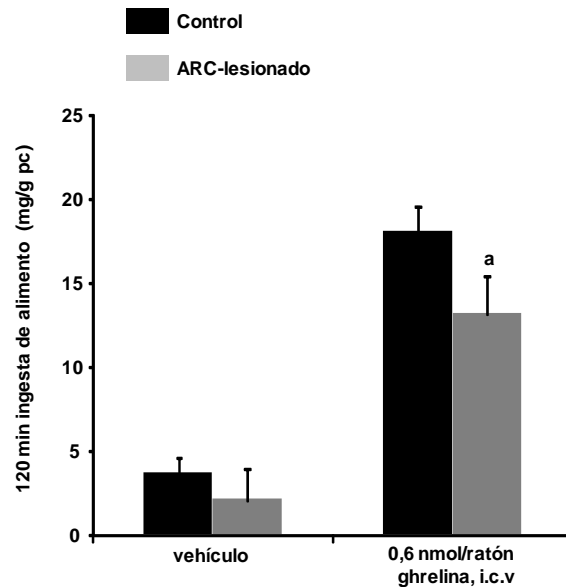


Figura 28. Panel A muestra el consumo de alimento en 120 minutos en ratones controles y con el ARC lesionado inyectados en el ventrículo lateral con vehículo o con ghrelina alimentados *ad libitum*. Los datos representan la media±SEM. a, $p < 0.05$ vs. grupo ARC-lesionado tratado con vehículo. pc: peso corporal.

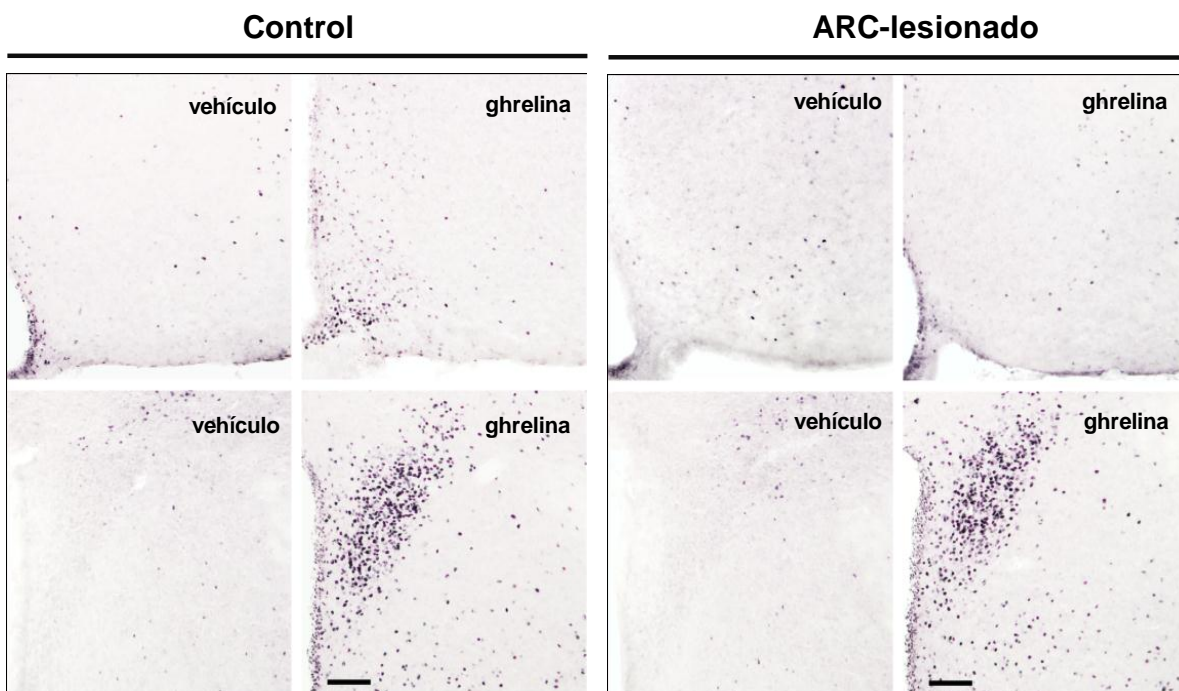


Figura 29. Paneles muestran microfotografías representativas de secciones de cerebros sometidas a IHQ para c-fos (señal negro-violeta) de ratones controles o con el núcleo ARC lesionado. Ambos grupos de ratones fueron inyectados en el ventrículo lateral con vehículo o con ghrelina. Los paneles superiores muestran el ARC y los paneles inferiores muestran el NPV. Barra de escala: 100 μ m.

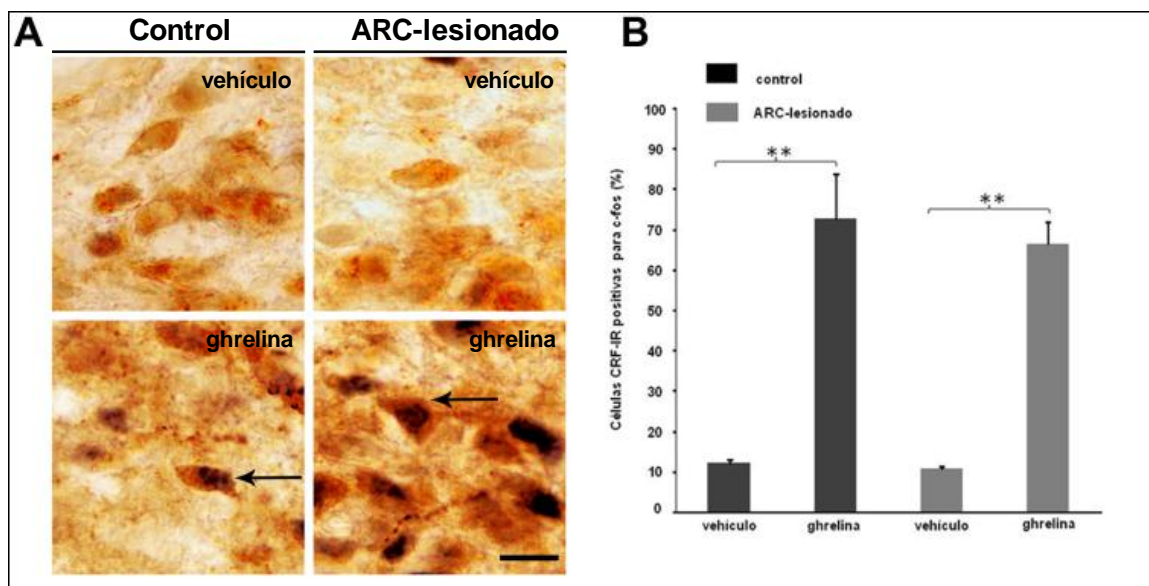


Figura 30. Panel A muestra microfotografías representativas de la parte compacta del NPV de secciones de cerebro sometidos a doble IHQ para c-fos (señal de color negro-violeta) y para CRF (señal de color marrón) de ratones control y con el núcleo ARC lesionado. Ambos grupos de ratones fueron inyectados en el ventrículo lateral con vehículo o con ghrelina. Las flechas señalan las células doblemente positivas. Barra de escala: 10 μ m. Panel B muestra el análisis cuantitativo de células inmuno-reactivas para CRF positivas para c-fos en la parte compacta del NPV. Los datos representan la media \pm SEM. ** $p \leq 0.01$.

c) Ghrelina activa las neuronas CRF del NPV a través de un circuito local que involucraría la inhibición del tono GABAérgico local

Para determinar si ghrelina activa las neuronas CRF del NPV a través de la regulación del tono GABAérgico local; decidimos evaluar si las terminales del NPV que unen ghrelina son GABAérgicas. Para esto, realizamos una IHQ doble para fluoresceína y GAD67 en secciones de cerebros de ratones inyectados en el ventrículo lateral con F-ghrelina ($n=4$). Como muestra la [Figura 31](#), encontramos que la unión de F-ghrelina se da con perfil puntuado compatible con una localización pre-sináptica en las terminales GABAérgicas que inervan las neuronas en la parte compacta del NPV. Mediante el análisis cuantitativo, encontramos que el $88,1 \pm 5,7$ % de la señal con perfil puntuada inmuno-reactiva para GAD67 co-localiza con señal con perfil puntuada inmuno-reactividad para fluoresceína en el NPV. Por el contrario, F-ghrelina se une exclusivamente a terminales inmuno-reactivos para GAD67, ya que no encontramos señal con perfil puntuada de F-ghrelina en sitios sin señal para GAD67.

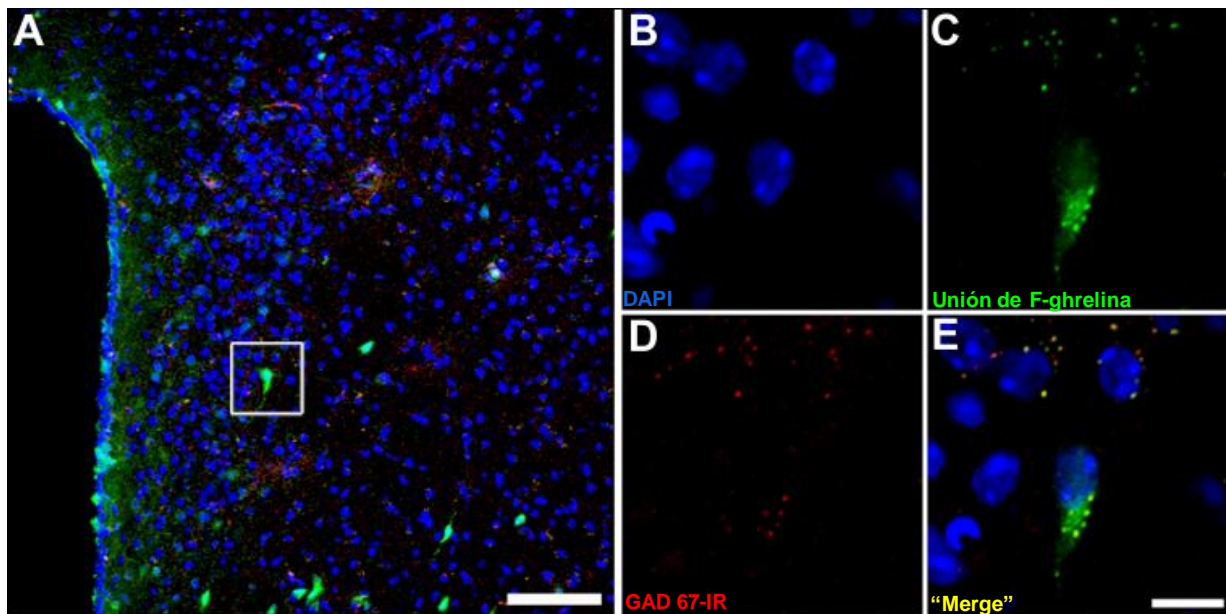


Figura 31. Esta figura muestra microfotografías representativas de F-ghrelina (verde) en terminales inmuno-reactivas para GAD67 (rojo) que inervan las neuronas en la parte compacta del NPV. Imagen A "merge" a menor magnificación; imágenes B, C, D y E muestran la señal para DAPI, señal inmuno-reactiva para fluoresceína-, señal inmuno-reactiva para GAD 67-IR y el "merge", respectivamente, a mayor magnificación. Barras de escala, 100 μm (baja magnificación), 10 μm (mayor magnificación).

Posteriormente, evaluamos la activación de las neuronas CRF inducida por ghrelina en presencia de muscimol, un agonista selectivo del receptor GABA_A . Para esto, administramos vehículo conteniendo o no 500 ng/ratón de muscimol en el NPV y 2 minutos después inyectamos vehículo conteniendo o no ghrelina (0,6 nmol/ratón) en el ventrículo lateral. La dosis de muscimol utilizada se eligió en base a referencias bibliográficas [13] y a que fue la menor dosis testada de muscimol que no produjo inducción de c-fos en el NPV, en nuestras condiciones experimentales. Para este experimento, utilizamos 4 animales por cada condición experimental. La administración de muscimol en el NPV no afectó el número de células inmuno-reactivas para c-fos en el ARC de los animales tratados con ghrelina, sugiriendo que la infusión y difusión de muscimol fue limitada al NPV (Figura 32A). Por el contrario, el pre-tratamiento con muscimol inhibió significativamente la activación de las neuronas CRF inducida por ghrelina. El análisis cuantitativo mostró que $36,2 \pm 5,1$ % de células inmuno-reactivas para CRF del NPV fueron positivas para c-fos en los animales inyectados en el NPV con muscimol, mientras que el $71,2 \pm 10,3$ % de neuronas inmuno-reactivas

para CRF fueron positivas para c-fos en los ratones tratados con ghrelina únicamente ($p \leq 0.05$) (Figura 32B).

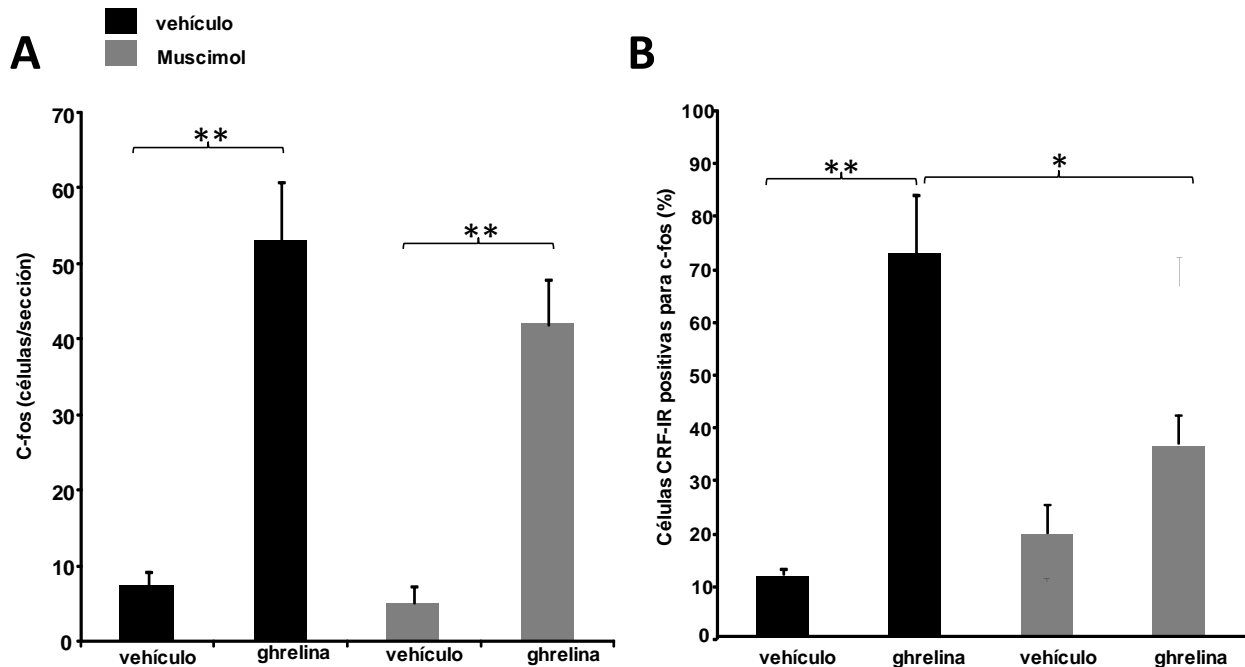


Figura 32. Panel A y B muestran el análisis cuantitativo de células inmuno-reactivas para c-fos en el ARC y células inmuno-reactivas para CRF positivas para c-fos en el NPV para todos los grupos experimentales, respectivamente. $**p \leq 0,01$.

Así, los resultados *in vivo* sugieren que ghrelina podría requerir la inhibición de la secreción de GABA en el NPV para estimular las neuronas CRF. Con el objetivo de testear directamente esta posibilidad decidimos establecer un modelo *ex vivo* para cuantificar la secreción de GABA y estudiar si ghrelina regula la secreción de GABA en el NPV. Para esto evaluamos la secreción basal y estimulada de $[3H]GABA$ en explantes del NPV en ausencia (control) o presencia de ghrelina. Utilizamos 5 explantes del NPV por cada condición experimental. En nuestras condiciones experimentales, encontramos que la despolarización inducida por cloruro de potasio 56 mM causa un incremento de la secreción de GABA de $1,35 \pm 0,05$ veces, respecto a la secreción basal ($p \leq 0,05$). Por el contrario, la presencia de ghrelina en el medio de incubación redujo el nivel de estímulo a $1,11 \pm 0,09$ (Figura 33).

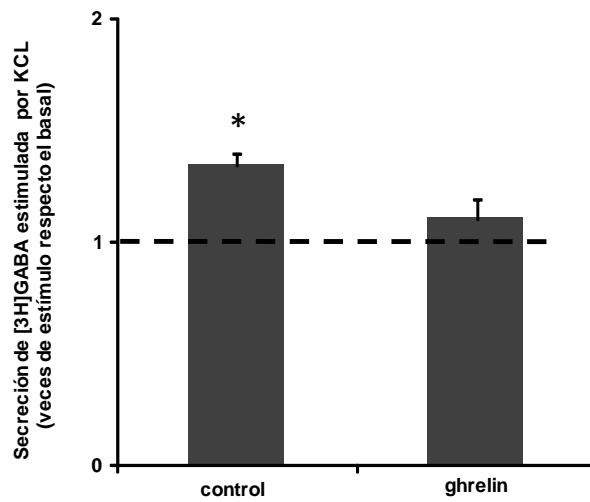


Figura 33. Esta figura representa la secreción de [3H]GABA en explantes del NPV estimulada por KCl respecto a la basal en ausencia (control) o presencia de ghrelina. Los datos representan la media \pm SEM * $p \leq 0,05$. Vs secreción basal.

1- Núcleos cerebrales que responden a la ghrelina periférica y central

Como describimos en la introducción de esta Tesis Doctoral, los niveles de ghrelina plasmática aumentan en situaciones de balance energético negativo o en situaciones de estrés, estas variaciones probablemente jueguen un papel importante en la regulación de la homeostasis energética. Los protocolos experimentales que incluyen administración periférica de ghrelina simulan los aumentos fisiológicos de la hormona en plasma. En particular, la dosis baja de ghrelina periférica indujo un incremento de dos veces en la ghrelina plasmática, similar al incremento observado en ratones expuestos a 12-24 hs de ayuno o expuestos a estrés [133, 134]. La dosis alta de ghrelina periférica indujo un incremento de 17 veces en la ghrelina plasmática, la cual es demasiado alta para la mayoría de las condiciones fisiológicas. Sin embargo, un estudio reciente mostró que los ratones sujetos a deprivación calórica crónica (ingesta del 40% de las calorías diarias, durante 8 días), desarrollan un progresivo aumento de los niveles de ghrelina plasmáticos incrementándose de entre 12 a 18 veces más que en los animales alimentados *ad libitum* [70]. Así, la dosis baja de ghrelina que utilizamos imita varias situaciones fisiológicas en las cuales la ghrelina aumenta, mientras que la dosis alta de ghrelina simula alguna condición energéticamente muy exigente, como una restricción calórica severa. Las concentraciones de ghrelina en el líquido cefalorraquídeo son difíciles de cuantificar en ratones, dado la gran cantidad de muestra que se necesita para poder realizar el ensayo. En nuestro conocimiento, nunca se han medido los niveles de ghrelina basal o post-administración de ghrelina en el líquido cefalorraquídeo de ratones. En otras especies, los niveles de ghrelina en el líquido cefalorraquídeo son 1000 veces menores que los niveles de ghrelina plasmáticos lo que sugiere que, probablemente, los niveles de ghrelina alcanzados en el líquido cefalorraquídeo de los ratones que utilizamos en este estudio sean supra fisiológicos. Sin embargo, los datos obtenidos a partir de ratones inyectados centralmente con ghrelina son muy útiles para comprender mejor los circuitos neuronales que mediarían los efectos de la ghrelina.

En nuestro conocimiento, esta Tesis Doctoral proporciona el primer análisis *in vivo* de los núcleos cerebrales accesibles a la ghrelina periférica y central utilizando un trazador bioactivo de la ghrelina. Anteriormente, se ha utilizado la incubación de la ghrelina marcada con biotina en secciones coronales de cerebro para determinar los sitios de unión a la ghrelina. Estos estudios de unión *in vitro* han mostrado que la ghrelina se une a varias áreas hipotalámicas (incluyendo el NPV, el Pe, el ARC, el DM, el AHA y el APOM), el VTA y las regiones CA del hipocampo [60, 135-137]. Similar patrón de sitios de unión a la ghrelina dentro del hipotálamo se detectaron mediante el marcaje *in vitro* de las secciones del cerebro con [¹²⁵I-Hs(9)]-ghrelina seguido por autorradiografía cuantitativa de la señal radiactiva [138]. Aquí, hemos mapeado la distribución cerebral de la F-ghrelina en ratones inyectados subcutáneamente o centralmente con la F-ghrelina; el cual demostramos que es un excelente trazador para mapear los sitios que unen ghrelina. Como mencionamos en la sección de Materiales y Métodos de esta Tesis, este trazador es un péptido de 18 aminoácidos análogo a la ghrelina y conjugado con una molécula de fluoresceína a través de la unión de una lisina en su extremo C-terminal [128]. Es importante volver a mencionar, que la región de unión de ghrelina al GHSR reside dentro de los primeros cinco aminoácidos del extremo N-terminal, los cuales son suficientes para la activación de GHSR [41, 52]. Por lo tanto, las modificaciones en el extremo C-terminal preservan el sitio bioactivo de la ghrelina. McGirr y sus colegas mostraron que la F-ghrelina se comporta de manera similar a la ghrelina nativa, en términos de estabilidad en el suero, afinidad a la unión al receptor y la actividad agonista [128]. Aquí, hemos ampliado la caracterización de este péptido trazador al mostrar que la F-ghrelina aumenta la ingesta de alimento en la misma magnitud que la ghrelina, sugiriendo que este péptido trazador es totalmente bioactivo *in vivo*. Además, hemos mostrado que la F-ghrelina no se une a los núcleos cerebrales de los ratones deficientes del GHSR, hecho que confirma que esta molécula se une específicamente al GHSR. Es de destacar, que la vida media de la fluorescencia de la F-ghrelina fue muy corta, en nuestras condiciones experimentales. Por lo tanto, hemos utilizado anticuerpos anti-fluoresceína con el fin de estabilizar y también aumentar la sensibilidad e intensidad de la

señal. Esta estrategia experimental nos permitió caracterizar detalladamente los núcleos cerebrales accesibles a la ghrelina periférica y central.

Nuestros resultados indican que el núcleo ARC es el principal sitio en el cual la ghrelina periférica ejerce sus acciones orexigénicas en los ratones, dado que la dosis baja de ghrelina utilizada produjo un aumento de la ingesta de alimento, y solo accedió y activó a este núcleo hipotalámico. Como describimos en la introducción de esta Tesis, se han postulado a las neuronas AgRP/NPY del núcleo ARC como las principales mediadoras del efecto orexigénico de la ghrelina. Además, estudios previos han mostrado que la administración periférica de ghrelina en roedores induce c-fos exclusivamente en el núcleo ARC y no en otras áreas [139, 140]. En contraste, nosotros encontramos que la administración periférica de ghrelina a mayores dosis también aumenta c-fos en el NPV y en el NTS, lo cual también ha sido mostrado en otras investigaciones [102, 103, 141, 142]. Creemos que estas diferencias pueden ser debidas a las diferentes dosis de ghrelina administrada en cada estudio. El patrón de unión que encontramos de la F-ghrelina en los ratones inyectados periféricamente con dicho trazador, nos permitió concluir que el núcleo ARC posee una mayor accesibilidad a la ghrelina periférica. Asimismo, en los ratones inyectados periféricamente con la dosis baja también encontramos señal inmuno-reactiva para fluoresceína en la EM; mientras que, en los ratones inyectados con las dosis alta de F-ghrelina, no sólo encontramos señal inmuno-reactiva para fluoresceína en el núcleo ARC y en la EM, sino también en el AP y en NPV. Así, nuestros resultados sugieren que la EM posee mayor permeabilidad a la ghrelina periférica, lo cual podría explicar la mayor accesibilidad de la ghrelina periférica al núcleo ARC. Los estudios que han evaluado la permeabilidad de la barrera hematoencefálica a la ghrelina en ratones han mostrado que la ghrelina humana, la cual difiere de la ghrelina de ratón por dos aminoácidos, se puede transportar del cerebro a la sangre y desde la sangre al cerebro por sistemas de transporte saturables [143]. Esto podría explicar, en parte, que niveles altos de la ghrelina periférica puedan acceder también al NPV y al AP. Por el contrario, no encontramos señal inmuno-

reactiva para fluoresceína en el NTS incluso al administrar dosis altas de F-ghrelina periférica. De esta manera, nuestros resultados sugieren que la ghrelina periférica no accedería al NTS, aún cuando circula en altas concentraciones. Por consiguiente, creemos que el aumento de c-fos en el NTS en respuesta a altas concentraciones de ghrelina periférica puede ser, en parte, secundario a la acción de la ghrelina en el AP. En sostén a esta posibilidad, se ha mostrado que la lesión del AP bloquea el aumento de c-fos en el NMDV y en el NTS inducido por la ghrelina [141].

Por otro lado, confirmamos observaciones previas hechas por otros investigadores, ya que encontramos que la administración central de ghrelina aumenta la ingesta de alimento e induce de c-fos en muchas de las áreas donde se ha descrito la expresión del GHSR [102, 144, 145]. Entre dichas áreas se encuentran núcleos hipotalámicos como el NPV, el Pe, el ARC, el DM, el VMH y núcleos extra-hipotalámicos como el AP, el NTS, la SNC y el VTA. El patrón de unión de la F-ghrelina en los ratones inyectados centralmente con F-ghrelina fue consistente, en general, con estudios previos utilizando hibridación *in situ* para la visualización del ARNm de GHSR en el cerebro del ratón [43, 86, 87]. A pesar de pequeñas diferencias, los datos expuestos en esta Tesis proporcionan una fuerte evidencia de que la ghrelina presente en el líquido cefalorraquídeo es capaz de interactuar *in vivo* con el NPV y con la mayoría de las áreas en las que se expresa GHSR.

Con el fin de alcanzar sus sitios de acción cerebral, la ghrelina necesita primero llegar al líquido cefalorraquídeo y luego cruzar la barrera entre el parénquima cerebral y el líquido cefalorraquídeo constituida por las células endoteliales que revisten los ventrículos. Aquí encontramos señal inmuno-reactiva para fluoresceína no sólo en núcleos cerebrales, sino también en las células endoteliales, incluyendo en las células que recubren el piso del tercer ventrículo, en donde se encuentran los tanicitos. A la fecha no se ha descrito la expresión del ARNm de GHSR en las células endoteliales [43, 86, 87]. Adicionalmente, encontramos señal de F-ghrelina en las células endoteliales de ratones con deficiencia del

GHSR inyectados con este trazador. Por este motivo, se puede especular que las células endimarias pueden acumular y transportar la ghrelina del líquido cefalorraquídeo al cerebro de una manera independiente del GHSR. Los mecanismos de transporte de moléculas del líquido cefalorraquídeo a través de la capa endimaria actualmente no están claros; sin embargo, los estudios de seguimiento de trazadores indican que estos mecanismos son muy selectivos. Por ejemplo, la lectina de germen de trigo (~17 kDa) inyectada en el ventrículo lateral se acumula en las células endimarias, incluyendo tanicitos, y no es transportada al parénquima cerebral [146]. En contraste, inyecciones en el ventrículo lateral de FluoroGold (473 Da) o de la peroxidasa de rábano picante (~44 kDa) resulta en la endocitosis de los marcadores por las células endimarias y los tanicitos excepto los que recubren el suelo de la cavidad infundibular (β 2-tanicitos) [146, 147]. Adicionalmente, la toxina del cólera subunidad B (~12 kDa) o azul de Evans (961 Da) inyectados en el ventrículo lateral son acumulados por las células endimarias y también acceden a las neuronas de los núcleos del rafe o el ARC, respectivamente [148, 149]. Estudios en donde se administraron hormonas marcadas con digoxigenina en el ventrículo lateral mostraron que la leptina se acumula en las células endimarias y en las neuronas serotoninérgicas del núcleo del rafe, mientras que la insulina y el factor de crecimiento similar a la insulina tipo1 se acumulan en los tanicitos y las células del núcleo ARC y de la EM [150, 151]. Por lo tanto, la ghrelina presente en el líquido cefalorraquídeo parece tener alta accesibilidad, en comparación con otras hormonas, desde el líquido cefalorraquídeo a las diferentes áreas del cerebro. Esto le permitiría no sólo acceder rápidamente al NPV, sino también a otras áreas que expresen GHSR y pudieran mediar el efecto de ghrelina sobre las neuronas CRF. Serán necesarios estudios futuros para dilucidar el mecanismo por el cual las células endimarias internalizan y transportan ghrelina del líquido cefalorraquídeo al cerebro.

La concentración de ghrelina en el líquido cefalorraquídeo está sometida a una regulación dinámica y depende del estado energético [152, 153]. Sin embargo, el origen de la ghrelina del líquido cefalorraquídeo no está claro. Se ha sugerido que la ghrelina periférica puede

entrar en el líquido cefalorraquídeo atravesando la barrera hematoencefálica. En sostén de esta hipótesis, se ha mostrado que los niveles de ghrelina del líquido cefalorraquídeo correlacionan con los niveles de ghrelina plasmática, y que la ghrelina en el líquido cefalorraquídeo aumenta alrededor de 30 minutos después de una inyección periférica de ghrelina en un modelo de oveja [152]. Además, la concentración de ghrelina en el líquido cefalorraquídeo muestra un perfil pulsátil, y alrededor de la mitad de los picos de ghrelina en el líquido cefalorraquídeo son precedidos por un pico de ghrelina plasmática [152]. Como mencionamos anteriormente, se ha postulado la existencia de un sistema de transporte saturable en la barrera hematoencefálica, que podría regular el pasaje de la ghrelina plasmática al cerebro [143]. La ghrelina periférica podría cruzar la barrera hematoencefálica en los plexos coroideos y/o ser transportada por los ventrículos del cerebro, luego de que haya ingresado al parénquima cerebral [143]. Además, en esta Tesis encontramos señal inmuno-reactiva para fluoresceína en la EM y en el AP de ratones inyectados periféricamente con la F-ghrelina. Como describimos en la introducción de la presente Tesis, la EM y el AP son órganos circunventriculares que están formados por células especializadas que les permiten a las hormonas tener una mayor accesibilidad al cerebro. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la ghrelina periférica podría llegar al líquido cefalorraquídeo y al parénquima cerebral, en parte, a través de los órganos circunventriculares. Asimismo, un estudio reciente ha demostrado que la leptina, otra hormona importante en el control del balance energético, ingresa al líquido cefalorraquídeo a través de los tunicos de la EM [154]. Si bien algunos investigadores postulan una producción hipotalámica de ghrelina [60, 61], un origen central de la ghrelina del líquido cefalorraquídeo parece ser poco probable ya que muchos estudios no han podido confirmar la presencia de células productoras de ghrelina en el cerebro de ratón [62, 63]. Al respecto, nuestros datos permiten proponer que las células inmuno-reactivas para ghrelina presentes en el cerebro que han sido detectadas en algunos estudios podrían ser positivas debido a la unión de la ghrelina periférica, en lugar de ser hormona producida por el sistema nervioso central.

En resumen, en la presente sección mostramos que un incremento pequeño de la ghrelina circulante solo activa y accede al núcleo ARC. En contraste, un incremento mayor de la ghrelina circulante no solo aumenta c-fos y accede al núcleo ARC, sino también al AP y al NPV; y también incrementa c-fos en el NTS. Por otro lado, mostramos que la ghrelina administrada centralmente es capaz de activar c-fos y de llegar al NPV y a la mayoría de las áreas donde se expresa el GHSR. También detectamos la incorporación de F-ghrelina en las células endimarias del sistema ventricular del cerebro, donde no se ha descrito presencia del GHSR.

2- Estudio de los efectos de ghrelina periférica o central sobre las neuronas CRF del NPV y el eje HHA

En nuestro conocimiento, esta Tesis Doctoral proporciona la primera caracterización *in vivo* de la respuesta de las neuronas CRF del NPV a la ghrelina periférica y central. En el primer apartado, mostramos que sólo niveles elevados de la ghrelina periférica son capaces de llegar y activar al NPV. Aquí, ampliamos nuestros resultados y mostramos que una dosis alta de ghrelina periférica activa a las neuronas CRF del NPV y al eje HHA. Asimismo, mostramos que la administración de la ghrelina en el ventrículo lateral activa a las neuronas CRF con la misma intensidad que la ghrelina periférica, y produce un aumento de los niveles del ARNm del CRF en el NPV. Por lo tanto, la ghrelina puede activar a las neuronas CRF, independientemente de sus acciones periféricas. Aquí, mostramos que las neuronas CRF que responden a la ghrelina se concentran en la parte compacta del NPV, lugar donde se encuentran la mayor cantidad de neuronas hipofisiotrópicas [3]. Además, el tratamiento con ghrelina produjo un aumento de los niveles de corticosterona plasmática, sugiriendo que la activación del eje HHA es probablemente debida a un aumento de la secreción del CRF en el sistema porta-hipofisario.

Aún no se ha establecido si fluctuaciones en los niveles de la ghrelina circulante pueden regular al eje HHA. Sin embargo, estudios anteriores ha mostrado que un estrés crónico produce niveles más elevados de corticosterona plasmática en ratones salvajes que los observados en ratones deficientes del GHSR, sugiriendo que la presencia del GHSR es necesaria para una completa activación del eje HHA en respuesta al estrés [44]. En el presente trabajo, mostramos una significativa activación de las neuronas CRF y el eje HHA en respuesta a la ghrelina, lo cual apoya el concepto que esta hormona cumple un rol importante en la regulación del eje HHA. Estudios previos han mostrado que la ghrelina plasmática aumenta en respuesta a un estrés agudo o crónico, en humanos y roedores [155, 156]. El mecanismo por el cual el estrés induce aumento de la ghrelina aún no está esclarecido; sin embargo, es probable que dependa del sistema nervioso simpático y/o de la liberación de catecolaminas [157, 158]. Por otra parte, y como hemos mencionado en la introducción, los niveles de la ghrelina circulante aumentan progresivamente con el ayuno y/o restricción calórica. Aquí, mostramos que las neuronas CRF se activan en respuesta a niveles altos de la ghrelina circulante, lo cual sugiere que la ghrelina probablemente participe de la activación de las neuronas CRF en situaciones energéticamente muy exigentes, como una restricción calórica severa, y que esta activación sea necesaria para una respuesta completa del eje HHA.

Aquí, nosotros mostramos que la ghrelina puede activar a las neuronas CRF del NPV, independientemente de su acceso a otros núcleos cerebrales. La administración de la ghrelina directamente en el NPV activó a las neuronas CRF de igual forma que lo hizo la administración periférica y la administración en el ventrículo lateral. La administración de ghrelina en el NPV no produjo aumento de la ingesta de alimento ni activación de otros núcleos cerebrales lo cual demuestra que la inyección de la ghrelina fue limitada al NPV; y sugiere que la acción de la ghrelina sobre las neuronas CRF probablemente está dissociada anatómicamente de sus acciones orexigénicas. Otros estudios reportaron que la administración de ghrelina en el NPV de ratas aumenta la ingesta de alimento [159, 160]. La

razón de la discrepancia con nuestros datos no es clara, aunque la diferencia entre especies puede contribuir a las diferencias observadas. Lamentablemente esos estudios, no muestran fotografías o representaciones gráficas del sitio de inyección en el cerebro. Además, Olszewski *et al.* mostraron un incremento de c-fos en el NPV y también en el ARC en las ratas inyectadas con ghrelina en el NPV, contrario a nuestros resultados, sugiriendo que diferentes circuitos neuronales pueden ser requeridos en la rata o que la ghrelina pueda estar difundiendo también a otras zonas del cerebro.

En la presente Tesis Doctoral, mostramos que las neuronas CRF no expresan el GHSR. Notoriamente, mostramos unión de F-ghrelina a las terminales que inervan a las neuronas del NPV. De esta manera, la observación de la activación de las neuronas CRF del NPV en respuesta a ghrelina administrada localmente y la abundante unión de F-ghrelina en las terminales que inervan el NPV, sugieren que la ghrelina activa a las neuronas CRF actuando a nivel pre-sináptico. Así, varios posibles mecanismos indirectos podrían ser considerados. En el primer apartado de resultados de esta Tesis, demostramos que el núcleo ARC es la zona del cerebro más sensible a la ghrelina periférica y la que presenta la mayor accesibilidad a la hormona periférica. Así, una de las posibilidades es que la ghrelina active a las neuronas CRF a través de las terminales que contienen NPY y provienen del núcleo ARC. Además, otra posibilidad es que la ghrelina active a las neuronas CRF a través de la inhibición directa del tono GABAérgico que modula a las neuronas CRF.

En resumen nuestros resultados indican que una dosis alta de ghrelina administrada periféricamente, ghrelina administrada en el ventrículo lateral o directamente en el NPV, son capaces de activar a las neuronas CRF del NPV, y que esta acción es suficiente para rápidamente aumentar los niveles de glucocorticoides en plasma. Por otro lado, mostramos que las neuronas CRF no expresan el GHSR, sugiriendo que la activación de las neuronas CRF inducida por ghrelina se produce a través de un mecanismo indirecto y local. Notoriamente, mostramos que la activación de las neuronas CRF hipofisiotróficas inducida

por la ghrelina puede ocurrir independientemente de la ingesta de alimento. Por lo tanto, las funciones de la ghrelina como una señal orexigénica y como una señal de estrés probablemente ocurren a través de circuitos neuronales disociados anatómicamente.

3- Estudio de los circuitos neuronales por el cual la ghrelina activa las neuronas CRF

Como mencionamos en la introducción de esta Tesis Doctoral, las neuronas NPY del núcleo ARC cumplen un rol fundamental en el control del balance energético. En efecto, la destrucción selectiva de estas neuronas en los animales adultos lleva a la muerte de los mismos por inanición [161]. Además, el uso de antagonistas específicos de los receptores Y1 e Y5 de NPY disminuye la ingesta de alimento inducida por la ghrelina [145, 162]. Así, nuestros estudios confirman resultados previos ya que la administración central de los antagonistas de los receptores Y1 e Y5 disminuyó la ingesta de alimento inducida por ghrelina en los ratones. Por lo tanto, nuestros resultados confirman el rol importante del NPY como mediador de los efectos orexigénicos de la hormona. Por el contrario, encontramos que las neuronas CRF mantienen intacta la capacidad de responder a la ghrelina en presencia del bloqueo farmacológico de los receptores Y1 e Y5. Cowley *et al.* encontraron que la aplicación de una mezcla de los antagonistas de los receptores Y1 e Y5 disminuyó el efecto estimulador de la ghrelina sobre las neuronas del NPV [60]. Los estudios de Cowley *et al.* fueron registros electrofisiológicos *in vitro*. Además, los antagonistas utilizados en sus experimentos fueron distintos a los utilizados en nuestros estudios. Mientras que Cowley *et al.* observó el efecto en 5 de 11 neuronas registradas, nuestros estudios se realizaron en la totalidad del NPV incluyendo alrededor de 3000 neuronas. Vale la pena mencionar que nuestros estudios se focalizaron en cambios en la actividad transcripcional mientras que las investigaciones de Cowley *et al.* se refirieron a cambios en la actividad eléctrica por lo que es posible que ambos fenómenos ocurran en paralelo.

En esta Tesis Doctoral encontramos que la lesión del núcleo ARC no afectó la activación de las neuronas CRF inducida por la ghrelina. Notoriamente, también encontramos que los ratones con el ARC lesionado mantuvieron una respuesta intacta a los efectos orexigénicos en respuesta a la ghrelina administrada en el ventrículo lateral. Estos efectos pueden involucrar acciones directas de la ghrelina sobre diferentes núcleos hipotalámicos (VMH, DMN, etc.) y/o extra-hipotalámicos (CDV, VTA, etc.), los cuales hemos mostrado que se activan en respuesta a la administración central de ghrelina y son conocidos por poder mediar el efecto orexigénico de la hormona [102, 144, 145]. En el primer apartado de resultados de esta Tesis, mostramos que la ghrelina inyectada en el ventrículo lateral puede llegar a estos núcleos. Por lo tanto, nuestros resultados muestran que la ghrelina presente en el líquido cefalorraquídeo es capaz de aumentar la ingesta de alimento vía diferentes núcleos cerebrales y en ausencia del ARC. Dado la limitada accesibilidad que hemos observado de ghrelina circulante al cerebro, la relevancia fisiológica de nuestros hallazgos aun no está clara. Una posibilidad es que esos circuitos neuronales sean regulados por la ghrelina producida en el cerebro, aunque la existencia de producción de ghrelina por el cerebro aun permanece bajo debate. Otra de nuestras hipótesis es que el GHSR module la ingesta de alimento en forma independiente de la unión a ghrelina. Como ya mencionamos, el GHSR posee una alta actividad constitutiva, es decir mantiene la capacidad de activar la cascada de señalización intracelular en ausencia de ligando [78]. Por otro lado, GHSR heterodimeriza con otros receptores acoplados a proteína G, lo cual podría ser un mecanismo alostérico para regular su actividad o la de otros receptores, independiente de la unión de la ghrelina [80, 82]. Futuros estudios serán necesarios para dilucidar la importancia de ghrelina y/o GHSR en la regulación de estos circuitos.

El modelo de lesión del núcleo ARC utilizado en el presente trabajo ha sido extensamente utilizado para estudiar diferentes aspectos de la función hipotalámica [163, 164]. Por ejemplo, este modelo ha sido utilizado para mostrar que el neuropéptido orexina puede regular la activación de las neuronas CRF y el eje HHA en forma independiente del núcleo

ARC[165]. El extenso uso que se le ha dado a este modelo se debe a que es un modelo fácil de obtener, de bajo costo y de alta eficiencia. Además, el hecho que tantos estudios lo hayan utilizado permite conocer en detalle sus características y las precauciones que hay que tener al utilizarlo. Como todos los modelos experimentales su uso presenta ventajas y desventajas. Una potencial desventaja de este modelo es que a medida que los animales envejecen comienzan a desarrollar complicaciones secundarias, como las que se describen en el próximo párrafo. Estas desventajas del modelo las hemos minimizado al utilizar animales jóvenes, cuando estas alteraciones endocrino-metabólicas no son manifiestas [163, 164]. Otra potencial desventaja de este modelo es que la magnitud de la lesión hipotalámica puede ser variable. A sabiendas de esta limitación, decidimos utilizar un protocolo de administración de glutamato mono sódico que implica una única inyección de la droga en el día 4 de vida. La baja variabilidad de lesión observada con este protocolo no solo se apreció a nivel neuroanatómico al validar el modelo, sino que también se puede apreciar en la baja variabilidad observada en los resultados obtenidos, la cual fue similar a la obtenida en el grupo control. Asimismo, es interesante mencionar que en experimentos previos hemos mostrado que los animales con el núcleo ARC lesionado no responden a los efectos orexigénicos de la hormona ghrelina administrada periféricamente, hecho que sostiene el concepto de que la ghrelina periférica sólo accede al núcleo ARC [166]. Los animales utilizados en nuestros experimentos han sido cuidadosamente caracterizados. Como se muestra en la sección resultados, hemos confirmado que la lesión produce un descenso significativo de todas las células presentes en el ARC y en particular reduce el número de neuronas productoras de NPY. Es importante destacar que los animales con el ARC lesionado mantienen un reducido, pero significativo número de neuronas NPY en el ARC. Además, el NPV mantiene alrededor de un 40% de las fibras productoras de NPY que lo inervan, muchas de las cuales probablemente provienen del NTS del tronco encefálico. Así, los resultados obtenidos con el modelo de animales con el ARC lesionado resultaron complementarios a los obtenidos con el modelo en el que utilizamos bloqueo farmacológico de los receptores de NPY.

El efecto de la ghrelina en animales con el ARC lesionado ha sido previamente estudiado. En estos experimentos, Tamura *et al.* mostraron que la ghrelina administrada centralmente no aumenta la ingesta de alimento en ratas con el ARC lesionado [167]. Esta discrepancia con nuestros resultados puede ser debida a algunas diferencias en los diseños experimentales, incluyendo el uso de especies diferentes y de diferentes protocolos de administración neonatal del glutamato mono sódico a fin de producir la lesión neurotóxica. Sin embargo, creemos que la mayor diferencia entre este estudio y el nuestro es la edad de los animales al momento de ser tratados con la ghrelina. En esta Tesis utilizamos animales jóvenes (de 7-9 semanas de edad), en los cuales el peso corporal y la ingesta de alimento no difieren respecto de los ratones control. Está bien establecido que los roedores con el núcleo ARC lesionado desarrollan una serie de anormalidades con la edad, incluyendo hipofagia, aumento del peso corporal y excesiva acumulación de grasa abdominal [163, 164]. Los estudios de Tamura *et al.* fueron realizados utilizando ratas de 14 semanas de edad, las cuales mostraron patrones alterados de consumo de alimento comparado con el grupo control [167]. Por lo tanto, las alteraciones en el balance energético plantean dudas si la disminución en el consumo de alimento en respuesta a la ghrelina observada por estos investigadores es consecuencia de la lesión del ARC. Por otra parte, otros estudios han reportado que los animales obesos son resistentes a los efectos orexigénicos de la ghrelina [168, 169]. Así, los animales utilizando por Tamura *et al.* no respondieron a ghrelina probablemente debido a un estado de resistencia a dicha hormona. Serán necesarias futuras investigaciones usando diferentes modelos, para entender mejor los circuitos que median los efectos orexigénicos de la ghrelina. Independientemente de ello, nuestros resultados sugieren que los circuitos por los cuales la ghrelina regula la ingesta de alimento son independientes de los circuitos por los cuales la ghrelina activa las neuronas CRF del NPV.

En nuestro conocimiento, esta Tesis Doctoral proporciona las primeras evidencias que la ghrelina activa a las neuronas CRF del NPV *in vivo* a través de un circuito que involucra la acción de GABA. Aquí, mostramos unión de F-ghrelina en el NPV exclusivamente en las terminales GABAérgicas. Esto permite descartar que otros sistemas, como el noradrenérgico del NTS, pueda cumplir un rol en la activación de las neuronas CRF inducida por ghrelina. Por otro lado, encontramos que la inyección del agonista específico de los receptores GABA_A muscimol en el NPV bloquea el efecto estimulador de la ghrelina sobre las neuronas CRF. Varios estudios en roedores han mostrado que la activación de las neuronas CRF del NPV y del eje HHA inducida por estrés se reduce en presencia de muscimol [13-15]. Dos estudios previos mostraron que la inyección de muscimol en el NPV reduce el aumento de ACTH y corticosterona inducido por la inmovilización de los animales [13, 15]. Kovacs *et al.* encontraron que la administración de muscimol en el NPV disminuye la activación de las neuronas del NPV en respuesta a un estrés agudo con éter [14]. Por lo tanto nuestros resultados sugieren, que la ghrelina podría actuar como una señal de estrés y la forma de activar las neuronas CRF involucra una disminución del tono GABAérgico local.

En la presente Tesis Doctoral mostramos, por primera vez, que la ghrelina es capaz de disminuir la secreción de GABA en explantes del NPV. El mecanismo más eficiente utilizado por los receptores acoplados a proteína G, como es el GHSR, para limitar la liberación de neurotransmisores en las terminales pre-sinápticas es la inhibición de los canales de calcio operados por voltaje tipo CaV2.1 y CaV2.2. Estos canales controlan la entrada de calcio a la terminal sináptica y, en consecuencia, la liberación de vesículas conteniendo neurotransmisores. Como mencionamos en la sección introducción, el GHSR activa la vía de señalización intracelular dependiente de proteína Gq, la cual actúa mayoritariamente sobre canales de calcio pre-sinápticos produciendo la consecuente disminución de la neurosecreción [170]. El laboratorio de electrofisiología del IMBICE cuenta con resultados preliminares, aún no publicados, demostrando que la activación del GHSR por la ghrelina inhibe canales de calcio CaV2.1 y CaV2.2 en forma dependiente de Gq. De esta manera

estos resultados sostienen el concepto de que la ghrelina inhibe la secreción de GABA en el NPV.

Como mencionamos previamente en la introducción, una gran proporción de las inervaciones GABAérgicas del NPV provienen del núcleo Pe, el DM, el AHA y el APOM. Asimismo, en el primer apartado de resultados, mostramos fuertes evidencias de que la ghrelina presente en el líquido cefalorraquídeo es capaz de interactuar *in vivo* con dichos núcleos cerebrales. Por lo tanto las neuronas GABAérgicas de estos núcleos podrían mediar los efectos de ghrelina sobre las neuronas CRF. En futuros experimentos nos proponemos determinar la localización de las neuronas GABAérgicas sensibles a ghrelina. Asimismo queremos evaluar si la administración de ghrelina puede *in vivo* activar las neuronas CRF y el eje HHA en ratones que sólo expresan GHSR en neuronas GABAérgicas.

Por lo tanto esta Tesis Doctoral sugiere que la ghrelina causa una des-inhibición de las neuronas CRF del NPV mediante la disminución del tono GABAérgico local. Esto lleva a la activación del eje HHA con el consecuente aumento de los niveles de glucocorticoides plasmáticos. Por lo tanto, los glucocorticoides mediarían las acciones de ghrelina con el fin de mantener, principalmente, la glucemia. Este mecanismo podría tener relevancia en condiciones energéticamente muy exigentes, donde los niveles de ghrelina circulante se encuentran muy elevados, como se observa en ayuno prolongado o en patologías como la anorexia nerviosa. Investigaciones recientes han postulado que el estado nutricional puede regular la permeabilidad de los órganos circunventriculares y de esta manera modular el acceso de las hormonas al cerebro [171]. Así, en condiciones energéticamente desfavorables la accesibilidad de las hormonas al NPV se encontraría aumentada. De esta manera, es posible plantear la hipótesis que el efecto de ghrelina sobre el eje HHA sea fisiológicamente más relevante en estas condiciones. Finalmente, creemos que esta Tesis Doctoral aportó datos precisos de cómo la ghrelina activa a las neuronas CRF del NPV.

Futuras investigaciones serán necesarias para establecer la relevancia fisiológica de estos circuitos.

Conclusiones

En conclusión los resultados mostrados sugieren que:

- 1- Niveles bajos de ghrelina periférica solo activan y acceden al núcleo ARC y no activan las neuronas CRF del NPV.
- 2- Niveles altos de ghrelina periférica pueden acceder y activar a las neuronas CRF del NPV.
- 3- La ghrelina presente en el líquido cefalorraquídeo es capaz de acceder y activar a las neuronas CRF del NPV y a la mayoría de los núcleos cerebrales que expresan el GHSR.
- 4- La ghrelina activa las neuronas CRF directamente en el NPV, independientemente de su acceso a otros núcleos cerebrales.
- 5- Las neuronas CRF no expresan el GHSR, por lo que la ghrelina activa estas neuronas indirectamente.
- 6- La ghrelina no requiere la acción del NPY para activar a las neuronas CRF.
- 7- La ghrelina no requiere del núcleo ARC intacto para activar a las neuronas CRF.
- 8- La ghrelina inhibe la secreción de GABA en el NPV y requiere de este efecto para activar a las neuronas CRF.

En la figura 34 A. esquematizamos los mecanismos potenciales que propusimos en esta Tesis Doctoral para la activación de las neuronas CRF del NPV inducida por la ghrelina. La figura 34 B. muestra el modelo que proponemos según nuestros resultados.

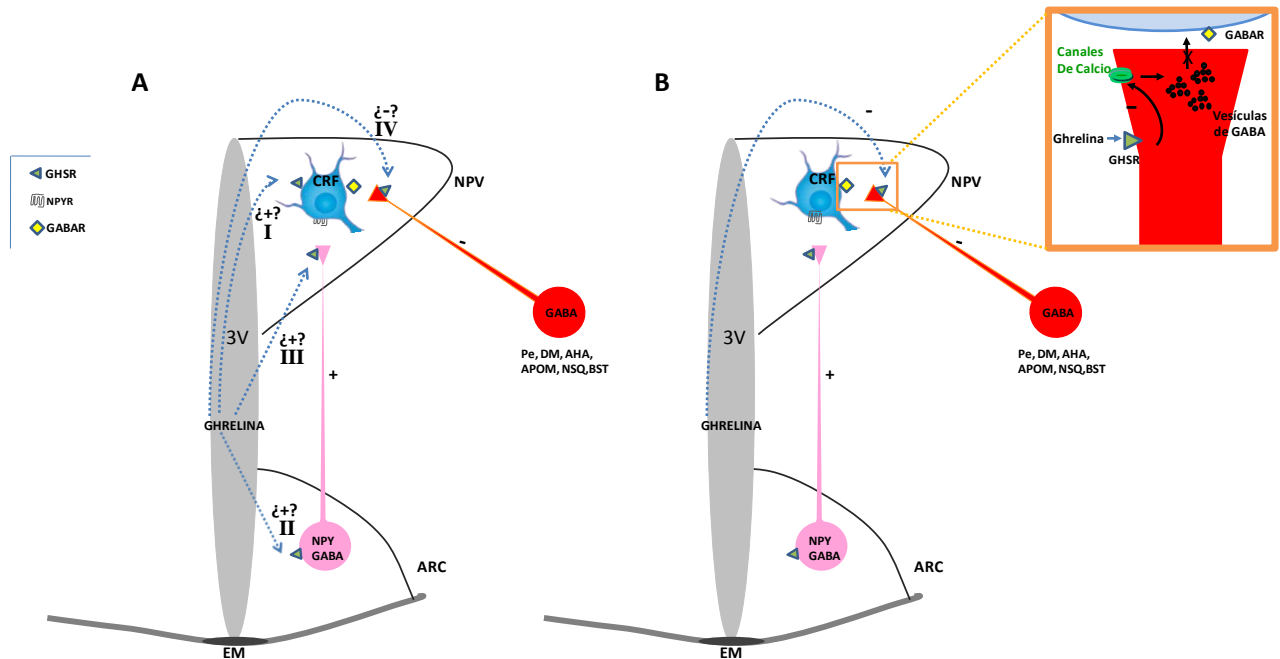


Figura 34. La figura A muestra los mecanismos potenciales por el cual la ghrelina podría activar a las neuronas CRF del NPV. La figura B muestra el modelo propuesto para la activación de las neuronas CRF del NPV por la ghrelina. Las abreviaturas indican: ARC: núcleo arcuato, AHA: área hipotalámica anterior, APOM: área preóptica medial, BST: núcleos del lecho de la estría terminali, DM: núcleo dorsomedial, EM: eminencia media, NPV: núcleo paraventricular, NSQ: núcleo supraquiasmático Pe: zona periventricular, CRF: factor liberador de corticotrofina, GABA: ácido γ -aminobutírico, GABAR: receptor de GABA, GHSR: receptor de ghrelina, NPY: neuropéptido Y, NPYR: receptor de NPY y 3V: tercer ventrículo.

1. SHLOMO MELMED, K.S.P., P. REED LARSEN, HENRY M. KRONENBERG, *Williams Textbook of ENDOCRINOLOGY*. 12TH Edition ed.
2. Snell, R., *Clinica Neuroanatomy*. 6TH Edition ed.
3. Biag, J., et al., *Cyto- and chemoarchitecture of the hypothalamic paraventricular nucleus in the C57BL/6J male mouse: a study of immunostaining and multiple fluorescent tract tracing*. J Comp Neurol, 2012. **520**(1): p. 6-33.
4. Gallagher, J.P., et al., *Synaptic physiology of central CRH system*. Eur J Pharmacol, 2008. **583**(2-3): p. 215-25.
5. Perrin, M.H. and W.W. Vale, *Corticotropin releasing factor receptors and their ligand family*. Ann N Y Acad Sci, 1999. **885**: p. 312-28.
6. Cole, R.L. and P.E. Sawchenko, *Neurotransmitter regulation of cellular activation and neuropeptide gene expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus*. J Neurosci, 2002. **22**(3): p. 959-69.
7. Herman, J.P., et al., *Local circuit regulation of paraventricular nucleus stress integration: glutamate-GABA connections*. Pharmacol Biochem Behav, 2002. **71**(3): p. 457-68.
8. Bartanusz, V., et al., *Local gamma-aminobutyric acid and glutamate circuit control of hypophyseotrophic corticotropin-releasing factor neuron activity in the paraventricular nucleus of the hypothalamus*. Eur J Neurosci, 2004. **19**(3): p. 777-82.
9. van den Pol, A.N., *Glutamate and aspartate immunoreactivity in hypothalamic presynaptic axons*. J Neurosci, 1991. **11**(7): p. 2087-101.
10. Decavel, C. and A.N. Van den Pol, *GABA: a dominant neurotransmitter in the hypothalamus*. J Comp Neurol, 1990. **302**(4): p. 1019-37.
11. Boudaba, C., K. Szabo, and J.G. Tasker, *Physiological mapping of local inhibitory inputs to the hypothalamic paraventricular nucleus*. J Neurosci, 1996. **16**(22): p. 7151-60.
12. Herman, J.P., et al., *Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness*. Front Neuroendocrinol, 2003. **24**(3): p. 151-80.
13. Cullinan, W.E., D.R. Ziegler, and J.P. Herman, *Functional role of local GABAergic influences on the HPA axis*. Brain Struct Funct, 2008. **213**(1-2): p. 63-72.
14. Kovacs, K.J., I.H. Miklos, and B. Bali, *GABAergic mechanisms constraining the activity of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis*. Ann N Y Acad Sci, 2004. **1018**: p. 466-76.
15. Stotz-Potter, E.H., S.M. Morin, and J.A. DiMicco, *Effect of microinjection of muscimol into the dorsomedial or paraventricular hypothalamic nucleus on air stress-induced neuroendocrine and cardiovascular changes in rats*. Brain Res, 1996. **742**(1-2): p. 219-24.
16. Boudaba, C., L.A. Schrader, and J.G. Tasker, *Physiological evidence for local excitatory synaptic circuits in the rat hypothalamus*. J Neurophysiol, 1997. **77**(6): p. 3396-400.
17. Legradi, G. and R.M. Lechan, *The arcuate nucleus is the major source for neuropeptide Y-innervation of thyrotropin-releasing hormone neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus*. Endocrinology, 1998. **139**(7): p. 3262-70.
18. Sawchenko, P.E., et al., *Colocalization of neuropeptide Y immunoreactivity in brainstem catecholaminergic neurons that project to the paraventricular nucleus of the hypothalamus*. J Comp Neurol, 1985. **241**(2): p. 138-53.
19. Dumont, Y., et al., *Neuropeptide Y and neuropeptide Y receptor subtypes in brain and peripheral tissues*. Prog Neurobiol, 1992. **38**(2): p. 125-67.
20. Heilig, M. and E. Widerlov, *Neurobiology and clinical aspects of neuropeptide Y*. Crit Rev Neurobiol, 1995. **9**(2-3): p. 115-36.
21. Wettstein, J.G., B. Earley, and J.L. Junien, *Central nervous system pharmacology of neuropeptide Y*. Pharmacol Ther, 1995. **65**(3): p. 397-414.
22. Kishi, T., et al., *Neuropeptide Y Y1 receptor mRNA in rodent brain: distribution and colocalization with melanocortin-4 receptor*. J Comp Neurol, 2005. **482**(3): p. 217-43.

23. Parker, R.M. and H. Herzog, *Regional distribution of Y-receptor subtype mRNAs in rat brain*. Eur J Neurosci, 1999. **11**(4): p. 1431-48.
24. Dimitrov, E.L., et al., *Involvement of neuropeptide Y Y1 receptors in the regulation of neuroendocrine corticotropin-releasing hormone neuronal activity*. Endocrinology, 2007. **148**(8): p. 3666-73.
25. Fuzesi, T., et al., *Contribution of noradrenergic and adrenergic cell groups of the brainstem and agouti-related protein-synthesizing neurons of the arcuate nucleus to neuropeptide-y innervation of corticotropin-releasing hormone neurons in hypothalamic paraventricular nucleus of the rat*. Endocrinology, 2007. **148**(11): p. 5442-50.
26. Liposits, Z., L. Sievers, and W.K. Paull, *Neuropeptide-Y and ACTH-immunoreactive innervation of corticotropin releasing factor (CRF)-synthesizing neurons in the hypothalamus of the rat. An immunocytochemical analysis at the light and electron microscopic levels*. Histochemistry, 1988. **88**(3-6): p. 227-34.
27. Mountjoy, K.G., *Functions for pro-opiomelanocortin-derived peptides in obesity and diabetes*. Biochem J, 2010. **428**(3): p. 305-24.
28. Zemel, M.B. and H. Shi, *Pro-opiomelanocortin (POMC) deficiency and peripheral melanocortins in obesity*. Nutr Rev, 2000. **58**(6): p. 177-80.
29. Kishi, T., et al., *Expression of melanocortin 4 receptor mRNA in the central nervous system of the rat*. J Comp Neurol, 2003. **457**(3): p. 213-35.
30. Chen, A.S., et al., *Inactivation of the mouse melanocortin-3 receptor results in increased fat mass and reduced lean body mass*. Nat Genet, 2000. **26**(1): p. 97-102.
31. Shukla, C., et al., *Region-specific differences in brain melanocortin receptors in rats of the lean phenotype*. Neuroreport, 2012. **23**(10): p. 596-600.
32. Lu, X.Y., et al., *Interaction between alpha-melanocyte-stimulating hormone and corticotropin-releasing hormone in the regulation of feeding and hypothalamo-pituitary-adrenal responses*. J Neurosci, 2003. **23**(21): p. 7863-72.
33. Krukoff, T.L., et al., *Changes in blood volume and pressure induce c-fos expression in brainstem neurons that project to the paraventricular nucleus of the hypothalamus*. Brain Res Mol Brain Res, 1995. **34**(1): p. 99-108.
34. Lamprecht, R. and Y. Dudai, *Differential modulation of brain immediate early genes by intraperitoneal LiCl*. Neuroreport, 1995. **7**(1): p. 289-93.
35. Streefland, C. and K. Jansen, *Intramedullary projections of the rostral nucleus of the solitary tract in the rat: gustatory influences on autonomic output*. Chem Senses, 1999. **24**(6): p. 655-64.
36. Thiruvikraman, K.V., Y. Su, and P.M. Plotsky, *Patterns of Fos-Immunoreactivity in the CNS Induced by Repeated Hemorrhage in Conscious Rats: Correlations with Pituitary-Adrenal Axis Activity*. Stress, 1997. **2**(2): p. 145-158.
37. Plotsky, P.M., *Facilitation of immunoreactive corticotropin-releasing factor secretion into the hypophysial-portal circulation after activation of catecholaminergic pathways or central norepinephrine injection*. Endocrinology, 1987. **121**(3): p. 924-30.
38. Plotsky, P.M., E.T. Cunningham, Jr., and E.P. Widmaier, *Catecholaminergic modulation of corticotropin-releasing factor and adrenocorticotropin secretion*. Endocr Rev, 1989. **10**(4): p. 437-58.
39. Levy, B.H. and J.G. Tasker, *Synaptic regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and its modulation by glucocorticoids and stress*. Front Cell Neurosci, 2012. **6**: p. 24.
40. Pacak, K., et al., *Stress-induced norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus and pituitary-adrenocortical and sympathoadrenal activity: in vivo microdialysis studies*. Front Neuroendocrinol, 1995. **16**(2): p. 89-150.
41. Kojima, M., et al., *Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach*. Nature, 1999. **402**(6762): p. 656-60.

42. Howard, A.D., et al., *A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release*. Science, 1996. **273**(5277): p. 974-7.
43. Zigman, J.M., et al., *Expression of ghrelin receptor mRNA in the rat and the mouse brain*. J Comp Neurol, 2006. **494**(3): p. 528-48.
44. Chuang, J.C., et al., *Ghrelin mediates stress-induced food-reward behavior in mice*. J Clin Invest, 2011. **121**(7): p. 2684-92.
45. Cummings, D.E., *Ghrelin and the short- and long-term regulation of appetite and body weight*. Physiol Behav, 2006.
46. Cummings, D.E. and M.H. Shannon, *Roles for ghrelin in the regulation of appetite and body weight*. Arch Surg, 2003. **138**(4): p. 389-96.
47. Jeffery, P.L., et al., *Expression of the ghrelin axis in the mouse: an exon 4-deleted mouse proghrelin variant encodes a novel C terminal peptide*. Endocrinology, 2005. **146**(1): p. 432-40.
48. Kojima, M. and K. Kangawa, *Ghrelin: structure and function*. Physiol Rev, 2005. **85**(2): p. 495-522.
49. Gutierrez, J.A., et al., *Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(17): p. 6320-5.
50. Yang, J., et al., *Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone*. Cell, 2008. **132**(3): p. 387-96.
51. Zhu, X., et al., *On the processing of proghrelin to ghrelin*. J Biol Chem, 2006. **281**(50): p. 38867-70.
52. Bednarek, M.A., et al., *Structure-function studies on the new growth hormone-releasing peptide, ghrelin: minimal sequence of ghrelin necessary for activation of growth hormone secretagogue receptor 1a*. J Med Chem, 2000. **43**(23): p. 4370-6.
53. Hosoda, H., et al., *Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **279**(3): p. 909-13.
54. Zhang, J.V., et al., *Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake*. Science, 2005. **310**(5750): p. 996-9.
55. Ariyasu, H., et al., *Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(10): p. 4753-8.
56. Sakata, I., et al., *Ghrelin-producing cells exist as two types of cells, closed- and opened-type cells, in the rat gastrointestinal tract*. Peptides, 2002. **23**(3): p. 531-6.
57. Pekic, S., et al., *Plasma ghrelin levels of gastrectomized and vagotomized patients are not affected by glucose administration*. Clin Endocrinol (Oxf), 2006. **64**(6): p. 684-8.
58. Popovic, V., et al., *Low plasma ghrelin level in gastrectomized patients is accompanied by enhanced sensitivity to the ghrelin-induced growth hormone release*. J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(4): p. 2187-91.
59. Dornonville de la Cour, C., et al., *A-like cells in the rat stomach contain ghrelin and do not operate under gastrin control*. Regul Pept, 2001. **99**(2-3): p. 141-50.
60. Cowley, M.A., et al., *The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis*. Neuron, 2003. **37**(4): p. 649-61.
61. Lu, S., et al., *Immunocytochemical observation of ghrelin-containing neurons in the rat arcuate nucleus*. Neurosci Lett, 2002. **321**(3): p. 157-60.
62. Furness, J.B., et al., *Investigation of the presence of ghrelin in the central nervous system of the rat and mouse*. Neuroscience, 2011. **193**: p. 1-9.
63. Sakata, I., et al., *Characterization of a novel ghrelin cell reporter mouse*. Regul Pept, 2009. **155**(1-3): p. 91-8.
64. Delporte, C., *Structure and Physiological Actions of Ghrelin*. Scientifica (Cairo), 2013. **2013**: p. 518909.

65. De Vriese, C., et al., *Ghrelin degradation by serum and tissue homogenates: identification of the cleavage sites*. *Endocrinology*, 2004. **145**(11): p. 4997-5005.
66. Hosoda, H., et al., *Optimum collection and storage conditions for ghrelin measurements: octanoyl modification of ghrelin is rapidly hydrolyzed to desacyl ghrelin in blood samples*. *Clin Chem*, 2004. **50**(6): p. 1077-80.
67. Williams, D.L. and D.E. Cummings, *Regulation of ghrelin in physiologic and pathophysiologic states*. *J Nutr*, 2005. **135**(5): p. 1320-5.
68. Cummings, D.E., K.E. Foster-Schubert, and J. Overduin, *Ghrelin and energy balance: focus on current controversies*. *Curr Drug Targets*, 2005. **6**(2): p. 153-69.
69. Yin, X., et al., *Ghrelin fluctuation, what determines its production?* *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2009. **41**(3): p. 188-97.
70. Goldstein, J.L., et al., *Surviving starvation: essential role of the ghrelin-growth hormone axis*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2011. **76**: p. 121-7.
71. Germain, N., et al., *Ghrelin/obestatin ratio in two populations with low bodyweight: constitutional thinness and anorexia nervosa*. *Psychoneuroendocrinology*, 2009. **34**(3): p. 413-9.
72. Buss, J., et al., *Associations of ghrelin with eating behaviors, stress, metabolic factors, and telomere length among overweight and obese women: Preliminary evidence of attenuated ghrelin effects in obesity?* *Appetite*, 2014. **76C**: p. 84-94.
73. Gluck, M.E., et al., *Ghrelin levels after a cold pressor stress test in obese women with binge eating disorder*. *Psychosom Med*, 2014. **76**(1): p. 74-9.
74. Lacerda-Miranda, G., et al., *Ghrelin signaling in heart remodeling of adult obese mice*. *Peptides*, 2012. **35**(1): p. 65-73.
75. Soares, V.M., et al., *Early life overfeeding decreases acylated ghrelin circulating levels and upregulates GHSR1a signaling pathway in white adipose tissue of obese young mice*. *Regul Pept*, 2012. **174**(1-3): p. 6-11.
76. Briggs, D.I., et al., *Calorie-restricted weight loss reverses high-fat diet-induced ghrelin resistance, which contributes to rebound weight gain in a ghrelin-dependent manner*. *Endocrinology*, 2013. **154**(2): p. 709-17.
77. Moesgaard, S.G., et al., *Effects of high-fat feeding and fasting on ghrelin expression in the mouse stomach*. *Regul Pept*, 2004. **120**(1-3): p. 261-7.
78. Holst, B., et al., *High constitutive signaling of the ghrelin receptor--identification of a potent inverse agonist*. *Mol Endocrinol*, 2003. **17**(11): p. 2201-10.
79. Holst, B. and T.W. Schwartz, *Ghrelin receptor mutations--too little height and too much hunger*. *J Clin Invest*, 2006. **116**(3): p. 637-41.
80. Chow, K.B., et al., *The truncated ghrelin receptor polypeptide (GHS-R1b) is localized in the endoplasmic reticulum where it forms heterodimers with ghrelin receptors (GHS-R1a) to attenuate their cell surface expression*. *Mol Cell Endocrinol*, 2012. **348**(1): p. 247-54.
81. Chu, K.M., et al., *Over-expression of the truncated ghrelin receptor polypeptide attenuates the constitutive activation of phosphatidylinositol-specific phospholipase C by ghrelin receptors but has no effect on ghrelin-stimulated extracellular signal-regulated kinase 1/2 activity*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007. **39**(4): p. 752-64.
82. Leung, P.K., et al., *The truncated ghrelin receptor polypeptide (GHS-R1b) acts as a dominant-negative mutant of the ghrelin receptor*. *Cell Signal*, 2007. **19**(5): p. 1011-22.
83. Kojima, M., et al., *Ghrelin: discovery of the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor*. *Trends Endocrinol Metab*, 2001. **12**(3): p. 118-22.
84. Bennett, K.A., et al., *Growth hormone secretagogues and growth hormone releasing peptides act as orthosteric super-agonists but not allosteric regulators for activation of the G protein Galphao1 by the Ghrelin receptor*. *Mol Pharmacol*, 2009. **76**(4): p. 802-11.

85. Dezaki, K., M. Kakei, and T. Yada, *Ghrelin uses Galphai2 and activates voltage-dependent K⁺ channels to attenuate glucose-induced Ca²⁺ signaling and insulin release in islet beta-cells: novel signal transduction of ghrelin*. *Diabetes*, 2007. **56**(9): p. 2319-27.
86. Guan, X.M., et al., *Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues*. *Brain Res Mol Brain Res*, 1997. **48**(1): p. 23-9.
87. Perello, M., et al., *Functional implications of limited leptin receptor and ghrelin receptor coexpression in the brain*. *J Comp Neurol*, 2012. **520**(2): p. 281-94.
88. Gaytan, F., et al., *Immunolocalization of ghrelin and its functional receptor, the type 1a growth hormone secretagogue receptor, in the cyclic human ovary*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003. **88**(2): p. 879-87.
89. Gnanapavan, S., et al., *The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002. **87**(6): p. 2988.
90. Mason, B.L., Q. Wang, and J.M. Zigman, *The central nervous system sites mediating the orexigenic actions of ghrelin*. *Annu Rev Physiol*, 2014. **76**: p. 519-33.
91. Schellekens, H., T.G. Dinan, and J.F. Cryan, *Lean mean fat reducing "ghrelin" machine: hypothalamic ghrelin and ghrelin receptors as therapeutic targets in obesity*. *Neuropharmacology*, 2010. **58**(1): p. 2-16.
92. Gasco, V., et al., *Endocrine and metabolic actions of ghrelin*. *Endocr Dev*, 2010. **17**: p. 86-95.
93. Broglio, F., et al., *Ghrelin: endocrine, metabolic and cardiovascular actions*. *J Endocrinol Invest*, 2005. **28**(5 Suppl): p. 23-5.
94. Popovic, V., et al., *Ghrelin main action on the regulation of growth hormone release is exerted at hypothalamic level*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003. **88**(7): p. 3450-3.
95. Kohno, D., et al., *Ghrelin directly interacts with neuropeptide-Y-containing neurons in the rat arcuate nucleus: Ca²⁺ signaling via protein kinase A and N-type channel-dependent mechanisms and cross-talk with leptin and orexin*. *Diabetes*, 2003. **52**(4): p. 948-56.
96. Schaeffer, M., et al., *Rapid sensing of circulating ghrelin by hypothalamic appetite-modifying neurons*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(4): p. 1512-7.
97. Chen, H.Y., et al., *Orexigenic action of peripheral ghrelin is mediated by neuropeptide Y and agouti-related protein*. *Endocrinology*, 2004. **145**(6): p. 2607-12.
98. Willesen, M.G., P. Kristensen, and J. Romer, *Co-localization of growth hormone secretagogue receptor and NPY mRNA in the arcuate nucleus of the rat*. *Neuroendocrinology*, 1999. **70**(5): p. 306-16.
99. Valassi, E., M. Scacchi, and F. Cavagnini, *Neuroendocrine control of food intake*. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2008. **18**(2): p. 158-68.
100. Morton, G.J., et al., *Central nervous system control of food intake and body weight*. *Nature*, 2006. **443**(7109): p. 289-95.
101. Myers, M.G., Jr., et al., *The geometry of leptin action in the brain: more complicated than a simple ARC*. *Cell Metab*, 2009. **9**(2): p. 117-23.
102. Hashimoto, H., et al., *Centrally and peripherally administered ghrelin potently inhibits water intake in rats*. *Endocrinology*, 2007. **148**(4): p. 1638-47.
103. Takayama, K., et al., *Expression of c-Fos protein in the brain after intravenous injection of ghrelin in rats*. *Neurosci Lett*, 2007. **417**(3): p. 292-6.
104. Burdyga, G., et al., *Ghrelin receptors in rat and human nodose ganglia: putative role in regulating CB-1 and MCH receptor abundance*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2006. **290**(6): p. G1289-97.
105. Sakata, I., et al., *Growth hormone secretagogue receptor expression in the cells of the stomach-projected afferent nerve in the rat nodose ganglion*. *Neurosci Lett*, 2003. **342**(3): p. 183-6.
106. Fry, M. and A.V. Ferguson, *Ghrelin: central nervous system sites of action in regulation of energy balance*. *Int J Pept*, 2010. **2010**.

107. Wang, W.G., et al., *Effects of ghrelin on glucose-sensing and gastric distension sensitive neurons in rat dorsal vagal complex*. Regul Pept, 2008. **146**(1-3): p. 169-75.
108. Dezaki, K., et al., *Endogenous ghrelin in pancreatic islets restricts insulin release by attenuating Ca²⁺ signaling in beta-cells: implication in the glycemic control in rodents*. Diabetes, 2004. **53**(12): p. 3142-51.
109. Takaya, K., et al., *Ghrelin strongly stimulates growth hormone release in humans*. J Clin Endocrinol Metab, 2000. **85**(12): p. 4908-11.
110. Arvat, E., et al., *Endocrine activities of ghrelin, a natural growth hormone secretagogue (GHS), in humans: comparison and interactions with hexarelin, a nonnatural peptidyl GHS, and GH-releasing hormone*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(3): p. 1169-74.
111. Spencer, S.J., et al., *Ghrelin regulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and restricts anxiety after acute stress*. Biol Psychiatry, 2012. **72**(6): p. 457-65.
112. Stevanovic, D., et al., *The effect of centrally administered ghrelin on pituitary ACTH cells and circulating ACTH and corticosterone in rats*. Life Sci, 2007. **80**(9): p. 867-72.
113. Wren, A.M., et al., *The hypothalamic mechanisms of the hypophysiologic action of ghrelin*. Neuroendocrinology, 2002. **76**(5): p. 316-24.
114. Mozid, A.M., et al., *Ghrelin is released from rat hypothalamic explants and stimulates corticotrophin-releasing hormone and arginine-vasopressin*. Horm Metab Res, 2003. **35**(8): p. 455-9.
115. Kageyama, K., et al., *Ghrelin stimulates corticotropin-releasing factor and vasopressin gene expression in rat hypothalamic 4B cells*. Stress, 2011. **14**(5): p. 520-9.
116. Korbonits, M., et al., *Ghrelin--a hormone with multiple functions*. Front Neuroendocrinol, 2004. **25**(1): p. 27-68.
117. Rucinski, M., et al., *Evidence suggesting that ghrelin O-acyl transferase inhibitor acts at the hypothalamus to inhibit hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis function in the rat*. Peptides, 2012. **35**(2): p. 149-59.
118. Smith, R.G., et al., *Peptidomimetic regulation of growth hormone secretion*. Endocr Rev, 1997. **18**(5): p. 621-45.
119. Ghigo, E., et al., *Ghrelin: more than a natural GH secretagogue and/or an orexigenic factor*. Clin Endocrinol (Oxf), 2005. **62**(1): p. 1-17.
120. Kaye, W.H., *Neuropeptide abnormalities in anorexia nervosa*. Psychiatry Res, 1996. **62**(1): p. 65-74.
121. DISORDERS, N.A.O.A.N.A.A. <http://www.anad.org/contact/>.
122. http://www.lagaceta.com.ar/nota/325157/Informacion_General/Argentina_segundo_pais_con_mas_casos_anorexia.html.
123. Karlik, A., et al., *[Molecular analysis of the corticotropin-releasing hormone receptor type 2 gene fragment in anorexia nervosa]*. Psychiatr Pol, 2008. **42**(2): p. 209-18.
124. Hotta, M., et al., *The responses of plasma adrenocorticotropin and cortisol to corticotropin-releasing hormone (CRH) and cerebrospinal fluid immunoreactive CRH in anorexia nervosa patients*. J Clin Endocrinol Metab, 1986. **62**(2): p. 319-24.
125. Broglio, F., et al., *The endocrine response to acute ghrelin administration is blunted in patients with anorexia nervosa, a ghrelin hypersecretory state*. Clin Endocrinol (Oxf), 2004. **60**(5): p. 592-9.
126. Hotta, M., et al., *Ghrelin increases hunger and food intake in patients with restricting-type anorexia nervosa: a pilot study*. Endocr J, 2009. **56**(9): p. 1119-28.
127. Zigman, J.M., et al., *Mice lacking ghrelin receptors resist the development of diet-induced obesity*. J Clin Invest, 2005. **115**(12): p. 3564-72.
128. McGirr, R., et al., *Design and characterization of a fluorescent ghrelin analog for imaging the growth hormone secretagogue receptor 1a*. Regul Pept, 2011. **172**(1-3): p. 69-76.
129. Paxinos, G. and K. Franklin, *The Mouse Brain-Second Edition*. Academic Press, 2001.

130. Akana, S.F., et al., *Feedback sensitivity of the rat hypothalamo-pituitary-adrenal axis and its capacity to adjust to exogenous corticosterone*. *Endocrinology*, 1992. **131**(2): p. 585-94.
131. Dallman, M.F., et al., *Starvation: early signals, sensors, and sequelae*. *Endocrinology*, 1999. **140**(9): p. 4015-23.
132. Abercrombie, M., *Estimation of nuclear population from microtome sections*. *Anat Rec*, 1946. **94**: p. 239-47.
133. Brzozowski, T., et al., *Exogenous and endogenous ghrelin in gastroprotection against stress-induced gastric damage*. *Regul Pept*, 2004. **120**(1-3): p. 39-51.
134. Perello, M., et al., *Ghrelin increases the rewarding value of high-fat diet in an orexin-dependent manner*. *Biol Psychiatry*, 2010. **67**(9): p. 880-6.
135. Abizaid, A., et al., *Ghrelin modulates the activity and synaptic input organization of midbrain dopamine neurons while promoting appetite*. *J Clin Invest*, 2006. **116**(12): p. 3229-39.
136. Diano, S., et al., *Ghrelin controls hippocampal spine synapse density and memory performance*. *Nat Neurosci*, 2006. **9**(3): p. 381-8.
137. Wiedmer, P., et al., *Ghrelin-induced hypothermia: a physiological basis but no clinical risk*. *Physiol Behav*, 2011. **105**(1): p. 43-51.
138. Harrold, J.A., et al., *Autoradiographic analysis of ghrelin receptors in the rat hypothalamus*. *Brain Res*, 2008. **1196**: p. 59-64.
139. Traebert, M., et al., *Ghrelin acts on leptin-responsive neurones in the rat arcuate nucleus*. *J Neuroendocrinol*, 2002. **14**(7): p. 580-6.
140. Wang, L., D.H. Saint-Pierre, and Y. Tache, *Peripheral ghrelin selectively increases Fos expression in neuropeptide Y - synthesizing neurons in mouse hypothalamic arcuate nucleus*. *Neurosci Lett*, 2002. **325**(1): p. 47-51.
141. Li, Y., et al., *Ghrelin acts on the dorsal vagal complex to stimulate pancreatic protein secretion*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2006. **290**(6): p. G1350-8.
142. Scott, M.M., et al., *Hindbrain ghrelin receptor signaling is sufficient to maintain fasting glucose*. *PLoS One*, 2012. **7**(8): p. e44089.
143. Banks, W.A., et al., *Extent and direction of ghrelin transport across the blood-brain barrier is determined by its unique primary structure*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002. **302**(2): p. 822-7.
144. Lawrence, C.B., et al., *Acute central ghrelin and GH secretagogues induce feeding and activate brain appetite centers*. *Endocrinology*, 2002. **143**(1): p. 155-62.
145. Nakazato, M., et al., *A role for ghrelin in the central regulation of feeding*. *Nature*, 2001. **409**(6817): p. 194-8.
146. Cheunsuang, O., A.L. Stewart, and R. Morris, *Differential uptake of molecules from the circulation and CSF reveals regional and cellular specialisation in CNS detection of homeostatic signals*. *Cell Tissue Res*, 2006. **325**(2): p. 397-402.
147. Rodriguez, E.M., J.L. Blazquez, and M. Guerra, *The design of barriers in the hypothalamus allows the median eminence and the arcuate nucleus to enjoy private milieus: the former opens to the portal blood and the latter to the cerebrospinal fluid*. *Peptides*, 2010. **31**(4): p. 757-76.
148. Mikkelsen, J.D., A. Hay-Schmidt, and P.J. Larsen, *Central innervation of the rat ependyma and subcommissural organ with special reference to ascending serotonergic projections from the raphe nuclei*. *J Comp Neurol*, 1997. **384**(4): p. 556-68.
149. Mullier, A., et al., *Differential distribution of tight junction proteins suggests a role for tanycytes in blood-hypothalamus barrier regulation in the adult mouse brain*. *J Comp Neurol*, 2010. **518**(7): p. 943-62.
150. Fernandez-Galaz, M.C., et al., *Leptin uptake by serotonergic neurones of the dorsal raphe*. *J Neuroendocrinol*, 2002. **14**(6): p. 429-34.
151. Fernandez-Galaz, M.C., I. Torres-Aleman, and L.M. Garcia-Segura, *Endocrine-dependent accumulation of IGF-I by hypothalamic glia*. *Neuroreport*, 1996. **8**(1): p. 373-7.

152. Grouselle, D., et al., *Pulsatile cerebrospinal fluid and plasma ghrelin in relation to growth hormone secretion and food intake in the sheep*. J Neuroendocrinol, 2008. **20**(10): p. 1138-46.
153. Tritos, N.A., et al., *Cerebrospinal fluid ghrelin is negatively associated with body mass index*. J Clin Endocrinol Metab, 2003. **88**(6): p. 2943-6.
154. Balland, E., et al., *Hypothalamic Tanycytes Are an ERK-Gated Conduit for Leptin into the Brain*. Cell Metab, 2014. **19**(2): p. 293-301.
155. Rouach, V., et al., *The acute ghrelin response to a psychological stress challenge does not predict the post-stress urge to eat*. Psychoneuroendocrinology, 2007. **32**(6): p. 693-702.
156. Tschop, M., D.L. Smiley, and M.L. Heiman, *Ghrelin induces adiposity in rodents*. Nature, 2000. **407**(6806): p. 908-13.
157. Chuang, J.C. and J.M. Zigman, *Ghrelin's Roles in Stress, Mood, and Anxiety Regulation*. Int J Pept, 2010. **2010**.
158. Sgoifo, A., et al., *Social stress, autonomic neural activation, and cardiac activity in rats*. Neurosci Biobehav Rev, 1999. **23**(7): p. 915-23.
159. Currie, P.J., et al., *Ghrelin is an orexigenic and metabolic signaling peptide in the arcuate and paraventricular nuclei*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2005. **289**(2): p. R353-R358.
160. Olszewski, P.K., et al., *Hypothalamic paraventricular injections of ghrelin: effect on feeding and c-Fos immunoreactivity*. Peptides, 2003. **24**(6): p. 919-23.
161. Luquet, S., et al., *NPY/AgRP neurons are essential for feeding in adult mice but can be ablated in neonates*. Science, 2005. **310**(5748): p. 683-5.
162. Shintani, M., et al., *Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway*. Diabetes, 2001. **50**(2): p. 227-32.
163. Perello, M., et al., *Prolonged but not short negative energy condition restored corticoadrenal leptin sensitivity in the hypothalamic obese rat*. Neuroendocrinology, 2009. **89**(3): p. 276-87.
164. Perello, M., et al., *Adrenal enucleation in MSG-damaged hyperleptinemic male rats transiently restores adrenal sensitivity to leptin*. Neuroendocrinology, 2003. **78**(3): p. 176-84.
165. Moreno, G., et al., *Orexin a stimulates hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis function, but not food intake, in the absence of full hypothalamic NPY-ergic activity*. Endocrine, 2005. **26**(2): p. 99-106.
166. Cabral, A., et al., *Divergent neuronal circuitries underlying orexigenic effects of peripheral or central ghrelin: critical role of brain accessibility*. Journal of Neuroendocrinology, In revision.
167. Tamura, H., et al., *Ghrelin stimulates GH but not food intake in arcuate nucleus ablated rats*. Endocrinology, 2002. **143**(9): p. 3268-75.
168. Briggs, D.I., et al., *Diet-induced obesity causes ghrelin resistance in arcuate NPY/AgRP neurons*. Endocrinology, 2010. **151**(10): p. 4745-55.
169. Perreault, M., et al., *Resistance to the orexigenic effect of ghrelin in dietary-induced obesity in mice: reversal upon weight loss*. Int J Obes Relat Metab Disord, 2004. **28**(7): p. 879-85.
170. Betke, K.M., C.A. Wells, and H.E. Hamm, *GPCR mediated regulation of synaptic transmission*. Prog Neurobiol, 2012. **96**(3): p. 304-21.
171. Prevot, V., F. Langlet, and B. Dehouck, *Flipping the tanycyte switch: how circulating signals gain direct access to the metabolic brain*. Aging (Albany NY), 2013. **5**(5): p. 332-4.