



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

“Estudio de los mecanismos que median el ingreso de la ghrelina plasmática al cerebro”

Tesista: Lic. Maia Uriarte Donati

Director: Dr. Mario Perelló

Año: 2020

AGRADECIMIENTOS	5
ABREVIATURAS	6
INTRODUCCIÓN	8
<hr/>	
1. Ghrelina y su receptor.....	9
2. Accesibilidad de ghrelina al cerebro y sus efectos a nivel central	11
2.1. Blancos de la ghrelina en el hipotálamo	11
2.2. Blancos de la ghrelina en el tallo encefálico	12
2.3. Otros blancos cerebrales de la ghrelina	13
3. Sistemas de transporte de péptidos al cerebro	14
3.1. La barrera hematoencefálica.....	14
3.2. Los órganos circunventriculares.....	16
3.3. La barrera sangre – líquido cefalorraquídeo (LCR).....	18
4. Cambios en la accesibilidad de ghrelina en distintas condiciones fisiológicas	21
5. Mecanismos de transcitosis	22
5.1. Endocitosis.....	22
5.2. Transporte intracelular.....	25
5.3. Exocitosis	25
OBJETIVOS	28
MATERIALES Y MÉTODOS	30
<hr/>	
1. Animales Experimentales.....	31
2. Reactivos	31
3. Variantes de ghrelina utilizadas	33
4. Genotipificación de los ratones	34
5. Cirugías estereotáxicas intra-cerebro-ventriculares (ICV)	34
6. Procedimientos experimentales	35
6.1. Estudio de la capacidad de las células de la barrera sangre-LCR para transportar la ghrelina circulante al cerebro	35
6.2. Desarrollo y caracterización de un cultivo primario de tanicitos de rata	39
6.3. Estudio de la dependencia del GHSR en el transporte de la ghrelina a través de la barrera sangre-LCR.....	43
6.4. Estudio de los mecanismos moleculares por los cuales la ghrelina es internalizada en las células de la barrera sangre-LCR.....	48
7. Perfusión y preparación de muestras de cerebro.....	51

8.	Tinciones e Inmuno-histoquímicas (IHQs) cromogénicas y fluorescentes.....	52
8.1.	Tinciones.....	52
8.2.	IHQs cromogénicas.....	52
8.3.	IHQs fluorescentes simples	52
8.4.	IHQs fluorescentes dobles.....	53
9.	Inmuno-citoquímicas (ICQs).....	54
10.	Análisis neuroanatómicos cuantitativos	55
10.1.	Conteo de células IR para c-fos	55
10.2.	Cuantificación de los perfiles de difusión de F-ghrelina	55
10.3.	Cuantificación de la intensidad de señal fluorescente de análogos fluorescentes de ghrelina.....	56
10.4.	Cuantificación del porcentaje de células con marca fluorescente.....	56
11.	Obtención de imágenes	56
12.	Análisis estadísticos.....	57
RESULTADOS y DISCUSIÓN		58

CAPÍTULO 1: ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE LAS CÉLULAS DE LA BARRERA SANGRE-LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO PARA TRANSPORTAR LA GHRELINA CIRCULANTE AL CEREBRO		59
RESULTADOS.....		60
1.	Estudio de la capacidad de internalización de F-ghrelina de las células que conforman la barrera sangre-LCR.....	60
2.	Estudio de la capacidad de penetración de la F-ghrelina al parénquima cerebral adyacente al tercer ventrículo	63
3.	Estudio de la selectividad de la barrera sangre-LCR	67
4.	Estudio del acceso de la ghrelina circulante al LCR.....	68
5.	Estudio del efecto de bloqueo de la entrada de la ghrelina circulante por la administración central de scr-F-ghrelina o de un anticuerpo anti-ghrelina	69
DISCUSIÓN.....		71
CAPÍTULO 2: DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE UN CULTIVO PRIMARIO DE TANICITOS DE RATA PARA ESTUDIOS <i>IN VITRO</i>		76
RESULTADOS.....		77
1.	Rendimiento del cultivo primario de tanicitos.....	77
2.	Caracterización de las células compatibles con tanicitos	77
2.1.	Caracterización morfológica.....	77
2.2.	Caracterización inmuno-citoquímica	80
2.3.	Caracterización electrofisiológica.....	81

3.	Caracterización de la actividad endocítica de las células con morfología de tanicitos.....	82
4.	Estudio de la capacidad de internalización de rF-ghrelina de los tanicitos en cultivo.....	83
	DISCUSIÓN.....	86
	CAPÍTULO 3: ESTUDIO DE LA DEPENDENCIA DEL GHSR EN EL TRANSPORTE DE LA GHRELINA A TRAVÉS DE LA BARRERA SANGRE-LCR	90
	RESULTADOS.....	91
1.	Estudio <i>in vivo</i> de la dependencia del GHSR en la internalización de rF-ghrelina en las células que conforman la barrera sangre-LCR	91
2.	Estudio de la dependencia del GHSR en el acceso de la ghrelina circulante al LCR	95
3.	Estudio <i>in vitro</i> de la dependencia del GHSR en la internalización de rF-ghrelina en los plexos coroides.....	96
4.	Estudio <i>in vitro</i> de la dependencia del GHSR en la internalización de rF-ghrelina en los tanicitos hipotalámicos.....	97
5.	Medidas de expresión del GHSR en los plexos coroides y en los tanicitos.....	99
	DISCUSIÓN.....	101
	CAPÍTULO 4: ESTUDIO DE LOS MECANISMOS MOLECULARES POR LOS CUALES LA GHRELINA ES INTERNALIZADA EN LAS CÉLULAS DE LA BARRERA SANGRE-LCR	105
	RESULTADOS.....	106
1.	Estudio de los efectos de distintos inhibidores de la endocitosis en la internalización de ghrelina en las células de la barrera sangre-LCR utilizando una estrategia <i>in vitro</i>	106
2.	Estudio de los efectos de distintos inhibidores de la endocitosis en la internalización de ghrelina en las células de la barrera sangre-LCR utilizando una estrategia <i>in vivo</i>	108
3.	Análisis de la expresión de marcadores de endocitosis en los tanicitos hipotalámicos	109
4.	Estudio del proceso de liberación de la ghrelina internalizada en las células de la barrera sangre-LCR.....	111
	DISCUSIÓN.....	114
	DISCUSIÓN GENERAL.....	117
	Aspectos técnicos y metodológicos:	118
	Aspectos conceptuales:	121
	CONCLUSIONES	124
	BIBLIOGRAFÍA.....	126

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecerle en primer lugar a mi director, el Dr. Mario Perelló, quien fue indispensable para el desarrollo de este trabajo de Tesis Doctoral. Gracias Mario por toda tu ayuda, por permitirme trabajar en tu laboratorio, por tu confianza, empuje y dedicación y por darme siempre un punto de vista positivo.

También quiero agradecerles a todos los integrantes del Laboratorio de Neurofisiología que compartieron conmigo todos o algunos de estos años de Tesis. Gracias por ayudarme desde el primer día, por enseñarme y por compartir conmigo largas jornadas de trabajo y también momentos de diversión. Le quiero agradecer especialmente al Dr. Nicolás De Francesco, quien fue en la práctica mi co-director y sin quien mucho de lo descrito en este trabajo no hubiera sido posible. Gracias Nico por tus enseñanzas, tu apoyo, tu tiempo y tu paciencia. También gracias Daniel, por toda tu ayuda con los cultivos, y Marix, por los muchos días compartidos en microscopía.

Gracias a todos mis compañeros becarios, con los que compartimos infinitos mates, charlas y el día a día en el laboratorio. Gracias por hacer los días malos más llevaderos y los días buenos, mucho mejores. En especial, gracias a los que hoy son también mis amigos, por las catarsis, la compañía y las risas.

Tengo que agradecer también al CONICET, a la CIC-PBA y a la UNLP, por brindar los medios necesarios para poder formarme y realizar este trabajo de Tesis Doctoral.

Finalmente, le agradezco infinitamente a mi familia por el apoyo incondicional que siempre me dan y a todas las personas que de una u otra forma me acompañaron en el proceso de realización de este trabajo.

ABREVIATURAS

Acb	Núcleo accumbens
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AgRP	Péptido relacionado a Agouti
AP	Área postrema
ARC	Núcleo arcuato
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
AVT	Área ventral tegmental
CVOs	Órganos circunventriculares
CRF	Factor liberador de corticotropina
DAB	3-3'-diaminobenzidina
DMH	Núcleo dorsomedial hipotalámico
EM	Eminencia media
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GHSR	Receptor de secretagogos de la hormona de crecimiento / Receptor de ghrelina
GOAT	Ghrelina-O-acil transferasa
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
HRP	Peroxidasa de rábano
ICQ	Inmuno-citoquímica
ICV	Intra-cerebro-ventricular
IHQ	Inmuno-histoquímica
IP	Intra-peritoneal
IR	Inmuno-reactiva
IV	Intra-venoso
kDa	Kilo-Dalton
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LCRa	Líquido cefalorraquídeo artificial
LHA	Área hipotalámica lateral
NPY	Neuropéptido Y
NTS	Núcleo del tracto solitario
pb	Pares de bases
PBS	Buffer fosfato-salina
POMC	Pro-opiomelanocortina
PVN	Núcleo paraventricular
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
SC	Subcutáneo
SF	Solución fisiológica
SFB	Suero fetal bovino
VMH	Núcleo ventromedial hipotalámico

WGA	Aglutinina de germen de trigo
WT	Salvaje

INTRODUCCIÓN

1. Ghrelina y su receptor

La ghrelina es una hormona peptídica de 28 aminoácidos esterificada en la Ser3 por un grupo n-octanoico, constituyendo la única hormona peptídica modificada con un ácido graso conocida hasta el momento. La ghrelina es una hormona muy conservada evolutivamente: las secuencias de rata y ratón, idénticas entre sí, difieren en sólo dos aminoácidos de la versión humana¹ (**Figura 1**). Además, los 10 residuos N-terminales de la ghrelina son idénticos para todas las especies de mamíferos, incluyendo al grupo octanoílo, esencial para la unión a su receptor y para su actividad biológica². En todos los vertebrados, la ghrelina es producida principalmente por células oxínticas del fundus del estómago, aunque también se produce en menor medida en el yeyuno, íleon, colon y en otras regiones del sistema gastrointestinal³. Las células productoras de ghrelina sintetizan en primer lugar un péptido de 117 aminoácidos, la pre-pro-ghrelina, que luego es clivado para producir la pro-ghrelina, de 94 aminoácidos. Luego, la pro-ghrelina es modificada por la enzima ghrelina-O-acil transferasa (GOAT, de sus siglas en inglés para *ghrelin-O-acyl transferase*), encargada de añadir un grupo n-octanoílo a la molécula, y posteriormente es clivada nuevamente, lo que da lugar a la hormona ghrelina octanoilada madura de 3371 Da^{4,5}. También existe una versión des-octanoilada de la hormona, la desacil-ghrelina, que no es capaz de unirse al receptor de la ghrelina acilada y cuyas funciones no se conocen claramente, aunque se ha descrito que tiene efectos sobre la glucemia y que puede bloquear los efectos orexigénicos de la ghrelina acilada⁶⁻⁹. La desacil-ghrelina es producida por las mismas células productoras de ghrelina acilada y también se produce en plasma debido a la des-acilación que sufre la ghrelina por la acción de esterasas plasmáticas, por lo que esta forma des-octanoilada representa aproximadamente el 60% del total de ghrelina en circulación¹⁰.

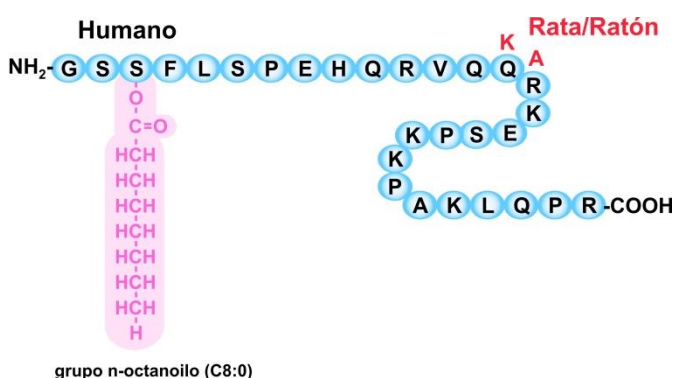


Figura 1. Esquema de la estructura de la ghrelina. La hormona ghrelina está compuesta por 28 aminoácidos, de los cuales únicamente dos difieren en la ghrelina humana respecto de la ghrelina de rata o ratón. Además, contiene un grupo n-octanoílo unido a través de un enlace éster a la Serina 3, el cual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

Los niveles de ghrelina plasmática dependen de las condiciones de balance energético. Estos niveles aumentan en la etapa preprandial a aproximadamente el doble del nivel basal en personas sanas y la hormona vuelve a sus niveles basales una hora después de la ingesta de alimento¹¹. Dicho descenso

postprandial es proporcional a la cantidad de calorías ingeridas y depende del contenido de macronutrientes que se consumió⁸. Los niveles basales de ghrelina se encuentran disminuidos en individuos obesos y no decrecen luego de las comidas, pudiendo favorecer un mayor consumo de alimento¹¹. Por otro lado, los niveles de ghrelina aumentan en situaciones de déficit energético, como un ayuno o una restricción calórica, y también en algunas patologías como la anorexia nerviosa o la caquexia¹²⁻¹⁴. En roedores, los niveles de ghrelina aumentan durante la fase oscura del ciclo luz-oscuridad aproximadamente al doble de su nivel basal y disminuyen durante la fase diurna^{15,16}. Los niveles de ghrelina también se duplican en condiciones de ayuno de 24 o 48 horas y decrecen rápidamente con la realimentación^{8,17}. En ratones sometidos a restricción calórica crónica, los niveles de ghrelina aumentan progresivamente hasta alcanzar niveles de aproximadamente 18 veces su nivel basal al día 7¹⁸. Debido a su carácter anfipático, la ghrelina no circula libremente en la sangre, sino que se encuentra unida a albúmina y a lipoproteínas del plasma, donde su vida media es de aproximadamente 8 a 10 minutos, debido a la des-acilación comentada anteriormente¹⁹⁻²¹.

La ghrelina actúa a través de un único receptor conocido, llamado receptor de secretagogos de la hormona de crecimiento (GHSR, de sus siglas en inglés para *growth hormone secretagogue receptor*), que es un receptor acoplado a proteína G (GPCR, de sus siglas en inglés para *G protein-coupled receptor*) que se expresa en altos niveles en el sistema nervioso central^{22,23}. Existen dos variantes del GHSR, GHSR1a y GHSR1b, generadas por empalme alternativo durante la traducción, pero sólo la versión 1a es funcional, mientras que no se conoce hasta el momento la función que cumple la versión 1b. La ghrelina se une al GHSR a través de su extremo N-terminal, siendo esencial para esta unión el grupo n-octanoílo. La desacil-ghrelina, en cambio, no se une al GHSR y se cree que podría tener otro receptor específico. El GHSR tiene la particularidad de tener una elevada actividad constitutiva (aproximadamente del 50% de su actividad total), es decir que puede desencadenar cascadas de señalización en ausencia de su ligando²⁴. El GHSR1a se acopla a proteínas G_q o G_{i/o} y su cascada de señalización intracelular involucra la activación de las quinasas relacionadas con señal extracelular 1 y 2 (ERK 1/2, de sus siglas en inglés para *extracellular signal-related kinases 1 and 2*)²⁵. Además, el GHSR puede formar heterodímeros con otros GPCRs como por ejemplo el receptor de melanocortina 3 o los receptores de dopamina D1 y D2²⁶. Tanto la actividad constitutiva del GHSR como su capacidad de heterodimerización se han postulado como posibles mecanismos de acción del receptor independientes de ghrelina. Debido a la alta expresión del GHSR en el cerebro, se cree que la ghrelina ejerce gran parte de sus efectos actuando en distintos núcleos cerebrales. Las acciones de la hormona incluyen la modulación de la liberación de la hormona de crecimiento, la homeostasis de la glucosa, la regulación de respuestas relacionadas al estrés y el control de la motilidad gastrointestinal, entre otras^{8,27-29}. Una característica relevante de la ghrelina es su efecto orexigénico, siendo la hormona peptídica conocida más potente en estimular el apetito³⁰. Los efectos orexigénicos de

la ghrelina son rápidos, aumentando el consumo de alimento en los 5 a 10 minutos posteriores a su administración sistémica^{11,31}.

2. Accesibilidad de ghrelina al cerebro y sus efectos a nivel central

La ghrelina ejerce sus acciones actuando principalmente en el hipotálamo y en el tallo encefálico. El hipotálamo se sitúa en el diencefalo, ventral al tálamo y está conformado por distintos núcleos hipotalámicos como el núcleo arcuato (ARC), el núcleo paraventricular hipotalámico (PVN), el núcleo dorsomedial (DMH), el núcleo ventromedial (VMH) y el área hipotalámica lateral (LHA)³².

2.1. Blancos de la ghrelina en el hipotálamo

El ARC es el principal núcleo regulador de la ingesta y del balance energético. Se ubica debajo del VMH, a ambos lados del tercer ventrículo y en aposición a la eminencia media (EM), la cual posee capilares fenestrados que se extienden a la zona ventromedial. En el ARC, existen dos poblaciones principales de neuronas involucradas en el control del balance energético: una población que co-expresa los péptidos orexigénicos péptido relacionado a agouti (AgRP, de sus siglas en inglés para *agouti-related peptide*) y neuropéptido Y (NPY), y otra población que co-expresa los péptidos anorexigénicos transcripto regulado por cocaína y amfetamina y hormona estimulante de melanocitos alfa, un derivado del procesamiento de la pro-opiomelanocortina (POMC)³².

Existen evidencias directas de que la ghrelina plasmática accede a la región ventromedial del ARC³³, la cual está enriquecida en neuronas que expresan el GHSR. El blanco principal de la ghrelina en el ARC son las neuronas que sintetizan AgRP y NPY³⁴. La ghrelina necesita de la presencia de estas neuronas para aumentar el consumo de alimento³⁵ y, además, la presencia del GHSR exclusivamente en estas neuronas es suficiente para que se produzcan sus efectos orexigénicos³⁶. La ghrelina administrada de forma sistémica no es capaz de ejercer sus efectos orexigénicos en ratones con el ARC ablacionado, mientras que la ghrelina administrada de forma central (intra-cerebro-ventricular, ICV) sí estimula el apetito en dichos ratones³⁷. Estos resultados indican que la ghrelina circulante actúa preferentemente sobre el ARC, a pesar de que el cerebro contiene otros núcleos capaces de mediar sus efectos orexigénicos.

Otro núcleo hipotalámico importante en el sistema de ghrelina/GHSR es el PVN. El PVN se ubica a ambos lados de la parte dorsal del tercer ventrículo cerebral y contiene neuronas que producen distintos neuropéptidos como por ejemplo el factor liberador de corticotropina (CRF, de sus siglas en inglés para *corticotropin releasing factor*). Las neuronas CRF controlan la actividad del eje hipotálamo-hipofiso-adrenal y reciben inervaciones de distintos sitios del cerebro, siendo reguladas por neurotransmisores como ácido γ -aminobutírico (GABA, de sus siglas en inglés para *γ -aminobutyric acid*), glutamato, NPY, catecolaminas y serotonina³⁸. Cuando se inyecta ghrelina por vía subcutánea (SC) en dosis elevadas (600

pmol/g de peso corporal) se observa activación de las neuronas CRF del PVN, mientras que una dosis de 60 pmol/g no es capaz de lograr este efecto^{36,37}. La ghrelina administrada de forma sistémica activa las neuronas CRF en ratones que poseen el ARC ablacionado, pero no lo hace en ratones que poseen el GHSR expresado únicamente en el ARC³⁶. Estos resultados indicarían que la ghrelina accede directamente al PVN. En el PVN, sin embargo, la ghrelina no actúa directamente sobre las neuronas CRF, dado que éstas no tienen expresión del GHSR, sino que las activa de forma indirecta^{36,37,39}. Así, la activación de las neuronas CRF del PVN por ghrelina ocurre de forma independiente del ARC en condiciones de balance energético normal³⁶. De esta forma, puede hipotetizarse que pequeñas elevaciones en los niveles de ghrelina plasmática, como los que ocurren en un ayuno de 12 horas, impactarán únicamente en el ARC aumentando el consumo de alimento, mientras que aumentos mayores en los niveles de ghrelina acceden a otras regiones del cerebro como el PVN, induciendo una respuesta de los ejes relacionados al estrés.

2.2. Blancos de la ghrelina en el tallo encefálico

El tallo encefálico también tiene un papel principal en el control del balance energético, a través del procesamiento de la información energética en cuatro niveles: 1) el sensado de metabolitos en circulación, 2) las aferencias vagales del tracto gastrointestinal, 3) las aferencias neuronales de regiones del cerebro anterior y medio, y 4) la proyección de sus neuronas a zonas del propio tronco cerebral y a otras regiones del cerebro³². Dentro del tronco cerebral, el complejo dorsal del vago es el principal centro regulador de la integración de señales energéticas sistémicas. El complejo dorsal del vago está formado por el área postrema (AP), el núcleo del tracto solitario (NTS) y complejo motor dorsal del vago.

El AP es un órgano circunventricular (CVO) ubicado en la superficie dorsal de la médula, justo por encima del cuarto ventrículo. Contiene una gran variedad de neuronas, principalmente glutamatérgicas y GABAérgicas⁴⁰. El AP controla funciones del sistema nervioso autónomo, como la función cardiovascular, el balance de fluidos y el balance energético⁴⁰. El AP inerva al NTS, el cual se puede dividir en una región rostral, que recibe aferencias gustativas y oro-táctiles, y una región caudal, que recibe aferencias del sistema cardiovascular, de las vísceras y del sistema respiratorio vía el nervio vago⁴¹.

El AP constituye un blanco de la ghrelina plasmática. Tanto el AP como el NTS contienen neuronas que expresan el GHSR^{27,42-44}. La ghrelina inyectada por vía SC (300 pmol/g) accede al AP, donde activa las neuronas que expresan el GHSR, y no al NTS²⁷. Se ha descrito que esto se debe a la presencia de una barrera llamada *funiculus separans*, que actúa como una barrera física evitando que el NTS sense cambios rápidos en los niveles de moléculas plasmáticas, mientras que esto sí puede hacerlo el AP, transmitiendo la información al NTS a través de sus inervaciones. En apoyo de esta hipótesis, se ha mostrado que la ghrelina administrada de forma sistémica activa c-fos en el NTS de animales con el AP intacta, pero no en animales con el AP ablacionada⁴⁵. En el AP, la ghrelina actúa sobre neuronas GABA que son necesarias

para mediar su efecto sobre el vaciado gástrico, pero no su efecto orexigénico²⁷. En resumen, el AP constituye un núcleo crítico al cual la ghrelina en circulación puede acceder y ejercer sus efectos, que serán transmitidos al NTS para regular funciones autonómicas.

2.3. Otros blancos cerebrales de la ghrelina

La ghrelina es capaz de actuar en núcleos alejados de los CVOs o de los ventrículos cerebrales, como es el caso del área ventral tegmental (AVT). El AVT se encuentra en la base de la porción media del cerebro y posee principalmente neuronas productoras de dopamina. El AVT forma parte del circuito mesolímbico, en el cual sus neuronas dopaminérgicas envían proyecciones hacia el núcleo accumbens (Acb), ubicado en el estriado ventral, en la parte anterior del cerebro⁴⁶. En el circuito mesolímbico, las neuronas que expresan el GHSR se encuentran principalmente en el AVT²³ y se describió que inyecciones de ghrelina realizadas en este núcleo aumentan el consumo de alimento, el consumo de alcohol, la actividad locomotora y los comportamientos sexuales^{43,47-49}. Algunos estudios en ratones muestran que la ghrelina plasmática accede y actúa sobre el circuito mesolímbico. En particular, la ghrelina inyectada de forma sistémica aumenta la liberación de dopamina en el Acb, la actividad locomotora y la preferencia por un lugar condicionado, por dietas altas en grasa y por sacarina⁵⁰⁻⁵³. Como mencionamos antes para otros núcleos, los efectos de la ghrelina sobre el circuito mesolímbico dependen de las dosis utilizadas, observándose con dosis del orden de 600 pmol/g pero no así con dosis 10 veces menores. Además, se mostró que se puede bloquear el efecto orexigénico de la ghrelina intra-AVT utilizando antagonistas del GHSR, lo cual es considerado otra evidencia de que la ghrelina alcanza dicho núcleo⁵⁴. Por otro lado, es importante aclarar que no existen en la bibliografía evidencias directas de que la ghrelina plasmática acceda al circuito mesolímbico.

El hipocampo es una estructura cortical ubicada en el lóbulo temporal medio del cerebro que también contiene neuronas que expresan el GHSR^{23,42,44}. Cuando se inyecta la ghrelina de forma central (ICV) en ratones y ratas se mejora el desempeño de los animales en tareas relacionadas con el aprendizaje y la memoria^{55,56}. Algunas evidencias indican que la ghrelina sistémica es capaz de impactar en el hipocampo de ratones. En particular, se describió que la ghrelina inyectada por vía intra-peritoneal (IP) en ratones aumenta la densidad de espinas dendríticas en el hipocampo y aumenta la proliferación y diferenciación de células progenitoras neurales del giro dentado del hipocampo en animales adultos⁵⁷⁻⁶⁰. Al contrario que lo observado con las inyecciones centrales de ghrelina, uno de estos estudios encontró que la ghrelina administrada de forma sistémica no afecta la formación de memoria espacial dependiente del hipocampo, evaluada con pruebas como el laberinto de Morris o pruebas de reconocimiento de objetos novedosos⁶⁰. Sin embargo, otro estudio encontró que mejoraba el desempeño en estas tareas⁶¹. Otro trabajo mostró que las inyecciones sistémicas de ghrelina aumentan la expresión de c-fos y de un

factor de transcripción neurogénico pero no aumenta la proliferación celular^{57,60-62}. Así, la bibliografía es contradictoria en cuanto a la capacidad de ghrelina plasmática de acceder al hipocampo y de ejercer efectos directos sobre el mismo. Una hipótesis sugiere que los efectos que se observan con la ghrelina sistémica no se deben a un impacto directo de la hormona sobre el hipocampo, sino a la acción del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1, de sus siglas en inglés para *insulin-like growth factor 1*), cuya producción es estimulada por ghrelina y se sabe que tiene efectos en la neurogénesis del hipocampo⁶³.

3. Sistemas de transporte de péptidos al cerebro

La ghrelina no se sintetiza en el cerebro⁶⁴, por lo que debe ser transportada desde la sangre a los sitios de acción para cumplir sus efectos. Las hormonas peptídicas pueden acceder al cerebro a través de tres mecanismos principales: atravesando la barrera hematoencefálica, difundiendo a través de capilares fenestrados en los CVOs, o atravesando la barrera sangre-líquido cefalorraquídeo (LCR) (**Figura 2**).

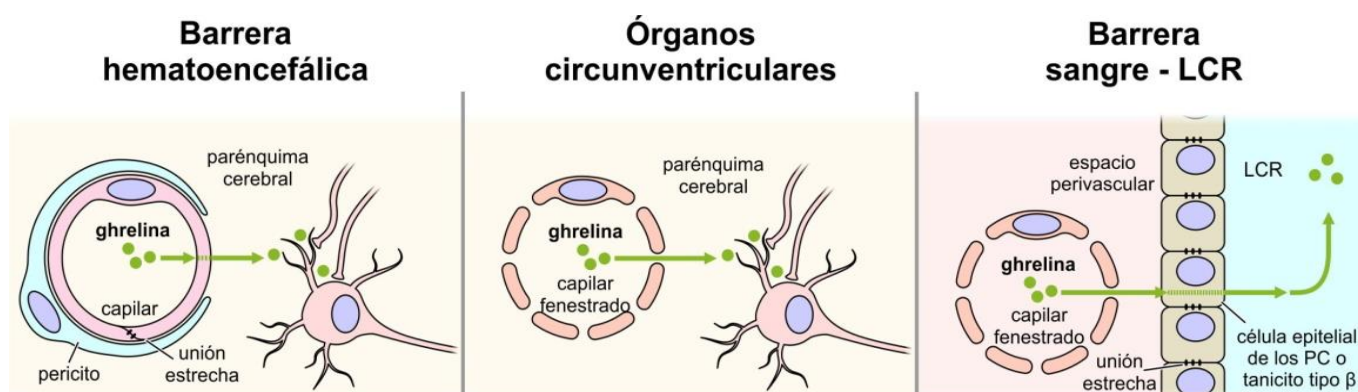


Figura 2. Posibles mecanismos de entrada al cerebro de hormonas peptídicas. La figura ilustra de manera esquemática los tres posibles mecanismos descritos para el transporte de una hormona peptídica al cerebro desde la sangre: a través de la barrera hematoencefálica, a través de los órganos circunventriculares, y a través de la barrera sangre-LCR. Modificada de *Perello et al.*⁶⁵.

3.1. La barrera hematoencefálica

La barrera hematoencefálica es una barrera de permeabilidad altamente selectiva presente en el cerebro, que separa la sangre que circula por los capilares sanguíneos del parénquima cerebral. La barrera hematoencefálica se encuentra en la mayoría de los capilares del cerebro y es esencial para el mantenimiento de las condiciones homeostáticas particulares del mismo. Esta barrera está formada por dos tipos de células: las células endoteliales y las células murales, que rodean a las primeras⁶⁶. Las células endoteliales son muy delgadas y forman las paredes de los vasos sanguíneos. Estas células previenen el pasaje libre de moléculas debido a la existencia de uniones estrechas entre ellas, que no permiten el transporte paracelular por difusión simple y presentan una polarización de la membrana, distinguiéndose

una membrana basal (en contacto con las células del parénquima cerebral) y una apical (en contacto con la sangre)⁶⁶. La presencia de uniones estrechas entre las células es lo que les confiere la capacidad de actuar como barrera. Las uniones estrechas están formadas por dos tipos de proteínas: claudinas y ocludinas, que están unidas a proteínas reguladoras como *zonula occludens* ZO-1, ZO-2, ZO-3 y *cingulina* que, a su vez, están conectadas a las proteínas actina y miosina del citoesqueleto⁶⁶. Las células murales incluyen las células de músculo liso y los pericitos. Los pericitos están embebidos en la membrana vascular basal, una matriz extracelular formada principalmente por glicoproteínas secretadas por estas células. Los pericitos cumplen un rol importante durante la formación de la barrera hematoencefálica y regulan la angiogénesis y el flujo sanguíneo, entre otras funciones. Además de las células murales, astrocitos y células del sistema inmune (macrófagos y microglía) se encuentran en íntimo contacto con las células endoteliales y forman lo que se conoce como “unidad neurovascular”⁶⁷. La barrera hematoencefálica es esencial para la homeostasis cerebral, manteniendo un ambiente estable para la función neuronal a través de la regulación del transporte y la concentración de iones, macromoléculas y nutrientes y previniendo la entrada de sustancias tóxicas al cerebro⁶⁶.

La barrera hematoencefálica puede transportar moléculas de la sangre al cerebro, o en el sentido inverso, utilizando distintos mecanismos. Algunas moléculas liposolubles, como los gases, pueden difundir pasivamente al interior del cerebro, mientras que otras necesitan un transportador específico. Los transportadores específicos, como los que están descritos para la glucosa, los aminoácidos o algunos péptidos pequeños, pueden encontrarse en la membrana basal de las células endoteliales, en la apical, o en ambas. Además, existen transportadores dependientes de ATP, que son proteínas transmembrana formadas por varias subunidades y que contienen una o más ATPasas asociadas, que proveen la energía necesaria para el transporte de los metabolitos y que tienen un rol importante en la expulsión de sustancias potencialmente tóxicas del cerebro⁶⁸. Por último, un mecanismo de transporte importante es la transcitosis de macromoléculas, como péptidos y proteínas, que consiste en un proceso de endocitosis seguido de un transporte a la membrana opuesta y finalmente una exocitosis. La transcitosis puede estar mediada por un receptor específico o ser adsorptiva, en la cual moléculas con carga positiva se asocian con zonas cargadas negativamente de la membrana celular por interacción electrostática⁶⁶.

El transporte de ghrelina a través de la barrera hematoencefálica fue inicialmente estudiado por Banks y colaboradores, quienes utilizaron ghrelina radioactiva por la introducción de ¹³¹I en el residuo 9 de histidina⁶⁹. En este estudio, se inyectaron ratones por vía ICV o intravenosa (IV) con ghrelina humana, ghrelina de ratón o ghrelina desacilada de ratón. Seguidamente se analizó el flujo de estos péptidos desde la sangre hacia el cerebro (influjo) utilizando un análisis de regresión lineal múltiple del cociente entre la radioactividad presente en el cerebro y la radioactividad presente en la sangre (cerebro/sangre) de los ratones inyectados por vía IV con los péptidos. La salida de los péptidos desde el cerebro a la sangre

(eflujo), se estimó analizando la radioactividad remanente en el cerebro a distintos tiempos, en los ratones que habían sido inyectados con los péptidos por vía ICV. Además, la penetración en el cerebro de los péptidos fue estudiada con el método de la depleción capilar, en el cual los vasos sanguíneos son removidos de los homogenatos de tejido cerebral. Este estudio concluyó que los tres péptidos difieren en la forma de acceso al cerebro. En particular, la ghrelina humana sería transportada tanto desde la sangre al cerebro como desde el cerebro a la sangre por un mecanismo de transporte saturable, mientras que la ghrelina de ratón únicamente sería transportada de forma saturable desde el cerebro a la sangre, mientras que no se detectó transporte significativo en el sentido inverso. Además, se determinó que la ghrelina desacilada podía ser transportada desde la sangre al cerebro, pero no en el sentido inverso, por un mecanismo no saturable⁶⁹. En conjunto, este estudio concluye que únicamente la ghrelina humana y la ghrelina desacilada pueden acceder al cerebro desde la sangre a través de la barrera hematoencefálica en el ratón, mientras que la ghrelina de ratón no es capaz de acceder al cerebro cruzando la barrera hematoencefálica. Un estudio posterior mostró, utilizando la misma metodología, que las zonas del cerebro con mayor incorporación de ghrelina radioactiva inyectada sistémicamente son la corteza occipital, los bulbos olfatorios y el hipotálamo, en ese orden⁵⁷. Otros estudios mostraron que la accesibilidad de la ghrelina al cerebro se modifica por el estado nutricional del animal, siendo menor en ratones obesos y mayor en casos de hipertrigliceridemia, y que el transporte a través de la barrera hematoencefálica es independiente del GHSR^{70,71}. Un estudio *in vitro* mostró que la ghrelina radioactiva puede interactuar con células RBE4, una línea celular endotelial de capilares sanguíneos cerebrales⁷². En particular, se observó que una fracción (6.6%) de ¹³¹I-ghrelina se une a la superficie de estas células cuando se la adiciona en un cultivo celular y que esta unión decrece a lo largo del tiempo. Además, este estudio muestra que una fracción (2.5%) de la ¹³¹I-ghrelina es endocitada por las células endoteliales y, a continuación, es liberada intacta al medio extracelular y que un exceso de ghrelina no marcada bloquea este proceso, sugiriendo un transporte saturable.

3.2. Los órganos circunventriculares

Algunos péptidos plasmáticos pueden acceder al cerebro a través de los CVOs. Los CVOs son zonas del cerebro que tienen una vasculatura permeable, debido a la presencia de fenestraciones en los capilares sanguíneos⁷³. Las células endoteliales de los capilares fenestrados tienen poros de 30 a 80 nm de diámetro que las atraviesan y permiten el pasaje por difusión simple de ciertas moléculas, dependiendo de su tamaño y su carga. En los mamíferos se han descrito 7 CVOs, los cuales, a excepción de los plexos coroideos, consisten en estructuras impares que se ubican en la línea medial del cerebro y pueden clasificarse como CVOs sensoriales o secretorios.

Los CVOs sensoriales permiten al cerebro monitorear las señales provenientes de la sangre o del LCR y contienen neuronas que extienden sus axones hacia zonas que están protegidas por la barrera hematoencefálica. Estos CVOs cumplen un rol importante en el mantenimiento de la homeostasis, por ejemplo controlando la presión osmótica o el movimiento de moléculas entre la sangre y el LCR tales como el sodio o la angiotensina II⁷⁴⁻⁷⁶. Los CVOs sensoriales incluyen el órgano subfornical, el órgano vasculoso de la lámina terminal y el AP.

Los CVOs secretorios contienen axones a través de los cuales algunas neuronas pueden secretar moléculas a la sangre; los somas y las dendritas de dichas neuronas se encuentran en zonas protegidas por la barrera hematoencefálica⁷³. Por ejemplo, la oxitocina y la arginina-vasopresina son neuropéptidos secretados a circulación por terminales axónicas presentes en la neurohipófisis⁷⁷ y la hormona liberadora de gonadotropina es secretada desde terminales axónicas provenientes del hipotálamo a la EM⁷⁸. La EM se ubica en la parte medial inferior del hipotálamo, por debajo del tercer ventrículo cerebral. Se encuentra rodeada lateralmente por el ARC, posterior al quiasma óptico y anterior al infundíbulo que conecta al hipotálamo con la hipófisis^{79,80}. La EM puede dividirse en una zona interna y una externa. La zona interna contiene los axones de neuronas magnocelulares del núcleo supraóptico y del PVN, que proyectan a la neurohipófisis. La zona externa contiene los capilares fenestrados del sistema porta-hipofisario y terminales axónicas de neuronas hipofisiotrópicas secretorias. Los capilares presentes en la EM externa no sólo reciben las hormonas liberadas por el hipotálamo y las transportan hacia la adenohipófisis, sino que también permiten la difusión de moléculas desde la sangre hacia el espacio perivascular⁷⁹. Una característica importante de estos vasos fenestrados es que se extienden hacia la parte ventromedial del ARC, permitiendo la llegada de moléculas plasmáticas a este núcleo⁸¹. Los estudios iniciales de la accesibilidad de moléculas circulantes al cerebro se realizaron con peroxidasa de rábano (HRP, de sus siglas en inglés para *horseradish peroxidase*) y observaron que la HRP accedía en primer lugar a los CVOs y luego al ARC⁸², concluyendo que esta tinción era el resultado del transporte retrógrado de la HRP por neuronas del ARC que proyectan sus axones a la EM. La EM contiene tanicitos, que son células endoteliales modificadas que recubren las paredes de la base del tercer ventrículo. Los tanicitos están formados por un cuerpo celular que contacta con el LCR del tercer ventrículo y una prolongación basal larga cuya zona terminal o *endfeet* se extiende hacia el parénquima cerebral o la zona externa de la EM⁸⁰. Los plexos coroideos, por otra parte, son estructuras presentes en los ventrículos cerebrales que producen el LCR a través del filtrado de la sangre y algunos autores no los consideran CVOs debido a que no poseen neuronas, si bien los capilares presentes en ellos se encuentran fenestrados.

La accesibilidad de ghrelina circulante al cerebro a través de los CVOs se estudió utilizando principalmente análogos fluorescentes de la ghrelina. Estos análogos se encuentran modificados en la región C-terminal y mantienen intacta la zona N-terminal, por lo que presentan una bioactividad similar a

la ghrelina nativa^{42,83,84}. El uso de moléculas fluorescentes ha demostrado ser muy útil para realizar estudios neuroanatómicos más precisos que los que se pueden llevar a cabo utilizando ghrelina radioactiva y también para estimar la cantidad de dicha molécula presente en una región a través de la cuantificación directa de la fluorescencia. Schaeffer y colaboradores utilizaron un análogo de ghrelina consistente en la molécula entera de ghrelina nativa, a la cual se le adicionó un fluoróforo DY647 en su extremo C-terminal (FL-rF-ghrelina, de sus siglas en inglés para *full length-red fluorescent-ghrelin*). El péptido posee un peso molecular de 3,8 kDa y se utilizó en una dosis de 17 nmol/ratón. Luego, se analizó *in vivo* la extravasación de la FL-rF-ghrelina en la EM utilizando un microscopio de excitación de dos fotones en conjunto con un objetivo de gran distancia de trabajo. En este estudio se encontró que la FL-rF-ghrelina presente en el plasma difunde a través de los vasos fenestrados ubicados en la EM. Además, se mostró que la FL-rF-ghrelina inyectada de manera sistémica (25 nmol/ratón, IV) accede al ARC ventromedial, donde se une a neuronas orexigénicas cercanas a los vasos fenestrados que se extienden desde la EM. En cambio, el análogo de ghrelina no es capaz de unirse a neuronas de regiones protegidas por la barrera hematoencefálica, como el hipocampo³³. En un estudio independiente, se analizó la accesibilidad de otro análogo de ghrelina (F-ghrelina), el cual está compuesto por los primeros 19 aminoácidos de la hormona y una molécula de isotiocianato de fluoresceína en el extremo C-terminal (2,7 kDa). Para ello, se inyectó la F-ghrelina por vía SC en ratones en dos dosis diferentes (60 pmol/g y 600 pmol/g) y se evaluaron los sitios en los cuales aumentó c-Fos, un marcador de activación neuronal, así como los que mostraron señal fluorescente por unión de la hormona. Se encontró que la hormona inyectada en la dosis de 60 pmol/g accede únicamente y activa el ARC y la EM. Por otro lado, la ghrelina inyectada en una dosis de 600 pmol/g accede tanto al ARC y a la EM como al AP y activa, además de a estos núcleos, al NTS y al PVN³⁷. En este estudio se midieron los valores plasmáticos de ghrelina que se alcanzaron con cada una de las dosis y se encontró que con 60 pmol/g se alcanza en plasma una concentración de ghrelina del doble del nivel basal a los 30 min post-inyección, mientras que para la dosis de 600 pmol/g se alcanza una concentración ~17 veces más alta que la concentración basal. En un estudio posterior se mostró que la F-ghrelina inyectada por vía SC en una dosis de 300 pmol/g accede al AP y aumenta el vaciado gástrico actuando sobre neuronas GABAérgicas²⁷. Así, diferentes trabajos utilizando marcadores fluorescentes muestran que la ghrelina puede acceder al cerebro a través de los CVOs.

3.3. La barrera sangre – líquido cefalorraquídeo (LCR)

Algunas moléculas acceden al cerebro atravesando la barrera entre la sangre y el LCR. La barrera sangre-LCR es una compleja interfase entre la sangre presente en los capilares fenestrados y el LCR presente en los ventrículos cerebrales, que está formada por dos tipos de células: las células epiteliales de los plexos coroideos y un tipo de tanicitos hipotalámicos^{80,85} (**Figura 3**).

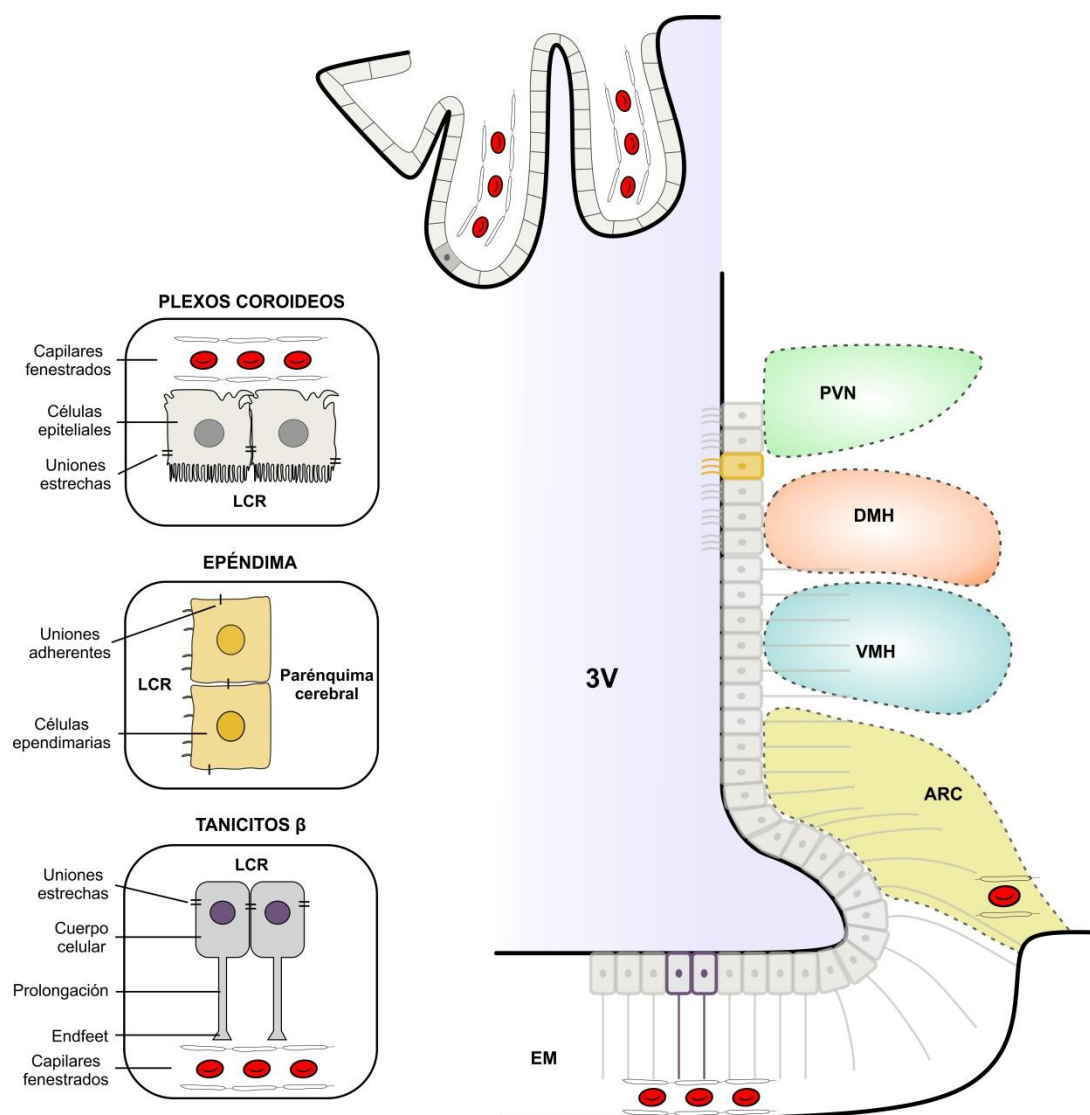


Figura 3. Esquema de las células que forman la barrera sangre-LCR a nivel del tercer ventrículo cerebral. La figura ilustra de manera esquemática la ubicación neuroanatómica y las características principales de las células ependimarias de la zona dorsal del tercer ventrículo y de las células que forman la barrera sangre-LCR: los plexos coroideos y los tanicitos hipotalámicos β . 3V: tercer ventrículo cerebral. Modificada de Rodríguez *et al.*⁸⁰.

Plexos coroideos

Los plexos coroideos están formados por una capa simple de células epiteliales cuboidales, polarizadas en un lado apical, en contacto con el LCR y que contiene numerosas microvellosidades, y un lado basal, en contacto con una red de capilares fenestrados que se extiende por el interior de los plexos coroideos. Los plexos coroideos tienen la función principal de producir el LCR, generando aproximadamente el 80% del mismo⁸⁶. Además, las células epiteliales de los plexos coroideos cumplen una función de barrera debido a tres características principales: 1) funcionan como una barrera física que limita el pasaje de moléculas, debido a la presencia de uniones estrechas entre ellas; 2) constituyen una barrera enzimática debido a la expresión de enzimas que degradan péptidos y otras sustancias; y 3)

tienen la capacidad de transportar moléculas a través de ellas, debido a la presencia de diferentes transportadores. Esta última característica permite la entrada de nutrientes al LCR, como por ejemplo glucosa, y la eliminación de desechos del LCR a la sangre^{87,88}.

Tanicitos hipotalámicos

Los tanicitos hipotalámicos son células endimarias modificadas que recubren la base del tercer ventrículo. En la pared del tercer ventrículo pueden distinguirse tres zonas, diferenciadas por el tipo de células que la revisten: 1) una zona dorsal, que está revestida de una capa de células endimarias; 2) una zona de transición, donde las células endimarias están intercaladas con tanicitos; y 3) una zona ventral, al nivel del ARC y de la EM, que está recubierta sólo por tanicitos. Las células endimarias son células cuboidales, que poseen cilias en su cara apical que movilizan el LCR y tienen pocos procesos cortos^{89,90}. Los tanicitos (palabra proveniente del griego *tanus*, "elongado") son células bipolares que poseen un cuerpo apical en la pared del ventrículo, una prolongación que proyecta a distintas regiones del hipotálamo y una zona terminal o *endfeet* basal que contacta con vasos⁸⁹. Por su localización y sus características, los tanicitos se agrupan en dos tipos: tanicitos α y tanicitos β . Los tanicitos α proyectan al DMH, al VMH y a la zona más dorsal del ARC, mientras que los β proyectan al ARC ventromedial y a la EM. Los tanicitos β se distinguen de los α en dos características principales: 1) los tanicitos β poseen uniones estrechas entre ellos, por lo que cumplen una función de barrera; y 2) los *endfeet* de los tanicitos β contactan vasos de la EM que se encuentran fenestrados⁸⁹. Los tanicitos β actúan como un puente que conecta el LCR del interior del tercer ventrículo con la sangre en el interior de los capilares fenestrados de la EM⁷⁹. Los tanicitos β no sólo controlarían la liberación de neuropéptidos de las terminales axónicas presentes en la EM, como de la hormona liberadora de gonadotropina o de la hormona liberadora de tirotrina^{91,92}, sino que también transportarían moléculas circulantes al LCR^{79,93}. Además, se ha propuesto que los tanicitos sensorían los niveles de glucosa en la sangre^{94,95} y otras señales metabólicas. Por último, se ha descrito que una población de tanicitos tiene propiedades de células madre^{96,97}.

La concentración de ghrelina en el LCR es mucho menor que en plasma. Grouselle y colaboradores midieron los niveles de la hormona en plasma y en el LCR de ovejas en condiciones basales y post-inyección IV de ghrelina⁹⁸. En este trabajo observaron que los niveles de ghrelina en el LCR son pulsátiles y que aproximadamente la mitad de los picos de la hormona en el LCR ocurren luego de un pico de ghrelina en plasma. Además, observaron que cuando se administra la ghrelina de forma sistémica (~330 nmol/animal, IV) hay un aumento subsiguiente de la concentración de la hormona en el LCR, sugiriendo que hay un transporte desde la sangre hacia el LCR. Este estudio muestra que la concentración de ghrelina en plasma es de ~1000 veces mayor que en el LCR⁹⁸. En un trabajo de nuestro laboratorio, previo al inicio de esta Tesis Doctoral, se mostró que la ghrelina inyectada por vía SC (60 pmol/g) es detectada en los tanicitos a los 15 minutos post-inyección³⁷. Al poco tiempo de iniciado este trabajo de Tesis, surgió una

evidencia adicional de que los tanicitos serían capaces de internalizar la ghrelina. Específicamente, un estudio de Collden y colaboradores en el cual administraron FL-rF-ghrelina a ratones (25 nmol/ratón, IV) y la detectaron en los tanicitos a los 5 minutos post-administración. En este estudio también encontraron que los tanicitos de rata en cultivo pueden internalizar la ghrelina fluorescente y que dicha señal colocaliza con señal inmuno-reactiva (IR) para clatrina⁹⁹.

Los trabajos mencionados son, en nuestro conocimiento, los únicos que sugieren que los tanicitos pueden captar análogos de ghrelina. Sin embargo, no se habían realizado estudios sistemáticos donde se analice el posible transporte de la ghrelina a través de la barrera sangre-LCR. El rol de los plexos coroideos como posible vía de acceso de la ghrelina plasmática al cerebro no había sido estudiado con anterioridad.

4. Cambios en la accesibilidad de ghrelina en distintas condiciones fisiológicas

La accesibilidad de la ghrelina a sus blancos cerebrales parece modificarse con el estado nutricional, ya sea por déficit energético o en modelos de obesidad.

Collden y colaboradores estudiaron los efectos de la ghrelina en un modelo de ratón con obesidad neonatal, por crianza en camadas pequeñas, que causa obesidad en la vida adulta⁹⁹. En este trabajo encontraron que los patrones de secreción de ghrelina a la sangre se encuentran alterados y que los niveles de ácido ribonucleico (ARN) mensajero (ARNm) tanto de ghrelina como del GHSR son mayores en la etapa postnatal, aunque estas diferencias desaparecen en la adultez. Este trabajo también muestra que los ratones obesos poseen una respuesta reducida al tratamiento sistémico con ghrelina en lo que se refiere a la inducción de c-fos en el ARC y al aumento de los niveles de ARNm de AgRP y NPY en dicho núcleo en la etapa postnatal, comparado con animales control. Sin embargo, la ghrelina administrada por vía ICV induce similares niveles de activación del ARC que en los ratones control. En este trabajo también realizan inyecciones sistémicas de ghrelina en las crías control y en las obesas y luego miden ghrelina por western blot en el hipotálamo medio-basal (incluyendo el ARC). Aquí encuentran que el hipotálamo de los ratones control contiene importantes cantidades de ghrelina, mientras que en el de los ratones obesos no se detecta⁹⁹. Estos datos sugieren que en este modelo de obesidad neonatal existe una disminución en la accesibilidad de la ghrelina al hipotálamo, en particular al ARC.

En el trabajo de Schaeffer y colaboradores mencionado antes, se muestran evidencias de que la accesibilidad del análogo fluorescente de ghrelina al ARC depende del estado metabólico y energético del animal. Este estudio muestra que el número de neuronas NPY marcadas con FL-rF-ghrelina es mayor en los ratones ayunados inyectados de manera sistémica con el análogo fluorescente, respecto a los alimentados, mientras que no hay diferencias en el número de neuronas POMC marcadas. En los animales que fueron ayunados durante 24 horas y luego realimentados durante otras 24 horas, se revirtió el aumento de marca con la FL-rF-ghrelina, siendo indistinguible de los animales alimentados³³.

Otros trabajos también ponen de manifiesto que la cantidad de ghrelina que accede a los núcleos hipotalámicos, principalmente en el ARC, varía según el estado fisiológico del animal. Langlet y colaboradores mostraron que en el ayuno se modifica la organización de las uniones estrechas entre los tanicitos y que aumenta la permeabilidad a través de los vasos fenestrados de la EM que se extienden al ARC ventromedial, provocando el mayor acceso de la ghrelina al ARC¹⁰⁰. Específicamente, dicho estudio utilizó inmuno-histoquímica contra proteínas que conforman las uniones estrechas presentes en los tanicitos como ZO-1, ocludina 1 y claudina-1 y contra un marcador de capilares fenestrados, para comparar el hipotálamo de ratones ayunados con el de ratones alimentados *ad libitum*. Los resultados mostraron que el ayuno aumenta la organización de los complejos de uniones estrechas tanto en la EM como en el ARC ventromedial, observándose un patrón intensificado de estructuras en forma de panal de abeja formadas por ZO-1 y ocludina-1 en la cara apical de los tanicitos β . Claudina-1 también mostró una mayor organización con el ayuno. Además, aumentaron las fenestraciones en los capilares de la EM que se extienden al ARC. Los cambios observados en el ayuno se revirtieron cuando los ratones fueron realimentados por 24 horas. Además, en este trabajo sugieren que los niveles bajos de glucosa serían detectados por los tanicitos y que esto induciría los cambios morfológicos observados. Por último, el acceso del colorante Evans Blue al ARC ventromedial aumenta en ratones ayunados inyectados de manera sistémica con este trazador, sugiriendo que las remodelaciones observadas en el ayuno provocan un aumento en la accesibilidad al ARC de moléculas circulantes¹⁰⁰.

5. Mecanismos de transcitosis

La transcitosis describe el transporte de moléculas desde una cara de una célula polarizada, como puede ser una célula epitelial de los plexos coroides o endotelial, hacia la otra cara, a través del tránsito intracelular en vesículas. Los ejemplos más estudiados de transcitosis son la transcitosis de inmunoglobulina A, de transferrina y de lipoproteínas de baja densidad, a través de sus respectivos receptores¹⁰¹. La transcitosis incluye una primera etapa de endocitosis, una segunda etapa de transporte intracelular y una tercera etapa de exocitosis. La transcitosis puede ser mediada por un receptor específico o puede ser de tipo adsortiva, en la cual las moléculas se unen a regiones de la membrana de manera inespecífica debido a interacciones electrostáticas¹⁰².

5.1. Endocitosis

El término endocitosis se refiere al proceso por el cual la célula internaliza moléculas, englobándolas en una invaginación de la membrana plasmática, formando una vesícula endocítica que termina por desprenderse de la membrana para incorporarse al citoplasma. La endocitosis permite a las células el censado continuo del medio externo, ya sea la presencia de nutrientes o de agentes infecciosos¹⁰³.

Existen al menos dos mecanismos diferentes de endocitosis, unos mediados por clatrina y otros independientes de clatrina, entre los cuales el más común es la endocitosis mediada por caveolina. También existen otros procesos que son independientes tanto de clatrina como de caveolina como la macropinocitosis o la fagocitosis¹⁰⁴. Una característica que comparten todos estos mecanismos es el requerimiento de la actina y del citoesqueleto para poder ocurrir (**Figura 4**).

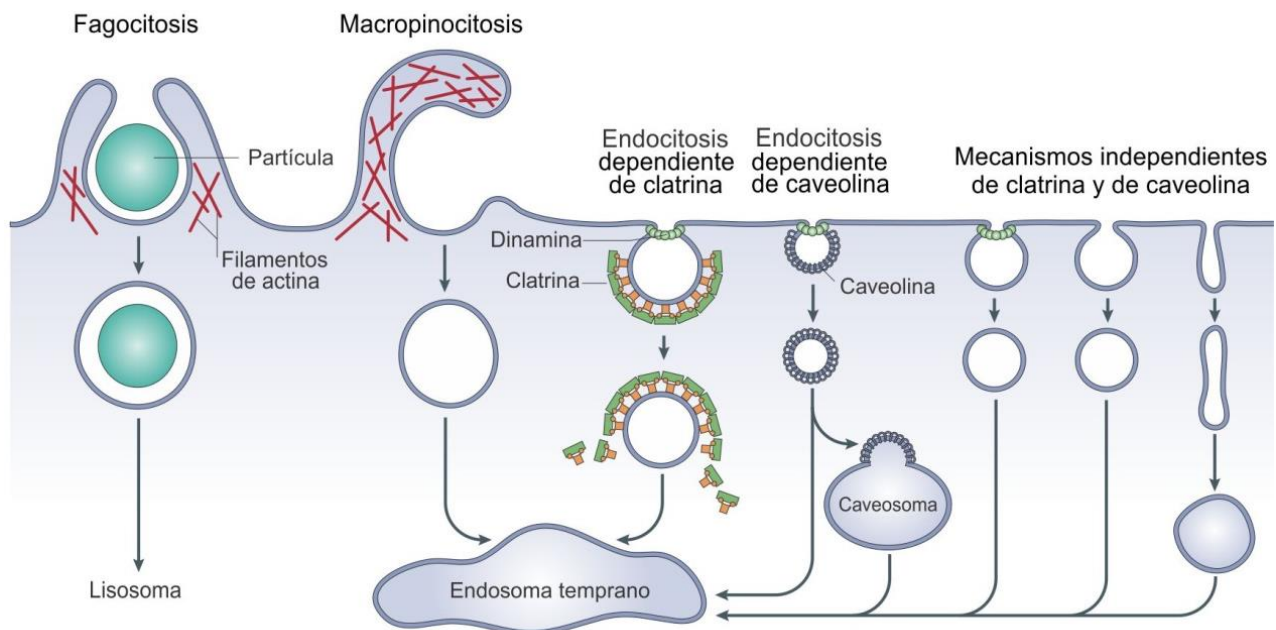


Figura 4. Mecanismos de endocitosis. Esquema de los cinco posibles mecanismos por los cuales una molécula puede ingresar en las células. Modificada de *Mayor et al.*¹⁰⁵.

Endocitosis mediada por clatrina

La endocitosis mediada por clatrina es uno de los procesos de internalización de receptores más común en células de mamíferos. La clatrina está formada por un trímero de cadenas pesadas, cada una asociada con una cadena liviana, y dicha estructura trimérica se ensambla para recubrir las vesículas¹⁰⁶. En la endocitosis mediada por clatrina, distintas proteínas adaptadoras y proteínas accesorias coordinan la nucleación de clatrina en sitios específicos de la membrana plasmática destinados a ser internalizados¹⁰⁷. Esta nucleación promueve la polimerización de unidades de clatrina formando una estructura en forma de malla que estabiliza la deformación de la membrana. La polimerización de clatrina junto con proteínas adicionales provoca la formación y constricción de un cuello vesicular, acercando las membranas que forman el cuello entre sí¹⁰⁴. Posteriormente, la dinamina, una GTPasa de escisión, provoca la escisión de la vesícula de la membrana celular, liberándose la misma hacia el citosol recubierta por clatrina¹⁰⁸. Luego, las unidades de clatrina se desensamblan mediante la acción de la proteína ATPasa hsc70 y su cofactor auxilina. Las proteínas adaptadoras y accesorias que participan en el proceso inicial de ensamblaje de las

unidades de clatrina dependen del tipo celular y de la molécula cargo que se internalice¹⁰⁷. Una proteína importante es la proteína adaptadora 2 (AP2, de sus siglas en inglés para *adaptor protein 2*), que acerca la molécula cargo a las unidades de clatrina que se ensamblarán. En la endocitosis mediada por clatrina también participan proteínas que promueven la curvatura de la membrana plasmática para formar los “pozos” iniciales, de forma complementaria al proceso de polimerización de la clatrina. Entre ellas pueden mencionarse las proteínas de la familia de las epsinas y las β -arrestinas, involucradas en la endocitosis de GPCRs, y otras proteínas que estabilizan la curvatura de la membrana, se unen a AP2 y a las unidades de clatrina y reclutan a la dinamina hacia el cuello vesicular^{104,109,110}.

La endocitosis mediada por clatrina media la internalización de los GPCRs. Estos receptores sufren, luego de la unión del ligando, un proceso de desensibilización que reduce su disponibilidad en la membrana, contribuyendo a finalizar con la señalización intracelular. En este proceso de desensibilización, las proteínas quinasas de GPCRs fosforilan al receptor y esto promueve su unión a β -arrestinas. Dicha unión impide la interacción eficiente del receptor con la proteína G y, además, los cambios conformacionales generados reclutan unidades de clatrina. La unión de clatrina favorece la endocitosis del complejo ligando-GPCR en vesículas endocíticas^{111,112}. Se ha descrito que algunos GPCRs, como el receptor de cannabinoides, pueden internalizarse en un polo de una célula y ser transportado por transcitosis al polo opuesto¹¹³. Para el GHSR, se sabe que la internalización posterior a la unión de ghrelina se produce por endocitosis mediada por β -arrestina y clatrina, en vesículas que colocalizan con Rab5. Posteriormente, el GHSR es mayormente reciclado a la membrana plasmática a través de vesículas que expresan Rab4 y Rab11^{114,115}. Las proteínas Rab se expresan diferencialmente en los distintos compartimentos vesiculares intracelulares y serán descritas en detalle más adelante.

Endocitosis independiente de clatrina

Los mecanismos de endocitosis independientes de clatrina son variados y los más estudiados son la macropinocitosis, la fagocitosis y la endocitosis mediada por caveolina. La macropinocitosis y la fagocitosis se consideran endocitosis a macroescala, ya que internalizan fracciones de volumen extracelular relativamente grandes, en comparación con el tamaño celular, o partículas de grandes dimensiones ($\sim 0,5$ - $2,0 \mu\text{m}$ de diámetro). La endocitosis mediada por caveolina está regulada por proteínas que revisten las vesículas endocíticas, las cuales no superan los ~ 50 - 150 nm de diámetro¹¹⁶. Las caveolinas son proteínas integrales de membrana que unen el colesterol de la membrana plasmática y son de tres tipos: caveolina-1, -2 y -3, siendo la tercera únicamente expresada en células musculares¹¹⁶. El mecanismo de la endocitosis mediada por caveolina no se conoce con precisión. Las caveolinas tienen una estructura con α -hélices que se inserta en la membrana plasmática y podría curvar la membrana. Además, las caveolinas 1 y 2 pueden oligomerizar en la membrana, lo cual potenciaría su curvatura¹¹⁷. La formación de las caveolas depende del colesterol y la pérdida del mismo en la membrana reduce este proceso de

endocitosis. La endocitosis dependiente de caveolina, al igual que se describió para la dependiente de clatrina, requiere de la dinamina para que se produzca la escisión de la vesícula formada hacia el interior celular¹⁰⁸.

5.2. Transporte intracelular

Luego de la endocitosis, la vesícula endocítica con las moléculas internalizadas se transporta en el citosol. Inicialmente, las vesículas endocíticas se fusionan con endosomas tempranos. Estos compartimentos tienen una estructura túbulo-vesicular y un pH ácido, lo cual provoca la disociación de los ligandos internalizados de sus receptores. Desde allí, algunas proteínas, receptores y solutos internalizados son reciclados y devueltos a la membrana celular. Por otro lado, algunas de las moléculas internalizadas continúan con el transporte en el interior celular a: 1) endosomas tardíos y luego a lisosomas, donde son degradadas; 2) endosomas comunes desde los cuales son transportadas al sistema de endomembranas del aparato de Golgi; o 3) endosomas comunes desde donde pasan a endosomas de reciclaje en la membrana opuesta a donde se internalizaron, siendo posteriormente liberadas de la célula mediante exocitosis. Esta última posibilidad representa el proceso de transcitosis propiamente dicho¹¹⁸⁻¹²⁰. Los diferentes endosomas difieren entre sí en su localización subcelular, morfología, características físicas y composición¹²¹⁻¹²³. Los microtúbulos que conforman el citoesqueleto de actina juegan un rol esencial en el transporte vesicular y en la interacción de las vesículas transportadoras con los endosomas tardíos¹²⁴. Diferentes factores participan del tráfico celular de los endosomas, algunos de los cuales están involucrados en distintas etapas del proceso de internalización, reciclaje o liberación de vesículas. Los miembros de la familia de proteínas Rab son GTPasas específicas para cada compartimento. Los endosomas tempranos contienen Rab5, Rab4 y Rab11, mientras que los endosomas tardíos contienen Rab7 y Rab9. Rab5 controla el transporte de las vesículas desde la membrana plasmática hasta los endosomas tempranos y su fusión¹²⁵, aunque los mecanismos específicos por los cuales la proteína lleva a cabo estas funciones no son conocidos a la fecha. Rab4 controla el transporte de los endosomas a la superficie celular y regularía el proceso de reciclaje de las vesículas¹²⁶. Rab11 se asocia con los endosomas de reciclaje en células de ovario de hámster chino y también se ha encontrado en compartimentos celulares como el aparato de Golgi¹²⁷. Rab7 y Rab9 cumplen un rol en el transporte de moléculas entre los endosomas tardíos y el aparato de Golgi y en la biogénesis de los lisosomas^{128,129}. Además, los receptores SNAREs (de sus siglas en inglés para *soluble NSF attachment protein receptors*) constituyen una familia de proteínas involucradas en el acoplamiento y la fusión de vesículas que se encuentran en los endosomas y que tendrían también una distribución diferencial dependiente del tipo de endosoma¹³⁰.

5.3. Exocitosis

La exocitosis se refiere al proceso por el cual la membrana de una vesícula intracelular se fusiona con la membrana plasmática, liberando su contenido al espacio extracelular. Es un proceso rápido y dinámico, que involucra distintas etapas: la formación inicial de un tallo de hemi-fusión, una estructura intermedia que conecta las membranas externas de la vesícula y de la membrana celular; la progresión a un poro de fusión, un canal que conecta el interior de la vesícula con el exterior celular y que modifica su tamaño; y finalmente la fusión completa de ambas membranas¹³¹. En las células epiteliales de los plexos coroideos se ha descrito la presencia de proteínas relacionadas con la fusión de las membranas en el proceso de exocitosis, en particular de la proteína de membrana asociada a vesículas 1 y 2 y de la proteína de 25 kDa asociada a sinaptosoma. La expresión de estas proteínas es esperable debido a la función de estas células en la producción y liberación al LCR de distintas moléculas, y también apoya la idea de que pueden realizar transcitosis¹³².

La transcitosis de péptidos a través de la barrera sangre-LCR no ha sido estudiado en forma sistemática. Algunos estudios han descrito la presencia de receptores específicos para ciertas moléculas plasmáticas, como la insulina o la transferrina, y su internalización en las células de la barrera sangre-LCR, pero no han estudiado la transcitosis de manera directa^{133,134}. En las células epiteliales de los plexos coroideos se ha descrito la existencia de transcitosis de algunas moléculas desde el lado basal al apical, como por ejemplo para el folato y para la albúmina en roedores neonatos^{135,136} y también en sentido inverso, como para la HRP¹³⁷. Además, algunos trabajos estudiaron los procesos de transporte de la leptina desde la sangre hacia el LCR en las células epiteliales de los plexos coroideos^{138,139} y en los tanicitos β ⁹³. Los tanicitos también poseen la capacidad de realizar transcitosis de aglutinina de germen de trigo (WGA, de sus siglas en inglés para *wheat germ agglutinin*) desde el LCR hacia los capilares de la EM¹⁴⁰. Los trabajos mencionados indican que las células de la barrera sangre-LCR son capaces de realizar transcitosis pero ninguno de estos trabajos se focalizó al estudio de un ligando de un GPCR, como es el caso de la ghrelina. En nuestro conocimiento, tampoco existen trabajos que hayan evaluado la transcitosis de la ghrelina en otro tipo celular.

Hipótesis de este Trabajo de Tesis

Como hipótesis general planteamos un modelo de trabajo en el cual las células de la barrera sangre-LCR (células epiteliales de los plexos coroideos y/o tanicitos β) transportan la ghrelina circulante hacia el LCR. Desde allí, la hormona podría acceder al parénquima cerebral de manera pasiva, atravesando las células endimarias de la pared dorsal del tercer ventrículo que no poseen uniones estrechas, permitiendo la llegada de la ghrelina a sus núcleos blanco alejados de los CVOs (**Figura 5**).

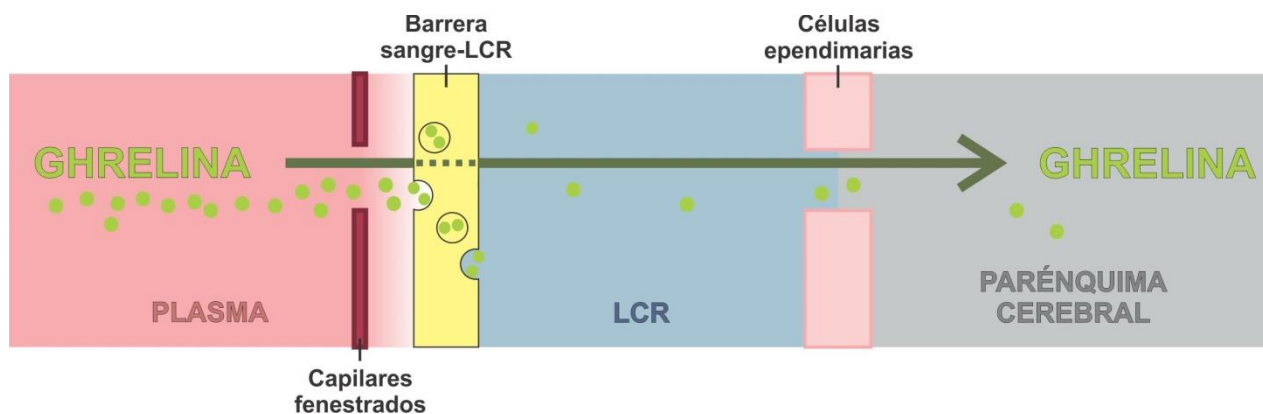


Figura 5. Mecanismo hipotético de ingreso de ghrelina plasmática al cerebro. El esquema ilustra la secuencia temporal que predecimos que sigue la ghrelina plasmática para ingresar al parénquima cerebral. **1-** La ghrelina en sangre atraviesa los capilares fenestrados presentes en los plexos coroideos y/o la EM. **2-** La ghrelina es internalizada por las células de la barrera sangre-LCR. **3-** La ghrelina es secretada por las células de la barrera al LCR de los ventrículos cerebrales. **4-** La ghrelina accede al parénquima cerebral difundiéndose a través de las células endimarias y alcanza algunos núcleos hipotalámicos.

OBJETIVOS

Objetivo general:

El objetivo general del presente trabajo de Tesis Doctoral es estudiar si la barrera sangre-LCR puede transportar la ghrelina plasmática al cerebro.

Objetivos específicos:**1- Estudiar la capacidad de las células de la barrera sangre-LCR para transportar la ghrelina circulante al cerebro.**

- A. Determinar si las células de la barrera sangre-LCR son capaces de internalizar ghrelina.
- B. Determinar si la ghrelina es transportada desde la sangre al LCR.
- C. Determinar si la ghrelina es capaz de acceder desde el LCR al parénquima cerebral.
- D. Estudiar la selectividad de la barrera sangre-LCR.
- E. Estudiar los efectos del bloqueo del pasaje de ghrelina circulante a través de la barrera sangre-LCR.

2- Desarrollar y caracterizar un cultivo primario de tanicitos de rata para estudios *in vitro*.

- A. Poner a punto la realización de un cultivo primario de tanicitos a partir de ratas post-natales P10.
- B. Caracterizar la citoarquitectura y otras características de las células obtenidas.
- C. Evaluar la actividad endocítica de las células.
- D. Determinar si los tanicitos en cultivo son capaces de internalizar ghrelina.

3- Estudiar la dependencia del GHSR en el transporte de la ghrelina a través de la barrera sangre-LCR.

- A. Determinar si las células de la barrera sangre-LCR internalizan la ghrelina de manera dependiente del GHSR *in vivo*.
- B. Estudiar la dependencia del GHSR en el acceso de la ghrelina plasmática al LCR.
- C. Estudiar, utilizando un modelo *in vitro*, la dependencia del GHSR en la internalización de la ghrelina en los plexos coroideos.
- D. Estudiar, utilizando modelos *in vitro*, la dependencia del GHSR en la internalización de la ghrelina en los tanicitos hipotalámicos.
- E. Analizar el nivel de expresión del GHSR en los plexos coroideos y en los tanicitos hipotalámicos.

4- Estudiar los mecanismos moleculares por los cuales la ghrelina es internalizada en las células de la barrera sangre-LCR.

- A. Estudiar los efectos de distintos inhibidores de la endocitosis en la internalización de la ghrelina en las células de la barrera sangre-LCR, utilizando una estrategia *in vitro*.
- B. Estudiar los efectos de distintos inhibidores de la endocitosis en la internalización de la ghrelina en las células de la barrera sangre-LCR, utilizando una estrategia *in vivo*.
- C. Analizar la expresión de marcadores de endocitosis en los tanicitos hipotalámicos.
- D. Estudiar el proceso de liberación de la ghrelina internalizada en las células de la barrera sangre-LCR.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales Experimentales

En el presente trabajo de Tesis Doctoral se utilizaron animales generados en el bioterio del Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE, La Plata, Argentina) o en el Centro de Investigación Jean-Pierre Aubert (Lille, Francia). Los animales experimentales fueron los siguientes:

- **Ratones salvajes** (*wild type*, WT), de la cepa C57BL/6. Para los experimentos *in vivo* se utilizaron machos adultos (12-16 semanas de edad), mientras que para los cultivos de tanicitos utilizamos ratones post-natales de 10 días de edad (P10).

- **Ratones deficientes del GHSR**, en los cuales la expresión del GHSR se encuentra bloqueada por la inserción de un casete de bloqueo de la transcripción insertado entre el primer y el segundo exón del gen. El casete se encuentra localizado entre dos sitios loxP, que son reconocidos por la recombinasa Cre para su escisión. Se utilizaron animales homocigotas que se obtuvieron por la cruce entre animales heterocigotas con una base genética C57BL/6. Estos animales fueron generados por el grupo del Dr. Zigman de la Universidad de Texas Southwestern Medical Center²³. Para los experimentos *in vivo* se utilizaron machos adultos, mientras que para los cultivos de tanicitos utilizamos ratones P10.

- **Ratones Ai14** (tdTomato^{loxP/+}; Allen Institute, 129S6-Gt(ROSA)26Sortm14(CAGtdTomato)Hze/J; Stock# 007908), que poseen una mutación en el locus Gt(ROSA)26Sor con un casete de bloqueo de la transcripción, localizado entre dos sitios loxP, que previene la transcripción de tdTomato, el cual sólo se expresa luego de la recombinación mediada por la recombinasa Cre que elimina el casete de bloqueo de la transcripción¹⁴¹. Se utilizaron estos ratones en edad adulta (12-12 semanas de edad).

- **Ratas Sprague Dawley**, post-natales de 10 días.

Los animales se mantuvieron en cuartos con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas (luz de 7:00 a 19:00 hs y oscuridad de 19:00 a 7:00 hs), a temperatura constante (22 ± 1 °C) con libre acceso a agua y alimento, excepto cuando se indica lo contrario. Se utilizó una dieta balanceada comercial para ratón que contiene un 4% de contenido graso (Gepsa SA). Los animales se sacrificaron de acuerdo a las normas internacionales aceptadas del "National Institutes of Health (NIH)". Todos los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del IMBICE (número de aprobación: 15-0132) y del JPARC (86-609-EEC).

2. Reactivos

- 3-3'-diaminobenzidina (DAB)/Solución de Níquel (Sigma Aldrich, cat # 32750).
- Acido p-hidroximercuribenzoico, inhibidor de proteasas (Sigma-Aldrich, cat # 12425).
- Alcoholes (Biopack).
- Anticuerpo anti-c-Fos generado en conejo (Santa Cruz, cat # SC-7202).
- Anticuerpo anti-DARPP32 generado en cabra (Santa Cruz, cat # SC-8483).

- Anticuerpo anti-fluoresceína generado en cabra (Molecular Probes, cat # A-11095).
- Anticuerpo anti-GFAP generado en conejo (Sigma, cat # G-9269).
- Anticuerpo anti-ghrelina generado en cabra (Santa Cruz, cat # SC-10368).
- Anticuerpo anti-ghrelina generado en gallina (GeneTex, cat # GTX-78202).
- Anticuerpo anti-Iba1 generado en conejo (Wako, cat # 019-19741).
- Anticuerpo anti-NeuN generado en ratón (Millipore, cat # Mab377).
- Anticuerpo anti-Rab5A generado en conejo (Cell Signaling, cat # 3547).
- Anticuerpo anti-vimentina generado en gallina (Millipore, cat # AB-5733).
- Anticuerpo anti-vimentina generado en ratón (Clon V9 "Ready to use" Biogenex, cat # AM-074 10M).
- Anticuerpo anti-cabra biotinilado (Vector Laboratories, cat # BA-5000).
- Anticuerpo anti-conejo biotinilado (Vector Laboratories, cat # BA-1000).
- Anticuerpo anti-cabra conjugado a Alexa 488 (Life Technologies, cat # A-11055).
- Anticuerpo anti-cabra conjugado a Alexa 594 (Molecular Probes, cat # A-11058).
- Anticuerpo anti-conejo conjugado a Alexa 488 (Invitrogen, cat # A-11008).
- Anticuerpo anti-conejo conjugado a Alexa 594 (Molecular Probes, cat # A-21207).
- Anticuerpo anti-gallina conjugado a Alexa 594 (Abcam, cat # ab150176).
- Anticuerpo anti-ratón conjugado a Alexa 488 (Molecular Probes, cat # A-21202).
- Anticuerpo anti-ratón conjugado a Alexa 594 (Molecular Probes, cat # A-21203).
- Bálsamo de Canadá (Biopack).
- Buffer fosfato-salina (PBS, de sus siglas en inglés para *phosphate buffered saline*) 0,01 M; pH = 7,4: Na₂HPO₄ 1,9 g/L, NaH₂PO₄ 0,32 g/L y NaCl 8,16 g/L (Biopack).
- Colchicina (Sigma-Aldrich, C2580000).
- DABCO (Sigma, lote 95H3458).
- Dietil-pirocarbonato (Sigma, cat # D5758).
- DNAsa I (Sigma-Aldrich, cat # D-5025).
- dNTPs (Invitrogen, cat # 10297018).
- EDTA.
- Formaldehído (Biopack).
- Flunixin meglumina (Flumeg, Over).
- Fluoresceína sódica libre 10% (Poen, Argentina).
- GelRed (Biotium, cat # 41001-41003-T).
- Glucosa (Biopack).
- H₂O₂ 0,5% en PBS.
- Heparina (Calciparine, Sanofi Aventis).
- HOT FIREPol Eva Green Master Mix (Solis BioDyne).
- JMV 2959: ligando del GHSR (provisto por el Dr. Jacky Marie de la Universidad de Montpellier, Francia).
- Ketamina (Holliday Scott SA).
- Kit comercial de complejo avidina-biotina-peroxidasa "VectaStain Elite ABC" (Vector Laboratories, cat # PK-6200).
- Kit de Inmunoensayo enzimático para ghrelina, rata/ratón (Bertin Pharma, cat # A05117).
- Líquido cefalorraquídeo artificial (LCRa) pH = 7,4: 140 mM NaCl; 3,35 mM KCl; 1,15 mM MgCl₂; 1,26 mM CaCl₂; 1,2 mM Na₂HPO₄; y 0,3 mM NaH₂PO₄ en agua destilada estéril.

- Medio de cultivo de tanicitos definido: medio DMEM/F12 1:1 sin rojo fenol (Microvet, cat # P3042-001), suplementado con insulina 0,18 UI/ml (Nordisk Pharm Ind), seroalbúmina bovina 50 µg/ml (Sigma-Aldrich, cat # A-9418), transferrina 12,5 µg/ml (Calbiochem, cat # 616420) y gentamicina 40 µg/ml (Richet).
- Medio Hanks estéril (KCl 0,40 g/l; KH₂PO₄ 0,06 g/l; NaCl 8 g/l; NaHCO₃ 0,35 g/l; Na₂HPO₄ 0,04 g/l; glucosa 1 g/l; rojo fenol 1% 1 ml/l).
- Microesferas fluorescentes (fluoresferas) rojas (Fluospheres, Molecular Probes, cat # F-8793).
- Microesferas fluorescentes (fluoresferas) verdes (Fluospheres, Molecular Probes, cat # F-8795).
- Naranja de Acridina (Sigma-Aldrich, cat # A-6014).
- Oil-Red-O (Sigma-Aldrich, cat # O-0625).
- Paraformaldehído (Biopack).
- Poli-L-lisina (Sigma-Aldrich, cat # P-8920).
- RNase Out (Invitrogen, cat # 10777019).
- Sacarosa (Biopack).
- Solución fisiológica 0,9%.
- Suero Fetal Bovino (SFB, Internegocios S.A.).
- Suero Normal de Burro (Equitech-Bio.INC lote SD 30-2090).
- TAQ Pegasus ADN polimerasa (EmbioTec, cat # EA00101- 500 U).
- Transcriptasa reversa M-MLV (Promega, cat # 9PIM170).
- Tripsina (FloSeal, Baxter, cat # 934057).
- Tritón-X100 (Biopack).
- TRIzol (Invitrogen, cat # 15596018).
- Xilacina (Richmond Vet Pharma).

3. Variantes de ghrelina utilizadas

- Ghrelina nativa (GSS-(octanoílo)-FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR): hormona peptídica en su estado nativo, esterificada con ácido n-octanoico (PM: 3315 Da; Global Peptide, cat # PI-G-03).
- Ghrelina fluorescente verde (**F-ghrelina**; GSS-Dpr (octanoílo)-FLSPEHQRVQQRKESK-(fluoresceína)-amida): análogo de la ghrelina que contiene 19 aminoácidos y está conjugado a una molécula de isotiocianato de fluoresceína, unida al extremo C-terminal (PM: 2741 Da; sintetizada por el laboratorio del Dr. Luyt del Departamento de Química de la Universidad de Western Ontario, Canadá).
- Ghrelina fluorescente verde desordenada o *scrambled* (**scr-F-ghrelina**; FRVESKESQPGR-Dpr (octanoílo)-QHSQK-(fluoresceína)): contiene los mismos aminoácidos que la F-ghrelina, pero en un orden diferente y está conjugado a una molécula de isotiocianato de fluoresceína, unida al extremo C-terminal (PM: 2741 Da; sintetizada por el laboratorio del Dr. Luyt del Departamento de Química de la Universidad de Western Ontario, Canadá).
- Ghrelina fluorescente roja (**rF-ghrelina**; GSD-(octanoílo)-FLSPEHQKAQQRKESC-(DY647)): análogo de la ghrelina que contiene 19 aminoácidos y está conjugado a un fluoróforo DY647-maleimida. Además, la

serina en la posición 3 es reemplazada por ácido aspártico cuya cadena lateral se encuentra amidada con ácido amino-octanoico (PM: 3562 Da; sintetizada por el laboratorio del Dr. Fehrentz del Instituto de Biomoléculas Max Mousseron, Montpellier, Francia).

4. Genotipificación de los ratones

Al momento del destete (21 días post-nacimiento, P21), las crías fueron numeradas con marcas en las orejas. Al mismo tiempo, se cortó un segmento de ~2 mm del extremo de la cola que luego se procesó para extraer el ácido desoxirribonucleico (ADN) para su genotipificación. Cada fragmento de cola se recogió en un tubo Eppendorf de 200 µl y se extrajo el ADN mediante incubación en 75 µl de una mezcla de NaOH 25 mM con EDTA 0,2 mM durante 1 hora a 98°C. Luego de 1 hora, la mezcla se enfrió a 15°C, se agregó 75 µl de Tris-HCl (pH 5,5) y se homogeneizó. Esta mezcla se puede emplear inmediatamente para realizar el genotipado o se puede conservar a -20°C hasta su procesamiento. Para la genotipificación se empleó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, de sus siglas en inglés para *polymerase chain reaction*). La mezcla de reacción consta de: 1,25 µl de buffer 10X; 0,625 µl de MgCl₂ 50 mM; 0,25 µl de dNTPs 10 mM; 0,0625 µl de TAQ Pegasus ADN polimerasa 5 U/µl; 0,625 µl de primer forward 10 µM; 0,625 µl de primer reverse 10 µM; 1 µl de la mezcla de extracción del ADN y 12,5 µl de H₂O MQ. Los primers forward y reverse utilizados para cada genotipo de ratón se detallan en la Tabla 1. La mezcla se cicló durante 2 hs en un termociclador (Bio-Rad) con el siguiente protocolo: 4 minutos a 94°C; 35 ciclos de: 30s a 94°C, 30s a 59°C y 45s a 72°C; 7 minutos a 72°C y finalmente se sostuvo a 10°C. Una vez terminado el ciclado, se agregó a cada tubo 2,1 µl de una mezcla de buffer de carga con un colorante de ácidos nucleicos (GelRed) y se homogeneizó. Se sembró 6 µl de esta mezcla en un gel de agarosa al 2% y se corrió en una cuba electroforética durante 1 hora a 90V. El gel se reveló en un transiluminador UV (Gel-Doc XR+, Bio-Rad) y se acuerdo al patrón de bandas observado, se determinó el genotipo de cada animal. Para los ratones deficientes del GHSR se utilizaron los siguientes primers: para el alelo WT: Fwd: 5`-GAGTGACAGGTAAGTGAGTGCG-3` y Rev: 5`-GTGCGAACATTAGAGATGAAAGG-3` (producto de 184 pb); para el alelo mutado del GHSR: Fwd: 5`-AAGAGCTACAGGAAGGCAGGTCA -3` y Rev: 5`-GTGCGAACATTAGAGATGAAAGG-3` (producto de 175 pb).

5. Cirugías estereotáxicas intra-cerebro-ventriculares (ICV)

Las cirugías ICV fueron realizadas en el cuarto de cirugías del bioterio del IMBICE, con material adecuado y en las condiciones de asepsia normalmente requeridas. En todos los casos, los ratones fueron anestesiados con una mezcla de Ketamina (150 mg/kg de peso, intra-peritoneal (IP)) y Xilacina (15 mg/kg de peso, IP).

Para esta cirugía, los ratones fueron colocados en un aparato estereotáxico para la fijación de una cánula guía permanente (4mm de largo, calibre 22G, Plastics one) dentro del ventrículo lateral. Previo pelado craneal, se realizó un corte en la piel de la calota y se eliminaron las membranas que recubren el cráneo para poder visualizar el punto de bregma y establecer las coordenadas estereotáxicas del mismo. Una vez establecidas, se utilizaron las coordenadas: -0,34 mm antero-posterior; +1 mm lateral y -2,3 mm ventral, que corresponden al ventrículo lateral derecho según el Atlas del cerebro de ratón de Paxinos y Franklin¹⁴². Es importante mencionar que, a este nivel antero-posterior, los ventrículos laterales se encuentran conectados al tercer ventrículo, proporcionando un alcance rápido de las moléculas inyectadas por vía ICV a la zona hipotalámica. En este lugar, se perforó el cráneo, se colocó la cánula guía y se fijó al hueso con acrílico dental. Finalmente se cerró la herida y el extremo libre de la cánula se tapó con un obturador adecuado. Después de la cirugía, los ratones fueron alojados en cajas individuales, y se dejaron recuperar por al menos 5 días tratándolos diariamente con flunixin meglumina (Flumeg 5%) para reducir la inflamación antes de someterlos a los protocolos experimentales. Para minimizar el estrés del día experimental, los animales fueron manipulados diariamente. En todos los casos, la posición final de la cánula fue determinada por observación histológica de los cerebros al finalizar los experimentos.

6. Procedimientos experimentales

6.1. Estudio de la capacidad de las células de la barrera sangre-LCR para transportar la ghrelina circulante al cerebro

Estudio de la capacidad de internalización de F-ghrelina de las células que conforman la barrera sangre-LCR

En el primer bloque de experimentos, ratones WT adultos fueron implantados con cánulas ICV. Luego del período de recuperación detallado anteriormente, se realizaron inyecciones por vía ICV de 2 μ l de vehículo (LCR artificial, LCRA) solo o conteniendo 60 pmol/ratón de F-ghrelina. Esta dosis de F-ghrelina elegida induce una respuesta completa en el consumo de alimento y, al mismo tiempo, representa la menor dosis que permite una observación directa en microscopio de fluorescencia y cuantificación de la molécula. Las inyecciones centrales fueron realizadas a un flujo constante durante 2 minutos a través de un inyector calibre 30G que se extiende 0,5 mm por debajo de la cánula guía, el cual se encuentra conectado a través de un tubo de polietileno a una jeringa Hamilton. Luego de cada inyección, se dejó el inyector dentro de la cánula durante 2 minutos para evitar el reflujo de la solución inyectada. Luego de 15 minutos, los ratones fueron anestesiados y perfundidos, y sus cerebros fueron extraídos, fijados y cortados en cuatro series de secciones coronales como se describe posteriormente (ver "*Perfusión y preparación de muestras de cerebro*"). Luego, las secciones conteniendo el hipotálamo de una de las series se sometió a una inmuno-histoquímica (IHQ) fluorescente doble contra fluoresceína y vimentina (ver "*Inmuno-histoquímicas (IHQs) cromogénicas y fluorescentes*"), se montaron secuencialmente

protegiéndolas de la luz, se colocó el cubreobjetos con medio de montaje y se tomaron microfotografías de fluorescencia (ver *“Obtención de imágenes”*). Cada grupo experimental contuvo 4 ratones.

En el segundo bloque de experimentos, ratones WT adultos fueron alojados en cajas individuales y manipulados diariamente durante al menos 5 días previos para minimizar el estrés del día experimental. Luego, fueron inyectados de manera sistémica (por vía SC) con vehículo (solución fisiológica, SF) solo o conteniendo 300 pmol/g de peso corporal de F-ghrelina. Esta dosis fue elegida porque representa la mínima dosis que nos permite su observación por microscopía de fluorescencia luego de una IHQ fluorescente. Esta dosis de ghrelina induce un aumento transitorio de los niveles plasmáticos de ghrelina de alrededor de 17 veces respecto a los valores basales a los 30 minutos post-administración, lo cual es similar a los aumentos endógenos de ghrelina en plasma observados en condiciones de déficit energético severo⁵². Luego de 15 minutos, los ratones fueron anestesiados y perfundidos, y sus cerebros fueron extraídos, fijados y cortados en cuatro series de secciones coronales como se describe posteriormente (ver *“Perfusión y preparación de muestras de cerebro”*). Luego, las secciones conteniendo el hipotálamo de una de las series se sometió a una IHQ fluorescente doble contra fluoresceína y vimentina (ver *“Inmuno-histoquímicas (IHQs) cromogénicas y fluorescentes”*), se montaron secuencialmente protegiéndolas de la luz, se colocó el cubreobjetos con medio de montaje y se tomaron microfotografías de fluorescencia (ver *“Obtención de imágenes”*). Cada grupo experimental contuvo 4 ratones.

Estudio de la capacidad de penetración de la F-ghrelina al parénquima cerebral adyacente al tercer ventrículo

Para estudiar la capacidad de penetración al parénquima de la F-ghrelina se realizaron las mismas inyecciones, tanto centrales como sistémicas, que se describieron anteriormente.

Luego, en el caso de las inyecciones centrales, se perfundieron los ratones a los 7 o a los 15 minutos post-inyección y sus cerebros fueron extraídos, fijados y cortados en cuatro series de secciones coronales como se describe posteriormente (ver *“Perfusión y preparación de muestras de cerebro”*). Luego, las secciones coronales conteniendo el hipotálamo de una de las series se montaron secuencialmente protegiéndolas de la luz, se colocó el cubreobjetos con medio de montaje y se tomaron microfotografías de fluorescencia (ver *“Obtención de imágenes”*).

En el caso de las inyecciones sistémicas, se perfundieron los ratones a los 7, 15 o 30 minutos y sus cerebros fueron extraídos, fijados y cortados en cuatro series de secciones coronales como se describe posteriormente (ver *“Perfusión y preparación de muestras de cerebro”*). Luego, las secciones coronales conteniendo el hipotálamo de una de las series se sometieron a una IHQ cromogénica contra fluoresceína (ver *“Inmuno-histoquímicas (IHQs) cromogénicas y fluorescentes”*), se montaron de manera secuencial, se

colocó el portaobjetos con medio de montaje y se tomaron microfotografías de campo claro (ver “*Obtención de imágenes*”).

Luego, en ambos casos se realizaron los análisis cuantitativos de difusión de la F-ghrelina al parénquima cerebral en el eje X, utilizando medidas de fluorescencia o de densidad óptica (ver “*Análisis neuroanatómicos cuantitativos*”). Los resultados se compararon realizando un test t de Student punto a punto. En todos los casos cada grupo experimental contuvo 3 ratones.

Estudio de la selectividad de la barrera sangre-LCR

Para evaluar la selectividad de la barrera sangre-LCR, se inyectaron de forma central o sistémica análogos de la ghrelina.

En primer lugar, ratones WT adultos fueron inyectados de manera central (por vía ICV), de la misma forma descrita anteriormente, con 2 μ l de vehículo (LCRa) solo o conteniendo 60 pmol/ratón de ghrelina nativa, fluoresceína sódica libre o Scr-F-ghrelina.

En segundo lugar, ratones WT adultos fueron inyectados de manera sistémica (por vía SC), de la misma forma descrita anteriormente, con vehículo (SF) solo o conteniendo 300 pmol/g de peso corporal de ghrelina, fluoresceína sódica libre o Scr-F-ghrelina.

Para ambos casos, luego de 15 minutos, los ratones fueron anestesiados y perfundidos, y sus cerebros fueron extraídos, fijados y cortados en cuatro series de secciones coronales como se describe posteriormente (ver “*Perfusión y preparación de muestras de cerebro*”). Luego, las secciones conteniendo el hipotálamo de una de las series se sometió a una IHQ fluorescente contra ghrelina, en el caso de las inyecciones de vehículo y de ghrelina, o contra fluoresceína, en el caso de las inyecciones de fluoresceína y de Scr-F-ghrelina (ver “*Inmuno-histoquímicas (IHQs) cromogénicas y fluorescentes*”). Por último, se montaron secuencialmente protegiéndolas de la luz, se colocó el cubreobjetos con medio de montaje y se tomaron microfotografías de fluorescencia (ver “*Obtención de imágenes*”). Cada grupo experimental contuvo 3 ratones.

Estudio del acceso de la ghrelina circulante al LCR

Para estudiar el pasaje de la ghrelina en plasma al LCR, inyectamos ratones WT adultos de manera sistémica (por vía SC), de la misma forma descrita anteriormente, con vehículo (SF) solo o conteniendo 300 pmol/g de peso corporal de ghrelina. Luego de 15 minutos, se les realizó una extracción de LCR de la cisterna magna bajo anestesia y se los sacrificó inmediatamente después. Posteriormente se realizaron medidas de los niveles de ghrelina en el LCR.

- Extracción de LCR:

Para realizar este procedimiento, los ratones anestesiados se colocaron en un aparato estereotáxico con la cabeza formando un ángulo de aproximadamente 135° con el cuerpo y se los inyectó por vía SC con vehículo o ghrelina como se explicó previamente. Luego de 15 minutos, se colectaron 6 a 10 µl de LCR de la cisterna magna, como se describió previamente¹⁴³. Brevemente, la zona donde se realizará la extracción se limpia con alcohol 70% y se realiza una incisión debajo del occipital. Bajo una lupa binocular se separa el tejido subcutáneo y los músculos mediante una disección limpia con pinzas y micro-retractores para mantener los músculos separados. Luego, se coloca un capilar con la punta afinada a 50-100 µm de diámetro dentro de la cisterna magna, a través de la capa de duramadre, permitiendo el flujo de LCR al interior del capilar. Se toman especiales precauciones para evitar la contaminación del LCR con sangre. Las muestras de LCR son inmediatamente congeladas en hielo seco y posteriormente conservadas a -80°C. Al final del procedimiento, el ratón se sacrifica por dislocación cervical.

○ Determinación de los niveles de ghrelina en el LCR utilizando espectrometría de masas:

Inicialmente, se removieron las sales de un pool de 25 µl de LCR (n = 4 por grupo experimental) en un ZipTip-C18 activado y el LCR fue eluido con 1 µl de acetonitrilo. Luego, las muestras fueron colocadas junto con una matriz de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico (HCCA, 10 mg/ml en una solución de acetonitrilo: H₂O: TFA 500:499:1) sobre una placa GroundSteel 384 utilizando el método de la gota seca. Se analizaron los perfiles en un espectrómetro Ultraflex MALDI TOF/TOF con el software FlexControl 3.3 (Bruker Daltonics). Los espectros de masa fueron adquiridos utilizando los siguientes seteos: rango de 600-4000 Da, modo reflector positivo, fuente de iones 1: 25 kV, fuente de iones 2: 21,85 kV, lente: 9 kV, voltaje del reflector 1: 26,2 kV, voltaje del reflector 2: 13,6 kV, pulsado de extracción de iones de 40 ns, supresión hasta 600 m/z. La ionización se logró a través de la irradiación con un láser de estado sólido de 360 nm operando a 100 Hz (13% atenuante). Todos los espectros fueron obtenidos al azar sobre la superficie (900 disparos realizados por lugar) manualmente. La calibración de masa fue realizada de manera externa utilizando Standard Calibration Peptide (Bruker Daltonics: angiotensin II, angiotensin I, substance P, bombesin, ACTH clip 1-17, ACTH clip 18-39, somatostatina 28). Se realizó una curva estándar utilizando soluciones de ghrelina en LCR. El análisis de los datos se realizó con el software FlexAnalysis (Bruker Daltonics).

○ Determinación de los niveles de ghrelina en el LCR utilizando ELISA:

Se analizó la concentración de ghrelina en muestras de LCR de ratón utilizando un kit de ensayo por inmuno-absorción ligado a enzimas (ELISA, de sus siglas en inglés para *enzyme-linked immuno-sorbent assay*) específico para la detección de ghrelina acilada (A05117; Bertin Pharma). El kit se utilizó según instrucciones del fabricante. Aquí, un pool de 30 µl de LCR (n = 4 por grupo experimental) fue medido. El límite de detección del ensayo fue de 2,0 fmol/ml de ghrelina en la muestra (6,7 pg/ml).

Estudio del efecto de bloqueo de la entrada de la ghrelina circulante por la administración central de scr-F-ghrelina o de un anticuerpo anti-ghrelina

Para estos experimentos, se utilizaron ratones WT macho adultos. Los ratones fueron inyectados, en primer lugar, de forma central (por vía ICV) a través de una cánula previamente implantada como se describió anteriormente. Las inyecciones centrales consistieron en 2 μ l de vehículo (LCRa) solo o conteniendo 60 pmol/ratón de scr-F-ghrelina o de un anticuerpo anti-ghrelina producido en gallina (0,1 pmol/ratón). Luego de 15 minutos, los ratones fueron inyectados de manera sistémica (por vía SC) con vehículo (SF) solo o conteniendo ghrelina (60 pmol/g peso corporal). Esta dosis de ghrelina sistémica se utilizó ya que se sabe que produce una respuesta de aumento del consumo de alimento que no es completa, por lo que se consideró que sería más susceptible de ser bloqueada, al no ser saturante. Esta dosis de ghrelina induce un aumento plasmático del nivel de ghrelina del doble del nivel basal en un ratón alimentado *ad libitum* a los 30 minutos post-inyección y simula una condición de ayuno de 12-24 hs³⁷. La dosis de scr-F-ghrelina utilizada para las inyecciones centrales se eligió debido a que selectiva y únicamente afecta a las células de la barrera sangre-LCR (ver “*Resultados y discusión*”). La dosis de anti-ghrelina utilizada para las inyecciones centrales se eligió por ser al menos 100 veces mayor que la concentración de ghrelina estimada en el LCR del ratón luego de una inyección sistémica de ghrelina. Esta dosis no genera un aumento de c-fos en el ARC y es similar a la dosis utilizada en otros trabajos para reducir el consumo de alimento en ratones luego de un evento de ayuno¹⁴⁴.

Se midió el consumo de alimento en estos ratones a los 30, 60 y 120 minutos. Para ello, se sustrajo el peso de la comida remanente al peso inicial para cada tiempo. Dos horas después de las administraciones sistémicas, los ratones fueron anestesiados, perfundidos y sus cerebros se extrajeron para fijarlos y cortarlos en secciones coronales como se describe más adelante (ver “*Perfusión y preparación de muestras de cerebro*”). Luego, se realizó una IHQ cromogénica contra c-fos en secciones coronales de cerebro conteniendo el hipotálamo (ver “*Inmuno-histoquímicas (IHQs) cromogénicas y fluorescentes*”). Finalmente, se cuantificaron las células positivas para c-fos en el ARC (ver “*Análisis neuroanatómicos cuantitativos*”). Los grupos experimentales fueron los siguientes: 1) vehículo ICV + vehículo SC, n = 8; 2) vehículo ICV + ghrelina SC, n = 10; 3) scr-F-ghrelina ICV + vehículo SC, n = 8; 4) scr-F-ghrelina ICV + ghrelina SC, n = 7; 5) anti-ghrelina ICV + vehículo SC, n = 5; 6) anti-ghrelina ICV + ghrelina SC, n = 7.

6.2. Desarrollo y caracterización de un cultivo primario de tanicitos de rata para estudios *in vitro*

Para esta sección se utilizaron en total 12 cultivos independientes, que representaron un total de 135 crías de rata. El análisis de imágenes para cada set de resultados se realizó con un mínimo de 20-40 células por vidrio, utilizando 4-6 vidrios por condición experimental.

Realización del cultivo primario

La región de la EM hipotalámica fue disectada de ratas P10, momento en el cual los tanicitos ya se encuentran presentes, revistiendo la pared ventral del tercer ventrículo^{145,146} (**Figura 6 A-C**). Específicamente, los cerebros de las ratas fueron removidos del cráneo, se eliminaron las meninges y se colocaron en una placa con la cara ventral hacia arriba para remover la zona de la EM/ARC con pinzas (**Figura 6D**). El quiasma óptico y el borde rostral de los cuerpos mamilares fueron utilizados como referencia de los límites rostral y caudal, respectivamente, mientras que ~ 1mm desde el límite lateral de la EM y 1 mm de profundidad fueron utilizados como los límites laterales y ventral, respectivamente (**Figura 6 E,F**). Luego, los bloques resultantes de tejido conteniendo la EM/ARC fueron lavados tres veces con medio Hanks y posteriormente se disgregaron las células utilizando una solución de tripsina 0,25 mg/ml con desoxirribonucleasa I (DNAsa I) 0,28 mg/ml. Se incubaron las células en dicha solución a 37°C durante 10 minutos y se disoció el tejido suavemente con una pipeta Pasteur de vidrio a los 5 minutos de la incubación. Luego, el mismo volumen de suero fetal bovino (SFB) suplementado con DNAsa I (5:1) fue agregado para frenar el proceso de disgregación, las células se centrifugaron durante 5 minutos a 150 g y se resuspendieron en medio de cultivo definido (ver composición en “*Reactivos*”) con un agregado de 10% de SFB. En estas condiciones, se realizó una disgregación mecánica de las células, utilizando una pipeta Pasteur de vidrio y, posteriormente, agujas hipodérmicas de calibres progresivamente menores (22G, 25G). Luego, se centrifugó nuevamente a 150 g durante 5 minutos y se resuspendieron las células en medio de cultivo definido sin suero. Posteriormente se realizó un conteo de viabilidad celular en una cámara de Neubauer mezclando la suspensión celular con una solución de azul de Tripán 0,4 % en una proporción 1:1. Las células que incorporaron el colorante fueron consideradas muertas y no se contaron, mientras que el resto se contó en los cuatro cuadrantes de la cámara y se obtuvo el número final de células por ml en la suspensión a través del siguiente cálculo: número de células contado/4*2*10.000. Se realizó la siembra de las células en vidrios redondos de 12 mm de diámetro (50.000 – 60.000 células/vidrio) o en vidrios cuadrados de 22 x 22 mm (75.000 – 100.000 células/vidrio). Estos vidrios habían sido previamente tratados con poli-L-lisina 0,03 mg/ml por 1 hora a temperatura ambiente, luego se lavaron tres veces con agua destilada estéril y se dejaron secar antes de utilizarlos. Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂ en el medio de cultivo definido y, al día tres de cultivo, la mitad del medio se reemplazó con medio fresco con el agregado de trombina a una concentración final de 1,25 UI/ml. Las células se cultivaron por 7 días antes de utilizarse para los distintos experimentos.

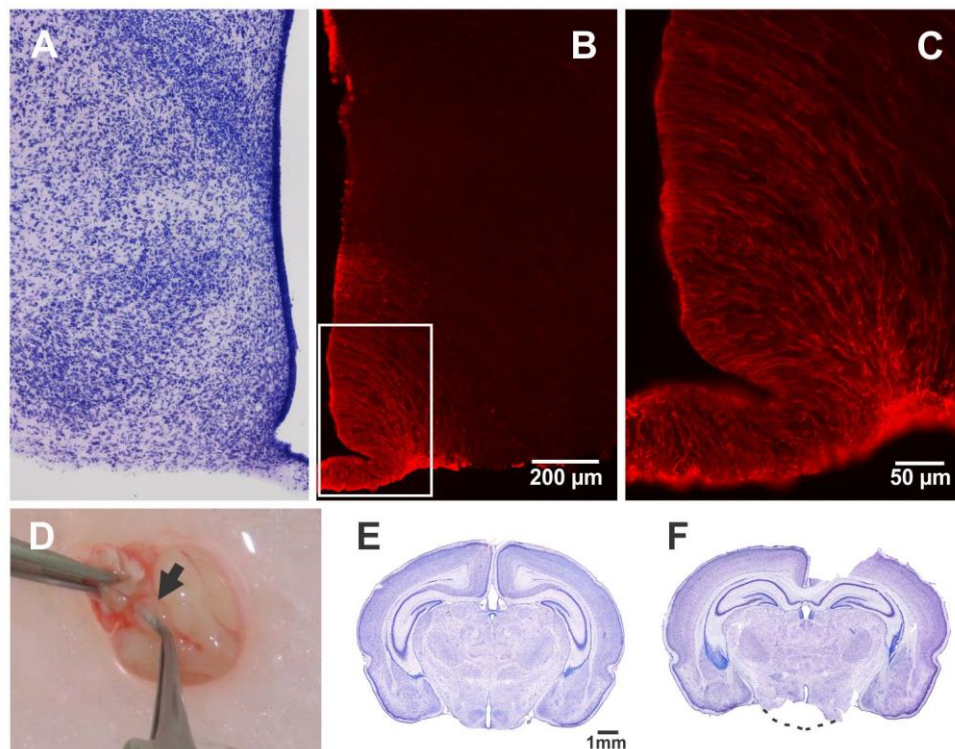


Figura 6. Realización del cultivo primario de tanicitos. **A, B:** Microfotografías de un corte coronal de cerebro de rata P10 sometido a una tinción de Nissl (A) o a una inmuno-histoquímica contra vimentina (B). **C:** Se muestra una imagen a alta magnificación de la región delimitada en B. Se pueden observar los procesos de los tanicitos visibles y completamente desarrollados a esta edad. **D:** Se muestra la disección limpia de la parte más ventral de la región hipotalámica (flecha), utilizando pinzas finas de disección. **E, F:** Microfotografías de cortes coronales de cerebros de ratas P10 intactos (E) o luego de la extracción de la región EM/ARC (F). La línea de puntos delimita la región extraída.

Caracterización morfológica de las células compatibles con tanicitos

○ Análisis neuroanatómico de las secciones de cerebro:

Las secciones de cerebros intactas o con la región de la EM/ARC disectada fueron utilizados para los análisis neuroanatómicos (**Figura 6 E,F**). En este caso, los cerebros fueron fijados en formaldehído al 4% en PBS, crio-preservados, congelados y cortados en secciones coronales de 40 µm como se describe más adelante (ver “*Perfusión y preparación de muestras de cerebro*”). Las secciones coronales fueron luego utilizadas para dos procedimientos distintos: una serie se utilizó para realizar tinción de Nissl y otra serie para realizar una IHQ contra vimentina (ver “*Inmuno-histoquímicas (IHQs) cromogénicas y fluorescentes*”). Finalmente, se tomaron microfotografías de campo claro, en el caso de la tinción de Nissl, y de fluorescencia, en el caso de la IHQ contra vimentina (ver “*Obtención de imágenes*”).

○ Tinción con naranja de acridina:

Al día 7 de cultivo, las células fueron incubadas con el colorante naranja de acridina 1 µM en medio de cultivo durante 15 minutos a 37°C y luego fueron lavadas con medio. Las células vivas fueron

observadas con un microscopio invertido y se tomaron microfotografías de contraste de fase y de fluorescencia en las cuales se excitaron las células con luz azul y luego se observó la fluorescencia verde-naranja (ver “*Obtención de imágenes*”).

○ Tinción con Oil-Red-O:

Al día 7 de cultivo, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% en PBS a 4°C durante 30 min. Luego, fueron lavadas una vez con PBS y otra vez con alcohol isopropílico 60% en agua e incubadas con el colorante Oil-Red-O 3 mg/ml en alcohol isopropílico 60% durante 15 min. Luego se lavaron con el mismo alcohol y se las montó con medio de montaje. Se tomaron microfotografías de campo claro de estas células (ver “*Obtención de imágenes*”).

○ Análisis por microscopía electrónica:

Al día 7 de cultivo, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% en PBS a 4°C durante 30 min. Luego, fueron gradualmente deshidratadas mediante el pasaje progresivo por etanol, del 10 al 100%. Las células fueron secadas en un aparato de secado con CO₂ a un punto crítico (Baltec CP-30) y cubiertas con oro (Jeol Fine Ion Sputter Coater JFC-1100; Jeol, Akishima). Finalmente, las células fueron examinadas con un microscopio de escaneo electrónico JEOL (JSM 6360 LV) y se tomaron microfotografías de las mismas con una cámara Nikon D90.

Caracterización inmuno-citoquímica (ICQ) de las células con morfología de tanicitos

Al día 7 de cultivo, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% en PBS a 4°C durante 30 min. Luego, se les realizó una ICQ, como se describe más adelante, doble contra vimentina y DARPP-32 o GFAP, y simple contra NeuN e Iba1. Posteriormente, se montaron los cubreobjetos y se tomaron microfotografías de fluorescencia, dentro de los 7 días posteriores a la ICQ (ver “*Inmuno-citoquímicas (ICQs)*” y “*Obtención de imágenes*”).

Caracterización electrofisiológica de las células con morfología de tanicitos

Por otro lado, en colaboración con el Laboratorio de Electrofisiología del IMBICE, los tanicitos en cultivo fueron analizados electrofisiológicamente por la técnica de patch clamp, en configuración de célula entera, entre los días 5 y 12 de cultivo. La solución externa estuvo compuesta de la siguiente forma (en mM): 135 NaCl; 4,7 KCl; 1,2 MgCl₂; 2,5 CaCl₂; 10 HEPES y 10 glucosa; pH = 7,4. La solución interna estuvo compuesta de la siguiente forma (en mM): 140 gluconato de potasio; 5 KCl₂, 5 NaCl, 10 HEPES, 4 MgCl₂, 3 Na-ATP, 0.3 Na-GTP and 0.6 EGTA; pH = 7.2. Se utilizaron capilares de vidrio borosilicato para generar las micropipetas. Se aceptaron corrientes de fuga menores a 50 pA y resistencias entre 3 y 6 MΩ, cuando los electrodos fueron llenados con la solución interna. Se utilizó un amplificador Axopatch 200 (Molecular Devices) y los datos fueron muestreados a 20kHz y filtrados a 10 kHz (-3 dB) utilizando el software PCLAMP 8.2. La medida del potencial de reposo de la membrana fue realizada en modo track y

los potenciales de membrana que se mantuvieron constantes durante al menos 5 minutos durante los registros fueron incluidos. Estas medidas no fueron corregidas por el potencial del líquido de junta. Los cambios en el voltaje fueron registrados fijando la corriente y aplicando inyecciones de corriente desde -100 hasta +100 pA en pulsos cuadrados de 200 ms.

Caracterización de la actividad endocítica de las células con morfología de tanicitos

Al día 7 de cultivo, las células fueron expuestas a una suspensión de 2 µg/ml de microesferas fluorescentes (fluoroesferas) rojas de 40 nm, modificadas con carboxilato, en medio de cultivo a 37°C o 4°C. Luego de 15 minutos de incubación, las células se lavaron dos veces con PBS, se fijaron con paraformaldehído 4% en PBS durante 30 minutos a 4°C y se montaron con una solución de montaje. Luego, se obtuvieron microfotografías de las mismas en un microscopio de fluorescencia, realizando stacks en el eje Z, en pasos de 200 nm con un aparato automatizado añadido al microscopio Nikon Eclipse 50i. Las imágenes adquiridas fueron deconvolucionadas utilizando el software Huygens (SVI). Además, se realizó una ICQ contra Rab5A, un subtipo de Rab5, en estas células para analizar la presencia de co-localizaciones entre la marca IR y las fluoroesferas (ver *“Inmuno-citoquímicas (ICQs)”*). Estas imágenes fueron tomadas utilizando el microscopio Zeiss AxioObserver D1 con el módulo Apotome 2 (ver *“Obtención de imágenes”*). Se utilizó el software Fiji para generar las proyecciones ortogonales y de intensidad máxima.

Estudio de la capacidad de internalización de rF-ghrelina de los tanicitos en cultivo

Al día 7 de cultivo, las células fueron lavadas dos veces con medio de cultivo e incubadas con vehículo (medio Hanks) solo o conteniendo distintas concentraciones de rF-ghrelina (50 nM, 150 nM o 300 nM) por 15 minutos a 37°C o a 4°C. Luego, fueron lavadas 3 veces con PBS, fijadas y montadas para la obtención de microfotografías fluorescentes (ver *“Obtención de imágenes”*). Posteriormente, sobre las microfotografías, se realizaron análisis cuantitativos de la intensidad de fluorescencia presente en el interior de las células (ver *“Análisis neuroanatómicos cuantitativos”*).

En otro experimento, se realizó el mismo procedimiento descrito antes pero co-incubando la rF-ghrelina con fluoroesferas verdes durante 15 minutos a 37°C y se tomaron microfotografías para analizar la presencia de co-localizaciones entre ambas señales (ver *“Obtención de imágenes”*).

Además, en algunos vidrios con células incubadas con rF-ghrelina se realizó una ICQ (ver *“Inmuno-citoquímicas (ICQs)”*) contra Rab5A. Luego, se tomaron microfotografías de las mismas para analizar la presencia de co-localizaciones entre ambas señales (ver *“Obtención de imágenes”*).

6.3. Estudio de la dependencia del GHSR en el transporte de la ghrelina a través de la barrera sangre-LCR

Estudio *in vivo* de la dependencia del GHSR en la internalización de rF-ghrelina en las células que conforman la barrera sangre-LCR

En el primer bloque de experimentos, ratones WT o deficientes del GHSR adultos fueron implantados con cánulas ICV. Luego del período de recuperación detallado anteriormente, se realizaron inyecciones centrales (por vía ICV) de 2 μ l de vehículo (LCRa) solo o conteniendo 60 pmol/ratón de rF-ghrelina. La forma de realizar las inyecciones fue análoga a la explicada en la sección 6.1.1. Luego de 15 minutos, los ratones fueron anestesiados y perfundidos, y sus cerebros fueron extraídos, fijados y cortados en cuatro series de secciones coronales como se describe posteriormente (ver “*Perfusión y preparación de muestras de cerebro*”). Luego, las secciones conteniendo el hipotálamo de una de las series se montaron secuencialmente protegiéndolas de la luz, se colocó el cubreobjetos con medio de montaje y se tomaron microfotografías de fluorescencia (ver “*Obtención de imágenes*”). Cada grupo experimental contuvo 6 ratones.

En el segundo bloque de experimentos, ratones WT o deficientes del GHSR adultos fueron alojados en cajas individuales y manipulados diariamente durante al menos 5 días previos para minimizar el estrés del día experimental. Luego, fueron inyectados de manera sistémica (por vía SC) con vehículo (SF) solo o conteniendo 1200 pmol/g de peso corporal de rF-ghrelina. Se realizaron estudios preliminares con dosis menores (300 pmol/g y 1000 pmol/g), pero se decidió utilizar la dosis descrita porque representa la mínima dosis que nos permite su observación directa por microscopía de fluorescencia. Luego de 15 minutos, los ratones fueron anestesiados y perfundidos, y sus cerebros fueron extraídos, fijados y cortados en cuatro series de secciones coronales como se describe posteriormente (ver “*Perfusión y preparación de muestras de cerebro*”). Luego, las secciones conteniendo el hipotálamo de una de las series se montaron secuencialmente protegiéndolas de la luz, se colocó el cubreobjetos con medio de montaje y se tomaron microfotografías de fluorescencia (ver “*Obtención de imágenes*”). Cada grupo experimental contuvo 6 ratones.

Estudio de la dependencia del GHSR en el acceso de la ghrelina circulante al LCR

Se realizaron medidas de los niveles de ghrelina tanto en plasma como en el LCR de ratones WT y deficientes del GHSR, utilizando el mismo kit de ELISA descrito en la sección 6.1.4. Los ratones a los que se les realizaron las medidas fueron expuestos a tres condiciones experimentales distintas: 1) ratones alimentados *ad libitum* inyectados con vehículo por vía SC; 2) ratones alimentados *ad libitum* inyectados con ghrelina por vía SC; y 3) ratones expuestos a un protocolo de 60% de restricción calórica¹⁸. Las inyecciones para los grupos 1 y 2 y las extracciones de LCR se realizaron de la misma forma que se describió anteriormente. Las muestras de plasma se obtuvieron por decapitación de los ratones al finalizar la extracción de LCR (15 minutos post-inyección, en el caso de los grupos 1 y 2). Se midieron 6

muestras de plasma por condición experimental y tres pools de LCR, cada uno formado por muestras extraídas de 3 ratones, de aproximadamente 30 μ l.

- Procesamiento del plasma:

Las muestras colectadas de sangre troncal fueron colocadas en tubos conteniendo EDTA (1mg/ml final) en hielo. Se agregó a cada muestra el inhibidor de proteasas, ácido p-hidroximercuribenzoico, en una concentración final de 0,4 mM. Posteriormente se centrifugó 5 minutos a 4000 rpm a 4°C, e inmediatamente el plasma obtenido se trató con una décima parte de HCl 1M para preservar la acilación y poder almacenarlos a -80°C hasta su uso.

- Protocolo de restricción calórica:

Se utilizó un protocolo de restricción calórica previamente descrito¹⁸. Brevemente, todos los días a las 5 p.m. se les colocó a los animales su alimento habitual, en una cantidad que representa el 40% de la cantidad diaria en gramos que consumen en condiciones *ad libitum* (estimada por controles diarios durante al menos una semana). Luego de 7 días de este protocolo, se los utilizó para las extracciones de LCR y sangre, procedimientos que se realizaron entre las 3 y las 6 p.m.

Estudio *in vitro* de la dependencia del GHSR en la internalización de rF-ghrelina en los plexos coroideos

Se obtuvieron explantes de plexos coroideos de la siguiente manera: se sacrificaron ratones macho adultos de genotipo WT o deficientes del GHSR mediante decapitación bajo anestesia. Posteriormente, se extrajeron sus cerebros y se disectaron los plexos coroideos con pinzas bajo lupa binocular en medio Hanks frío para prolongar la viabilidad del tejido. Luego, los plexos coroideos se transfirieron a medio Hanks nuevo y se los incubó a 37°C durante 15 minutos, en una atmósfera con 5% de CO₂ para estabilizar el tejido. Luego, se procedió a agregar al medio rF-ghrelina en una concentración de 300 nM y se los incubó por 15 minutos a 37°C. Posteriormente, se los lavó con PBS y se los fijó con formaldehído 4% en PBS a 4°C. Finalmente, se los lavó otra vez con PBS, se realizó una tinción nuclear con Hoechst, se los volvió a lavar con PBS y se los montó en medio de montaje para fluorescencia, utilizando un separador perforado entre cubre y portaobjetos para evitar la deformación del tejido. Se tomaron microfotografías del tejido (ver "*Obtención de imágenes*") y se cuantificaron dos parámetros: 1) el porcentaje de células con marca fluorescente roja asociada a rF-ghrelina, que se obtuvo dividiendo el número de células que incorporaron rF-ghrelina por el número total de células, estimado utilizando la marca de Hoechst, y multiplicando por 100; y 2) la intensidad promedio de fluorescencia roja presente en cada célula considerada positiva para rF-ghrelina (ver "*Análisis neuroanatómicos cuantitativos*").

Se realizaron, además, controles negativos (incubación sin rF-Ghrelina). Adicionalmente, se llevó a cabo la incubación de explantes provenientes de ratones WT con rF-Ghrelina en presencia de un exceso molar (10:1 o 100:1) del ligando del GHSR JMV2959.

Estudio *in vitro* de la dependencia del GHSR en la internalización de rF-ghrelina en los tanicitos hipotalámicos

Se utilizaron tres tipos diferentes de cultivos de tanicitos para este bloque de experimentos.

En primer lugar, se utilizaron los cultivos primarios de tanicitos de rata descritos en el capítulo 2, para evaluar si la incorporación de rF-ghrelina en las células disminuía en presencia del ligando del GHSR JMV2959. Para ello, se utilizaron los tanicitos al día 7 de cultivo y se los lavó con medio de cultivo dos veces para luego pre-incubarlos con vehículo solo (medio Hanks) o conteniendo una relación molar 10:1 o 100:1 (3 μM o 30 μM) de JMV2959 durante 15 minutos a 37°C. A continuación, se los incubó con vehículo solo o conteniendo 300 nM de rF-ghrelina durante 15 minutos a 37°C. Luego, se lavó el cultivo tres veces con PBS frío y se lo fijó con paraformaldehído 4% en PBS durante 30 minutos a 4°C. Finalmente, se volvió a lavar tres veces con PBS y se montaron los vidrios sobre portaobjetos con medio de montaje para fluorescencia y se tomaron microfotografías a 40X y 63X, sobre las que luego se realizaron cuantificaciones de intensidad de fluorescencia (ver “*Obtención de imágenes*” y “*Análisis neuroanatómicos cuantitativos*”). Para cada condición se utilizaron tres vidrios y se analizaron 20-40 células por vidrio.

En segundo lugar, se pusieron a punto cultivos de tanicitos de ratón, adaptando el protocolo descrito para rata. El protocolo no tuvo modificaciones a excepción del agregado de trombina, que se realizó el primer día de cultivo, en lugar de al día tres. Se realizaron cultivos de tanicitos de ratones WT y deficientes del GHSR y, al día 7 de cultivo, se los lavó con medio de cultivo dos veces y se los incubó con vehículo (medio Hanks) solo o conteniendo 300 nM de rF-ghrelina durante 15 minutos a 37°C. Luego, se los lavó con PBS tres veces y se los fijó y montó como se describió antes. De la misma forma, se obtuvieron las microfotografías de 20 a 40 células por vidrio y se utilizaron 4-6 vidrios por condición para realizar las cuantificaciones de intensidad de fluorescencia (ver “*Obtención de imágenes*” y “*Análisis neuroanatómicos cuantitativos*”).

En tercer lugar, se utilizó un cultivo secundario de tanicitos, que forman una monocapa de células, descrito previamente en otros trabajos⁹². Mientras que el primer tipo de cultivo utilizado permite la obtención de células morfológicamente conservadas, lo cual nos permite analizar y tomar microfotografías de cada célula por separado, el cultivo confluyente nos permite tener una mayor cantidad de células y realizar otro tipo de medidas, como por ejemplo cuantificaciones de fluorescencia en lisados celulares utilizando un fluorímetro. Se incubaron las células de este tercer tipo de cultivo con vehículo (medio de cultivo) solo o conteniendo rF-ghrelina 50 nM durante 15 minutos a 37°C o a 4°C. Luego, se lavaron las células tres veces con PBS y se fijaron y montaron como se describió antes, para la toma de microfotografías (ver “*Obtención de imágenes*”).

En un experimento independiente, se analizó la incorporación de rF-ghrelina en los tanicitos del cultivo secundario en presencia de JMV2959 de manera análoga a lo realizado con el cultivo primario. Para ello, se pre-incubaron las células con vehículo solo o conteniendo una relación molar 10:1 o 100:1 (0,5 μ M o 5 μ M) de JMV2959 durante 15 minutos a 37°C. A continuación, se los incubó con vehículo solo o conteniendo 50 nM de rF-ghrelina durante 15 minutos a 37°C. Luego, se lavaron las células tres veces con PBS frío sobre hielo y se lisaron por agregado de Tritón (0,01%) y disgregación mecánica. Luego se centrifugaron las células lisadas a 13.000 rpm durante 15 minutos 4°C y se midió el sobrenadante en un espectrofluorímetro, utilizando una curva de calibración realizada con distintas concentraciones de rF-ghrelina en un medio que contuvo medio de cultivo de ayuno con agregado de Tritón en la misma proporción que tuvieron las células.

Medidas de expresión del GHSR en los plexos coroideos y en los tanicitos

Se midieron los niveles de expresión del GHSR tanto en explantes de plexos coroideos como en tanicitos de ratón *in vivo* y en tanicitos de rata en cultivo. Para ello, utilizamos tres estrategias distintas.

○ Medidas de expresión del GHSR en plexos coroideos:

Estas medidas se realizaron utilizando explantes de plexos coroideos de ratones WT y deficientes del GHSR, obtenidos como se indicó previamente. Los plexos coroideos se colectaron en TRIzol Reagent y se aisló ARN total utilizando el protocolo indicado por el fabricante. La concentración y la pureza del ARN fue estimada en un espectrofotómetro NanoDrop Lite (Thermo Scientific). 1 μ g de ARN total fue transcrito de forma reversa a ADN complementario (ADNc) utilizando primers hexaméricos al azar y la transcriptasa reversa del Virus Moloney de la Leucemia Murina (Promega). Se realizó luego una PCR cuantitativa (qPCR, de sus siglas en inglés para *quantitative PCR*) para GHSR por triplicado con el kit PCR Mix Plus HOT FIREPol EvaGreen (Solis BioDyne), utilizando un sistema de PCR en tiempo real StepOne Cycler (Applied Biosystems Inc.). La pureza del producto final fue confirmada mediante curvas de disociación y se realizó una electroforesis de muestras al azar en un gel de agarosa. Los niveles de expresión fueron determinados utilizando el método de la curva estándar relativa, normalizando la expresión a la proteína ribosomal L19 (gen de referencia). Las secuencias de los primers para GHSR fueron: sentido 5'-GCTCTGCAAACCTCTCCA-3'; antisentido 5'-AAGCAGATGGCGAAGTAG-3' (GenBank Accession No. NM_177330.4); tamaño del producto 99 pares de bases (pb). Las secuencias de los primers para L19 fueron: sentido 5'-AGCCTGTGACTGTCCATTCC-3'; antisentido 5'-TGGCAGTACCCTTCCTCTTC-3' (GenBank Accession No. NM_009078.2); tamaño del producto 99 bp.

○ Medidas de expresión en tanicitos de ratón *in vivo*:

Estas medidas se realizaron utilizando los ratones Ai14 (ver "*Animales experimentales*"), inyectados en el tercer ventrículo con la proteína Tat-cre, como se describió previamente en otros trabajos¹⁰⁰.

Brevemente, se anestesiaron ratones adultos Ai14 y se les inyectó por vía ICV una proteína Tat-cre recombinante a un flujo de 1,5 ml durante 5 minutos, en una concentración de 2,1 mg/ml, generada como se detalla en otro trabajo¹⁴⁷. Esta proteína es una cre-recombinasa de fusión, que es permeable a la membrana celular e induce una recombinación específica entre dos sitios loxP de ADN, permitiendo en estos ratones la expresión de la proteína fluorescente roja TdTomato. Es importante mencionar que TdTomato sólo se expresará en las células endimarias y los tanicitos, que son las únicas células en contacto con el LCR, en las cuales puede internalizarse la proteína Tat-cre. Al día siguiente de la inyección, los ratones fueron anestesiados y sacrificados. Se extrajeron sus cerebros, se micro-disectaron las EM y las células de esa región se disociaron utilizando un sistema de disociación Papain Dissociation System (Worthington, Lakewood, NJ) para obtener suspensiones de células separadas. Luego, se utilizó citometría de flujo con separación de células para coleccionar las células positivas para TdTomato y se aisló ARN de las mismas. A continuación, se realizó una qPCR para medir los niveles de expresión del GHSR y del gen de actina (gen de referencia). La qPCR fue realizada por un sistema Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System, utilizando la unión específica de exón TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems). Los primers oligonucleótidos y la sonda fluorescente para la PCR TaqMan en tiempo real fueron producidas por Applied Biosystems (GHSR de ratón: Mm00616415; Actina de ratón: Mm00607939).

- Medidas de expresión en tanicitos de rata en cultivo:

Se utilizaron los cultivos secundarios de tanicitos de rata para medir la expresión del GHSR en las células. Para ello, se aisló ARN total de 6 placas de cultivos de tanicitos de rata utilizando el reactivo de lisis QIAzol (Qiagen) y la qPCR se realizó como se describió previamente para los tanicitos aislados de ratones Ai14. Nuevamente, los primers oligonucleótidos y la sonda fluorescente para la PCR TaqMan en tiempo real fueron producidas por Applied Biosystems (GHSR de rata: Rn00821417; Actina de rata: Rn00667869).

6.4. Estudio de los mecanismos moleculares por los cuales la ghrelina es internalizada en las células de la barrera sangre-LCR

Estudio de los efectos de distintos inhibidores de la endocitosis en la internalización de ghrelina en las células de la barrera sangre-LCR utilizando una estrategia *in vitro*

Para estudiar el efecto de inhibidores de endocitosis sobre el proceso de internalización de la ghrelina en las células de la barrera sangre-LCR se utilizaron los explantes de plexos coroideos y los cultivos secundarios en monocapa de tanicitos, descritos anteriormente. Los inhibidores que se utilizaron fueron: 1- Colchicina: inhibe la polimerización de los microtúbulos a través de su unión a la tubulina, afectando a la estructura del citoesqueleto celular y a todo mecanismo de transporte que lo

involucre. En principio, es un inhibidor general de cualquier proceso de tránsito celular. Se utilizó en estos experimentos en una concentración de 1 mM durante 45 minutos de incubación (Sigma-Aldrich). 2- Pitstop 2: inhibe de manera selectiva los procesos de endocitosis mediados por clatrina, ya que interfiere con el ensamblaje de la membrana vesicular formada por las unidades de clatrina. Se utilizó en una concentración de 30 μ M durante 30 minutos de incubación (#SML 1169, Sigma-Aldrich). 3- Dyngo 4a: inhibe la acción de la dinamina, una GTPasa requerida para el proceso de escisión de las vesículas endocíticas de la membrana. Se utilizó en una concentración de 30 μ M durante 30 minutos de incubación (#ab120689, Abcam). 4- Metil β -ciclodextrina: inhibe procesos de endocitosis mediados principalmente por caveolina al secuestrar el colesterol de la membrana plasmática. Se utilizó en una concentración de 1 mM durante 30 minutos de incubación (#C4555, Sigma-Aldrich). Las concentraciones y los tiempos de incubación utilizados se basan en datos de bibliografía^{93,148-150}.

Los explantes de plexos coroideos se extrajeron como se explicó en el punto anterior y se los pre-incubó con vehículo (medio Hanks) solo o conteniendo las concentraciones indicadas de colchicina o Pitstop, durante los tiempos mencionados anteriormente a 37°C. Luego, se adicionó al medio rF-ghrelina 30 nM y se los incubó durante 15 minutos a 37°C. Posteriormente se realizaron los mismos pasos de lavado, fijación, montaje y cuantificación descriptos en el punto anterior. Por otro lado, los cultivos se utilizaron en confluencia. En primer lugar, se pre-incubaron los cultivos con vehículo (medio de cultivo) solo o conteniendo las concentraciones indicadas de colchicina, Pitstop, Dyngo o metil β -ciclodextrina, durante los tiempos mencionados anteriormente a 37°C. Luego, retiró el medio y se incubaron las células con vehículo solo, conteniendo rF-ghrelina (50 nM) o conteniendo rF-ghrelina (50 nM) y cada uno de los inhibidores utilizados durante 15 minutos a 37°C. Posteriormente se lavó tres veces con PBS frío y se agregó buffer de lisis (Tritón 1% en PBS) para obtener el lisado celular (**Tabla 1**).

Condición	t=0	t=15	t=30	t=45	t=60
Sin rF-ghrelina	vehículo	vehículo	vehículo	vehículo	Lavado Lisado celular
rF-ghrelina	vehículo	rF-ghrelina 50 nM	Lavado Lisado celular	-----	-----
Colchicina	Colchicina 1mM	-----	-----	Colchicina 1 mM + rF-ghrelina 50 nM	Lavado Lisado celular
Pitstop	Pitstop 30 μ M	-----	Pitstop 30 μ M + rF-ghrelina 50 nM	Lavado Lisado celular	-----

Dyngo	Dyngo 30 μ M	-----	Dyngo 30 μ M + rF-ghrelina 50 nM	Lavado Lisado celular	-----
M β -ciclodex	M β -ciclodex 1 mM	-----	M β -ciclodex 1 mM + rF-ghrelina 50 nM	Lavado Lisado celular	-----

Tabla 1. Protocolo experimental utilizado para los cultivos de tanicitos. Se muestra el diagrama experimental para cada condición utilizada. A t=0 se pre-incubó el cultivo con vehículo sólo o conteniendo alguno de los inhibidores en las concentraciones mencionadas. Únicamente para el control positivo, rF-ghrelina, se incubó el cultivo con el análogo de ghrelina durante 15 min, luego se lavaron y lisaron las células. Para las condiciones con inhibidor, luego de la pre-incubación con los mismos durante los tiempos mencionados, se incubó el cultivo con una mezcla del inhibidor y rF-ghrelina durante 15 min, momento en el cual se lavaron y lisaron las células.

Una vez colectado el lisado celular, se centrifugó a 13.000 rpm durante 15 minutos a 4°C y se midió la fluorescencia del sobrenadante en un fluorímetro (Ex: 650/9; Em: 680/15).

Estudio de los efectos de distintos inhibidores de la endocitosis en la internalización de ghrelina en las células de la barrera sangre-LCR utilizando una estrategia *in vivo*

A continuación, evaluamos los efectos de la administración *in vivo* de dos de los inhibidores con los cuales vimos efectos sobre la internalización de rF-ghrelina *in vitro*, colchicina y Pitstop2. Para ello, implantamos ratones con cánulas ICV como se describió antes (ver “*Cirugías estereotáxicas intracerebroventriculares (ICV)*”) y, luego de una semana de recuperación, se les inyectó por vía ICV en primer lugar vehículo (LCRa) solo o conteniendo colchicina (16 μ g/ratón) o Pitstop (6 nmol/ratón). La dosis de colchicina fue la misma que previamente se había utilizado en otros trabajos en el laboratorio³⁹ y la dosis de Pitstop se eligió de manera que tuviera una relación similar con la concentración de rF-ghrelina a la utilizada *in vitro*. Luego de 300 o 60 minutos, respectivamente, se les inyectó a los animales también por vía ICV F-ghrelina (60 pmol/ratón) y se los sacrificó por perfusión 15 minutos después. Posteriormente, los cerebros se cortaron en secciones coronales sobre las que se realizó una IHQ contra fluoresceína (ver “*Perfusión y preparación de muestras de cerebro*”). Se tomaron microfotografías de estas secciones y luego se cuantificó, en los plexos coroideos, el porcentaje de células IR para fluoresceína del total de células epiteliales y la intensidad de fluorescencia de las células positivas. En la EM, se cuantificó la intensidad de fluorescencia tanto en los cuerpos de los tanicitos β como en sus prolongaciones (ver “*Análisis neuroanatómicos cuantitativos*”).

Análisis de la expresión de marcadores de endocitosis en los tanicitos hipotalámicos

Aquí analizamos la presencia de co-localizaciones entre rF-ghrelina y fluoroesferas o el marcador de endosomas tempranos Rab5A. Para ello, utilizamos un cultivo primario de tanicitos al día 7 y, en primer

lugar, los incubamos con una combinación de fluoeresferas verdes + rF-ghrelina (300 nM) durante 15 minutos a 37°C. Luego, las células se lavaron y se fijaron. Por otro lado, se incubaron los cultivos con rF-ghrelina 300 nM durante 15 minutos a 37°C, se lavaron las células y se fijaron. Luego, se realizó una ICQ fluorescente sobre las células contra Rab5A (ver "*Inmuno-citoquímicas (ICQs)*"). Posteriormente, en ambos casos, los vidrios de cultivo se montaron para observación por microscopía de fluorescencia (ver "*Obtención de imágenes*").

Estudio del proceso de liberación de la ghrelina internalizada en las células de la barrera sangre-LCR

Aquí, estudiamos el proceso de liberación de la rF-ghrelina inicialmente internalizada por los plexos coroideos y los tanicitos.

Para los plexos coroideos, utilizamos los explantes previamente descritos y los incubamos durante 15 minutos con rF-ghrelina (30 nM) a 37°C. Luego, lavamos los explantes con medio Hanks y los incubamos con medio Hanks fresco durante 15 minutos a 37°C. Finalmente, lavamos con PBS y fijamos los explantes para su observación microscópica de la misma forma que se indicó anteriormente. El control de este experimento consistió en explantes de plexos coroideos sometidos al mismo protocolo inicial de incubación con rF-ghrelina, pero a los que posteriormente fijamos sin que pasaran por la etapa de incubación con medio fresco (etapa de liberación).

Para los tanicitos, nuevamente utilizamos los cultivos secundarios en confluencia e incubamos las células a 37°C con rF-ghrelina (50 nM) durante 15 minutos. Luego, lavamos el cultivo dos veces con medio de cultivo a 37°C y lo incubamos con vehículo (medio de cultivo) fresco durante 15 minutos a 37°C. Posteriormente recogimos el sobrenadante, lavamos las células con PBS frío y las lisamos con buffer de lisis, de la misma forma que se explicó previamente. Una vez colectado el lisado celular, se centrifugó a 13.000 rpm durante 15 minutos a 4°C y se midió la fluorescencia tanto del sobrenadante como del medio remanente colectado en un fluorímetro (Ex: 650/9; Em: 680/15).

7. Perfusión y preparación de muestras de cerebro

Para fijar las muestras de cerebro, los ratones se perfundieron trans-cardíacamente con formaldehído al 4% en PBS como fijador. Inicialmente, los ratones se anestesiaron y se sujetaron a una mesa de cirugía por las extremidades con el abdomen hacia arriba. Luego, cavidad torácica se abrió con el objetivo de acceder al corazón. El sistema de perfusión se conectó directamente al ventrículo izquierdo del corazón con una aguja 22G, y luego se realizó una incisión en la aurícula derecha para permitir el escape de la circulación de retorno de los líquidos de lavado. Inicialmente, los ratones se perfundieron 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, se perfundieron con el fijador, formaldehído al 4% en PBS, durante

10 minutos a un flujo de 5 mL/minuto. Al finalizar la perfusión, los cerebros se aislaron y se post-fijaron en una solución de formaldehído al 4% en PBS durante 2 horas. Finalmente los cerebros se crio-preservaron mediante la incubación en una solución de sacarosa al 20% en PBS durante toda la noche. Al día siguiente, los cerebros se congelaron en hielo seco y se cortaron en 4 series equivalentes de secciones coronales de 40µm de espesor utilizando un criostato (Leica, CM1860). En caso de los cerebros provenientes de ratones inyectados con F-ghrelina o Scr-F-ghrelina la crio-preservación se realizó en una solución de sacarosa al 20% más formaldehído al 1% en PBS. El procesamiento posterior se realizó de igual manera para todos los cerebros.

8. Tinciones e Inmuno-histoquímicas (IHQs) cromogénicas y fluorescentes

8.1. Tinciones

Tinción de Nissl

En primer lugar, las secciones coronales de cerebro se montaron secuencialmente en portaobjetos de vidrio, se lavaron durante 1 minuto en H₂O destilada y se incubaron con solución de Tionina al 0,1% durante 20 minutos. Finalmente, las secciones se deshidrataron pasándolas 1 vez durante 1 minuto por H₂O destilada, luego 2 veces durante 1 minuto por alcohol 96°, 2 veces durante 1 minuto por alcohol 100° y por último 5 minutos por xilol. Finalmente se colocó el cubreobjetos con medio de montaje (Bálsamo de Canadá). Esta coloración tiñe los cuerpos de Nissl que son acumulaciones basófilas que se encuentran en el citoplasma de las células.

8.2. IHQs cromogénicas

En primer lugar, las secciones coronales de cerebro se lavaron 3 veces durante 10 minutos cada vez con PBS en agitación. Posteriormente, se incubaron con 10 mL de H₂O₂ 0,5% en PBS durante 30 minutos. Luego de otros 3 lavados, las secciones de cerebro se incubaron con solución bloqueante (3% suero normal de burro y 0,25% TritonX en PBS) durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Finalmente, se incubaron con el anticuerpo primario específico para cada IHQ durante 48 hs a 4°C (**Tabla 2**). Después de la incubación con el anticuerpo primario, se realizaron nuevamente 3 lavados y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente (Tabla 2). Luego, las secciones se lavaron 3 veces y se incubaron nuevamente durante 1 hora con el complejo avidina-peroxidasa biotinilada. Finalmente, luego de otros 3 lavados, se reveló la reacción con el sustrato 3,3'-diaminobencidina comercial en presencia NiCl₂, lo cual produjo un precipitado negro-violeta. El tiempo de revelado se especifica en la Tabla 2.

8.3. IHQs fluorescentes simples

En primer lugar, las secciones coronales de cerebro se lavaron 3 veces durante 10 minutos cada vez con PBS en agitación. Luego, se incubaron con solución bloqueante (3% suero normal de burro y 0,25% TritonX en PBS) durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación y finalmente se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente durante 48 hs a 4°C. A continuación, y luego de realizar 3 lavados, se incubaron durante 2 hs a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario conjugado al fluoróforo elegido (Tabla 2).

8.4. IHQs fluorescentes dobles

Para las IHQs fluorescentes dobles las secciones de cerebro se trataron de igual forma que describimos anteriormente para cada IHQ fluorescente simple, pero en este caso se incubaron con los dos anticuerpos primarios juntos durante 48 hs: el anticuerpo anti-fluoresceína generado en cabra junto con el anticuerpo anti-vimentina generado en gallina. Luego, se realizaron 3 lavados y se incubaron las secciones de cerebro en primer lugar con el anticuerpo secundario anti-cabra conjugado a Alexa 488 producido en burro durante 2 horas. Luego, se volvieron a realizar 3 lavados y se incubaron durante otras 2 hs con el anticuerpo secundario anti-gallina conjugado a Alexa 594 producido en cabra (Tabla 2). Este procedimiento se realizó de esta forma para evitar la inmuno-reacción cruzada entre los anticuerpos secundarios.

Las diluciones de los anticuerpos se prepararon en solución bloqueante en todos los casos. Para el caso particular de las IHQs cromogénicas, una vez finalizadas, las secciones se montaron secuencialmente en orden antero-posterior en portaobjetos de vidrio previamente gelatinizados, se deshidrataron en sucesivos pasajes por alcoholes de concentración creciente (2 minutos en etanol 70 %, 96 %, 100 % y, finalmente, 30 minutos en xileno) y se colocó el cubreobjetos con medio de montaje (Bálsamo de Canadá) para su posterior examen al microscopio óptico de campo claro. En el caso de las IHQs fluorescentes, las secciones se montaron secuencialmente protegiéndolas de la luz y se colocó directamente el cubreobjetos con un medio de montaje que atenúa el fenómeno de blanqueamiento (DABCO + Hoechst) para observarlas al microscopio de fluorescencia.

Anticuerpo primario	Concentración	Anticuerpo secundario	Concentración	Tiempo de revelado
Anti-cfos	1/2000 cromogénica	Anti-conejo biotinilado	1/4000	10 min
Anti-fluoresceína	1/7000 cromogénica	Anti-cabra biotinilado	1/2000	7 min
Anti-ghrelina (cabra)	1/500 fluorescente	Anti-cabra Alexa 488	1/1000	2 hs
Anti-ghrelina	1/500	Anti-cabra	1/1000	2 hs

(gallina)	fluorescente	Alexa 594		
Anti-fluoresceína	1/1000 fluorescente	Anti-cabra Alexa 488	1/1000	2 hs
Anti-vimentina (gallina)	1/2000 fluorescente	Anti-gallina Alexa 594	1/1000	2 hs

Tabla 2. Anticuerpos utilizados para IHQs con sus respectivas concentraciones de uso.

9. Inmuno-citoquímicas (ICQs)

Las ICQs realizadas fueron fluorescentes en todos los casos y se realizaron sobre cultivos de tanicitos fijados con paraformaldehído 4% en PBS (30 minutos a 4°C) al día 7 de cultivo. En primer lugar, se lavaron las células tres veces con PBS, luego se incubaron con solución bloqueante (3% suero normal de burro y 0,25% TritonX en PBS) durante 1 hora a temperatura ambiente y finalmente se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente durante 24 hs a 4°C. Luego, se lavaron 3 veces con PBS, se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente durante 2 hs a temperatura ambiente y se volvieron a lavar 3 veces con PBS. En todos los casos, las diluciones de los anticuerpos se realizaron en solución bloqueante. En el caso de que la ICQ fuera doble, se incubaron de manera conjunta los dos anticuerpos primarios y también los dos secundarios. Finalmente, se montaron los vidrios sobre portaobjetos utilizando un medio de montaje que atenúa el fenómeno de blanqueamiento (DABCO + Hoechst) para observarlas al microscopio de fluorescencia. Los anticuerpos utilizados y sus condiciones se especifican en la **Tabla 3**.

Anticuerpo primario	Concentración	Anticuerpo secundario	Concentración	Tiempo de Revelado
Anti-vimentina (ratón)	1/10	Anti-ratón Alexa 488	1/1000	2 hs
Anti-DARPP32	1/50	Anti-cabra Alexa 594	1/500	2 hs
Anti-GFAP	1/200	Anti-conejo Alexa 594	1/500	2 hs
Anti-NeuN	1/400	Anti-ratón Alexa 594	1/1000	2 hs
Anti-Iba1	1/2000	Anti-conejo Alexa 594	1/1000	2 hs
Anti-Rab5A	1/1000	Anti-conejo Alexa 488	1/1000	2 hs

Tabla 3. Anticuerpos utilizados para ICQs con sus respectivas concentraciones de uso.

10. Análisis neuroanatómicos cuantitativos

Para realizar los análisis neuroanatómicos cuantitativos se utilizó el atlas del cerebro de ratón de Paxinos y Franklin¹⁴² para identificar las secciones coronales del cerebro y localizar los límites anatómicos de cada región cerebral analizada. El ARC se estudió bilateralmente entre los bregmas -1,58 y -1,94. Se estudiaron los plexos coroideos tanto de los ventrículos laterales como del tercer ventrículo dorsal y la EM entre los bregmas -1,58 y -1,94.

10.1. Conteo de células IR para c-fos

Para determinar el número total de células IR para c-fos en el ARC, las células se cuantificaron a través de todo el núcleo en 1 de 4 series completas de las secciones coronales de 40 µm obtenidas. Los datos se expresaron como el número de células IR/sección/lado, en la cual el número de células totales cuantificadas en una de las series de secciones coronales se dividió por el número de secciones en las que se realizaron los recuentos. Todos los análisis cuantitativos se realizaron de manera independiente por al menos 2 observadores. Con el fin de obtener el número real de neuronas, la doble contabilización se corrigió de acuerdo al método de Abercrombie (Abercrombie 1946), en el cual el número total de células contabilizadas se multiplica por un factor de corrección que se calcula con la fórmula: $T/(T+h)$, donde T= espesor del corte, y h= el diámetro medio de la célula a lo largo del eje perpendicular al plano de la sección. El diámetro medio de las células cuantificadas se determinó en al menos 30 células o núcleos con el programa Fiji-ImageJ¹⁵¹.

10.2. Cuantificación de los perfiles de difusión de F-ghrelina

La difusión de F-ghrelina al parénquima periventricular fue cuantificada en los cortes de cerebro de ratón utilizando la señal fluorescente directa o la señal obtenida luego del procesamiento por IHQ cromogénica, dependiendo de la ruta de administración del péptido. Se incluyeron las secciones entre los bregmas -1,58 y -1,94.

Para las inyecciones centrales de F-ghrelina se utilizaron medidas de fluorescencia directa. Para ello, se tomaron microfotografías de epifluorescencia de los cortes de cerebro, las cuales fueron corregidas para compensar la inhomogeneidad de la iluminación de la lámpara fluorescente. La contribución de la autofluorescencia del tejido al canal verde fue estimada utilizando el canal rojo y restada a cada píxel, de forma que el promedio de lectura de la intensidad de fluorescencia en áreas alejadas de los ventrículos fuera cero. El perfil de intensidad de fluorescencia de la F-ghrelina fue luego medido de manera perpendicular al tercer ventrículo, a lo largo de un rectángulo de 500 µm de ancho, promediando en cada punto los 50 µm de altura del rectángulo. Este rectángulo se colocó 700 µm o 80

μm dorsal a la EM. La fluorescencia en el canal azul, dada por la tinción nuclear con Hoechst, también fue registrada y se la utilizó como referencia para alinear los cortes coronales.

Para las inyecciones sistémicas de F-ghrelina se utilizó la señal cromogénica dada por la IHQ anti-fluoresceína. Para ello, se tomaron microfotografías en campo claro de los cortes de cerebro teñidos con DAB. Las imágenes de 16-bits resultantes fueron corregidas utilizando una imagen promedio del fondo y los valores de intensidad de cada píxel fueron convertidos a valores de densidad óptica tomando el valor negativo del logaritmo del valor original, dividido por el valor de la imagen de fondo. Los perfiles de densidad óptica fueron tomados a un nivel dorsal y a uno ventral desde la EM, al igual que se describió previamente. La densidad óptica promedio de los últimos 25 μm cuantificados desde el tercer ventrículo fue sustraída a cada perfil y el primer punto cuyo valor superó este número fue utilizado para alinear los cortes coronales.

En ambos casos, se utilizó Fiji para todos los pasos de procesamiento y análisis de imágenes. Los análisis subsiguientes de los perfiles de fluorescencia o de densidad óptica se realizaron por bloques contiguos, utilizando valores promedios a lo largo de 20 μm en el eje X. El $D_{1/2}$ se calculó como la distancia desde el tercer ventrículo a la cual la señal alcanzó el 50% de su valor máximo.

10.3. Cuantificación de la intensidad de señal fluorescente de análogos fluorescentes de ghrelina

Para estimar la intensidad de la señal fluorescente de los cortes de cerebro de ratones inyectados con F-ghrelina o rF-ghrelina, de los tanicitos en cultivo y de los explantes de plexos coroideos, se tomaron microfotografías a baja y a alta magnificación en un microscopio de fluorescencia. Luego, utilizando el software Fiji, se delimitó cada célula o región, dependiendo del experimento, y se midió la intensidad de fluorescencia media en la misma.

10.4. Cuantificación del porcentaje de células con marca fluorescente

Para determinar el porcentaje de células con señal fluorescente (ya sea señal IR para fluoresceína, en el caso de haber realizado una IHQ contra dicho fluoróforo, o señal fluorescente roja, en el caso de haber utilizado rF-ghrelina), se toman microfotografías de los plexos coroideos o de la EM a alta magnificación. Luego, utilizando el software Fiji, se cuantifica a través de un macro el número de núcleos presentes identificados con el colorante Hoechst. Por otro lado, sobre la misma fotografía, se cuenta el número de células que poseen señal fluorescente. Por último, se calcula el porcentaje de células marcadas como: número de células con marca / número de núcleos * 100.

11. Obtención de imágenes

Las imágenes fluorescentes y de contraste de fase se adquirieron a distintas magnificaciones empleando cuatro microscopios diferentes dependiendo del caso: 1) un microscopio Zeiss AxioObserver D1 equipado con un módulo de iluminación estructurada Apotome 2 y una cámara monocroma AxioCam 506; 2) un microscopio Nikon Eclipse 50i con una cámara digital Nikon DS-Ri1; 3) un microscopio confocal Olympus FV 1000; o 4) un microscopio invertido Nikon TiS equipado con una cámara Nikon DS-Ri2. Fluoresceína y el fluoróforo Alexa 488 fueron excitados a 488 nm, el fluoróforo Alexa 594 fue excitado a 594 nm, el fluoróforo Dy647 fue excitado a 647 nm y el Hoechst fue excitado a 350 nm. El colorante naranja de acridina fue observado con un cubo de filtros de paso largo que permite excitar en la banda de 450-490 nm y recoger la fluorescencia por encima de los 515 nm.

Todas las imágenes de campo claro se adquirieron a baja magnificación (10X), utilizando un microscopio Nikon Eclipse 50i y una cámara digital Nikon DS-Ri1, en 8 o 16 bits y en formato tif.

Utilizamos dos programas de edición de imágenes, Fiji y Corel Draw X8 para ajustar el tamaño, contraste y brillo de las microfotografías para su presentación. Como se mencionó anteriormente, todos los análisis y cuantificaciones de imágenes se realizaron utilizando el software Fiji.

12. Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa GraphPad Prism versión 6.0. Los datos se expresan como la media \pm error estándar de la media (SEM), o como la mediana con el rango intercuartílico, dependiendo de si las muestras tenían distribución normal o no, respectivamente. Los análisis de normalidad se realizaron mediante el test de D'Agostino-Pearson o de Kolmogorov-Smirnov y los análisis de igualdad de varianza, mediante los test de F, de Bartlett o de Brown-Forsythe. Luego, el análisis estadístico utilizado dependió de cada condición experimental. Para los análisis estadísticos que involucraron dos grupos experimentales, se utilizó el test t de Student, para datos con distribución normal, o el test de Mann-Whitney para datos con distribución distinta de la normal. Para datos con distribución normal pero con varianzas distintas se utilizó un test t con corrección de Welch. Para el análisis de más de dos grupos experimentales con distribuciones normales se utilizó ANOVA de una vía. Este test fue seguido del test *post-hoc* de Bonferroni. Por otro lado, en el caso de tener más de dos grupos experimentales cuya distribución era distinta de la normal, se utilizó el test de Kruskal-Wallis seguido por el test *post-hoc* de Dunn. El test de ANOVA de dos vías, seguido del test *post-hoc* de Sidak o Bonferroni, se utilizó para comparar dos condiciones experimentales simultáneamente. Finalmente, el test de ANOVA de dos vías con medidas repetidas se utilizó para los casos en los que correspondía. Los test utilizados en cada caso particular, así como las significancias se especifican en las leyendas de las figuras.

RESULTADOS y DISCUSIÓN

**CAPÍTULO 1: ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE LAS CÉLULAS DE LA
BARRERA SANGRE-LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO PARA TRANSPORTAR LA
GHRELINA CIRCULANTE AL CEREBRO**

RESULTADOS

1. Estudio de la capacidad de internalización de F-ghrelina de las células que conforman la barrera sangre-LCR

Con el objetivo de determinar si las células que constituyen la barrera sangre-LCR son capaces de incorporar ghrelina, utilizamos un análogo fluorescente de ghrelina denominado F-ghrelina. La F-ghrelina es un análogo de la ghrelina que contiene 19 aminoácidos y está conjugado a una molécula de isotiocianato de fluoresceína, unida al extremo C-terminal. Es importante destacar que este análogo conserva los aminoácidos de la parte N-terminal de la molécula, los cuales son esenciales para su unión al receptor y como consecuencia posee actividad biológica, como lo indica el hecho de que su administración a ratones aumenta el consumo de alimento, de forma similar a la ghrelina nativa.

En primer lugar, estudiamos la capacidad de las células de la barrera sangre-LCR para incorporar F-ghrelina desde el LCR. Para ello, realizamos inyecciones centrales (por vía ICV) de F-ghrelina en ratones WT, 15 minutos después perfundimos al animal y analizamos la localización celular de la F-ghrelina en cortes coronales de cerebro. Debido a que la señal fluorescente de la molécula de fluoresceína es inestable, realizamos una IHQ fluorescente contra fluoresceína. Además, en los mismos cortes realizamos una IHQ fluorescente contra vimentina, un marcador específico de tanicitos y de células endoteliales. Los resultados mostraron que tanto las células de los plexos coroideos como los tanicitos hipotalámicos y algunas células endoteliales que revisten el tercer ventrículo cerebral poseían una intensa señal IR para fluoresceína. En los plexos coroideos, observamos señal IR en la superficie de la mayoría de las células epiteliales cuboidales, mientras que sólo en algunas observamos la señal en el interior, mostrando un perfil de distribución “en parches”. En las células que revisten el tercer ventrículo, encontramos señal IR tanto para fluoresceína como para vimentina localizada en los tanicitos hipotalámicos y en algunas células endoteliales de la parte dorsal del ventrículo. La señal IR para fluoresceína se localizó principalmente en los tanicitos β , cuyas prolongaciones se extienden hacia la zona externa de la EM y el ARC, y también en algunos tanicitos α , cuyas prolongaciones se extienden hacia el VMH y el DMH (**Figura 7**). En ratones WT en los que inyectamos vehículo (LCRa) por vía ICV y realizamos el mismo procedimiento, no observamos ninguna señal fluorescente.

En segundo lugar, estudiamos la capacidad de las células de la barrera sangre-LCR de incorporar F-ghrelina desde circulación. Para ello, realizamos inyecciones sistémicas (por vía SC) de F-ghrelina en ratones WT, 15 minutos después perfundimos al animal y analizamos la localización celular de la F-ghrelina en cortes coronales de cerebro utilizando la misma metodología descrita anteriormente. En este caso, la señal fluorescente IR para fluoresceína sólo fue evidente a alta magnificación, detectándose una señal granular, compatible con una señal vesicular, tanto en las células epiteliales de los plexos

coroideos como en los tanicitos hipotalámicos y en algunas células endimarias de la parte dorsal del tercer ventrículo. En ambos tipos celulares la señal se encontró enriquecida en la zona apical (**Figura 8**).

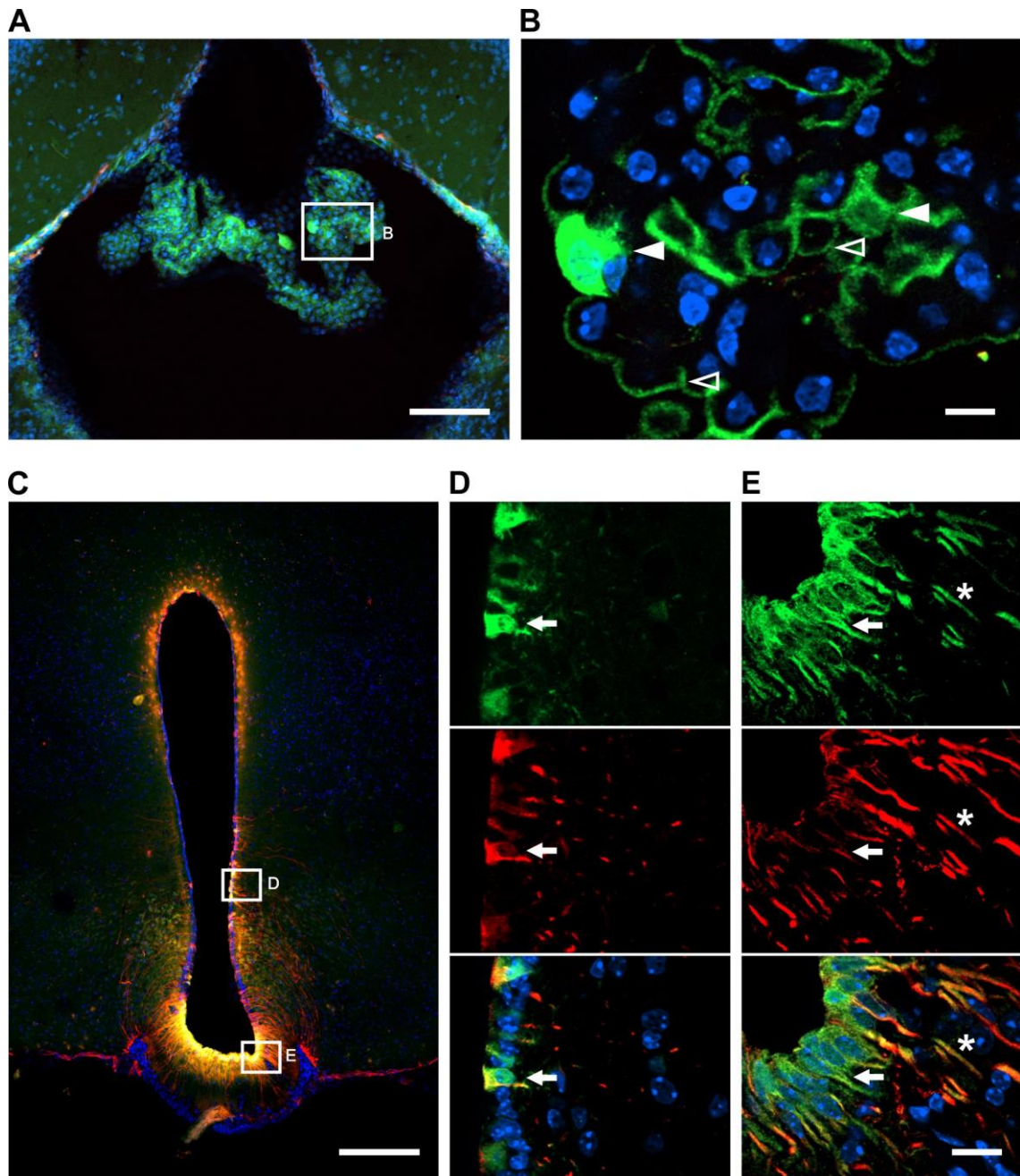


Figura 7. La F-ghrelina administrada de manera central es internalizada por las células de la barrera sangre-LCR. Las microfotografías muestran el patrón de distribución de la señal IR para fluoresceína (verde) y vimentina (rojo) en los plexos coroideos (**A**) y en la pared del tercer ventrículo hipotalámico (**C**) de ratones WT que fueron inyectados por vía ICV con F-ghrelina y perfundidos 15 minutos después. **B**, **D** y **E** muestran imágenes a alta magnificación de las áreas marcadas en las imágenes de baja magnificación. En **D** y **E**, los paneles superiores muestran la señal IR para fluoresceína, los paneles del medio, la señal IR para vimentina y los paneles inferiores muestran las colocalizaciones y los núcleos marcados con Hoechst. Las cabezas de flecha indican células de los plexos coroideos con señal IR para fluoresceína en el interior celular, mientras que las cabezas de flecha vacías señalan células en las cuales la señal se encuentra únicamente en su superficie. Las flechas señalan los cuerpos celulares de células endimarias o tanicitos

con señal IR para fluoresceína y vimentina y los asteriscos marcan los procesos de estas células. Barras de escala: 100 μm (baja magnificación, 10X) y 10 μm (alta magnificación, 63X).

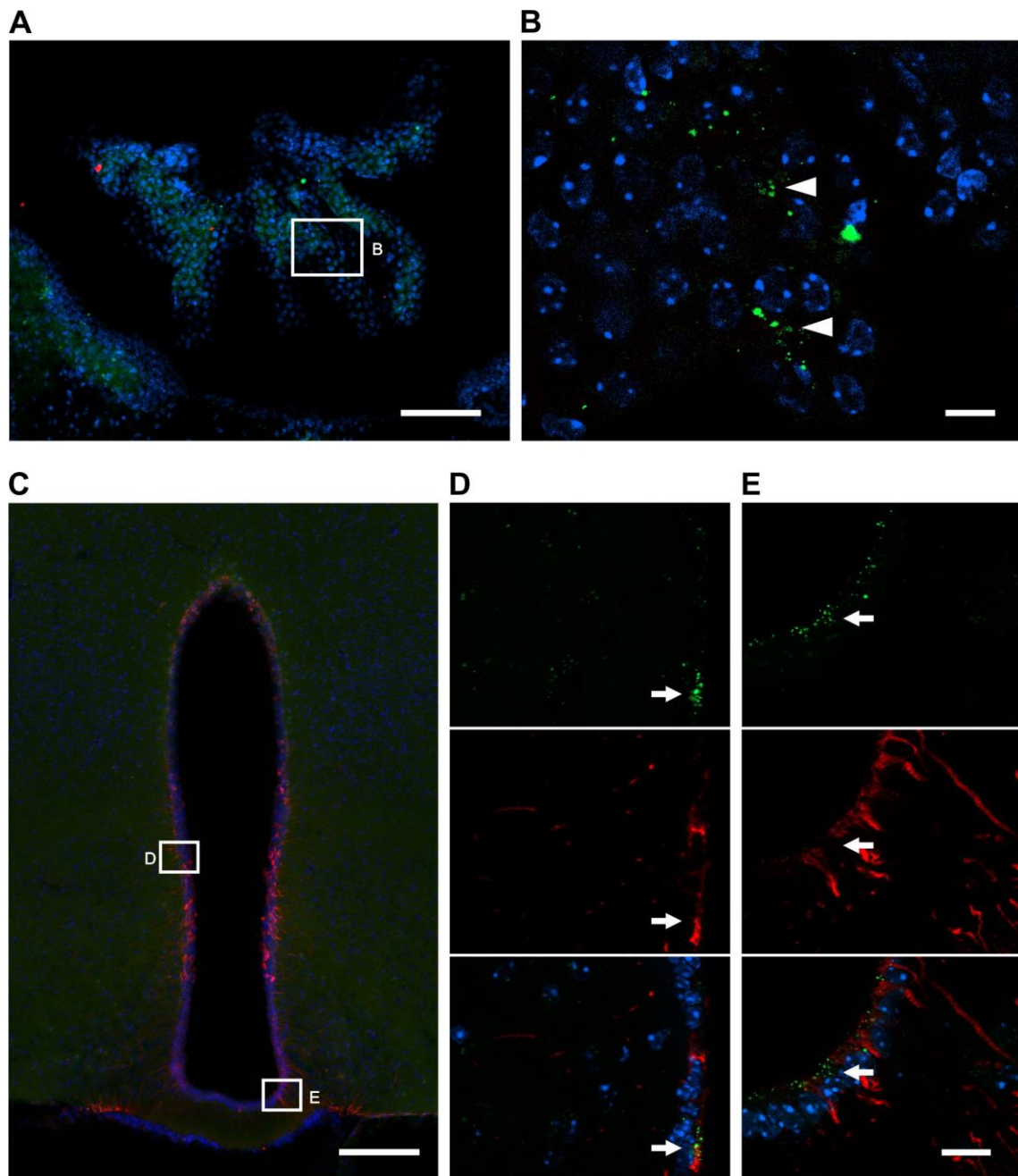


Figura 8. La F-ghrelina administrada de manera sistémica es detectada en las células de la barrera sangre-LCR. Las microfotografías muestran el patrón de distribución de la señal IR para fluoresceína (verde) y vimentina (rojo) en los plexos coroideos (A) y en la pared del tercer ventrículo hipotalámico (C) de ratones WT que fueron inyectados por vía SC con F-ghrelina y perfundidos 15 minutos después. B, D y E muestran imágenes a alta magnificación de las áreas marcadas en las imágenes de baja magnificación. En D y E, los paneles superiores muestran la señal IR para fluoresceína, los paneles del medio, la señal IR para vimentina y los paneles inferiores muestran las colocalizaciones y los núcleos marcados con Hoechst. Las cabezas de y las flechas indican señal IR en los plexos coroideos o en el tercer ventrículo, respectivamente. Barras de escala: 100 μm (baja magnificación, 10X) y 10 μm (alta magnificación, 63X).

2. Estudio de la capacidad de penetración de la F-ghrelina al parénquima cerebral adyacente al tercer ventrículo

Con el objetivo de estudiar si la F-ghrelina presente en el LCR es capaz de acceder al parénquima cerebral adyacente al tercer ventrículo, donde se encuentran algunos de los núcleos en donde actúa, inyectamos F-ghrelina a ratones WT por vía ICV o SC y analizamos la difusión al tejido a distintos tiempos.

En el caso de los cerebros de ratones inyectados por vía ICV, la señal fluorescente de F-ghrelina fue observable de manera directa (sin IHQ), de forma que se pudo cuantificar. Por el contrario, en el caso de los cerebros de ratones inyectados por vía SC, la señal fluorescente fue muy débil ya que la concentración efectiva del péptido que alcanza el cerebro es mucho menor por esta vía. Por esta razón, en este último caso realizamos una IHQ cromogénica contra fluoresceína, logrando así estabilizar y aumentar la señal para realizar una cuantificación. Esta técnica no se pudo aplicar con los cerebros de ratones inyectados por vía ICV, ya que la señal cromogénica se satura debido a la alta concentración del péptido. La cuantificación se realizó en el parénquima periventricular a dos niveles dorso-ventrales del tercer ventrículo: un nivel dorsal a la altura del DMH, donde las células ependimarias que revisten la pared del ventrículo carecen de uniones estrechas por lo que la F-ghrelina difundiría libremente entre las células; y un nivel ventral a la altura del ARC, donde los tanicitos β que revisten la pared del ventrículo presentan uniones estrechas entre sí, previniendo el pasaje libre de moléculas entre ellos.

En el caso de los cerebros de ratones inyectados con F-ghrelina por vía ICV, observamos una señal fluorescente, que no estuvo presente en los controles inyectados con vehículo, de mayor intensidad en la zona cercana a la pared ventricular (**Figura 9**). Para estimar la difusión, cuantificamos la intensidad de fluorescencia a lo largo del eje medio-lateral de secciones coronales de ratones inyectados con F-ghrelina por vía ICV y perfundidos 7 o 15 minutos después. La intensidad total de fluorescencia fue notablemente mayor en el nivel dorsal que en el ventral, para los dos tiempos estudiados. En el nivel dorsal, la señal fluorescente mostró un rápido decaimiento ($D_{\text{medio}} 52.2 \pm 7.3 \mu\text{m}$ y $33.3 \pm 4.6 \mu\text{m}$ para 7 y 15 minutos, respectivamente), en comparación con el nivel ventral ($D_{\text{medio}} 84.6 \pm 15.1 \mu\text{m}$ y $57.8 \pm 6.2 \mu\text{m}$ para 7 y 15 minutos, respectivamente). En el nivel dorsal, la fluorescencia total mostró una disminución de aproximadamente un 50% a los 15 minutos post tratamiento en comparación con la fluorescencia total a los 7 minutos post-tratamiento. En el nivel ventral, en cambio, la fluorescencia total no varió entre los 7 y los 15 minutos post-tratamiento (**Figura 10**).

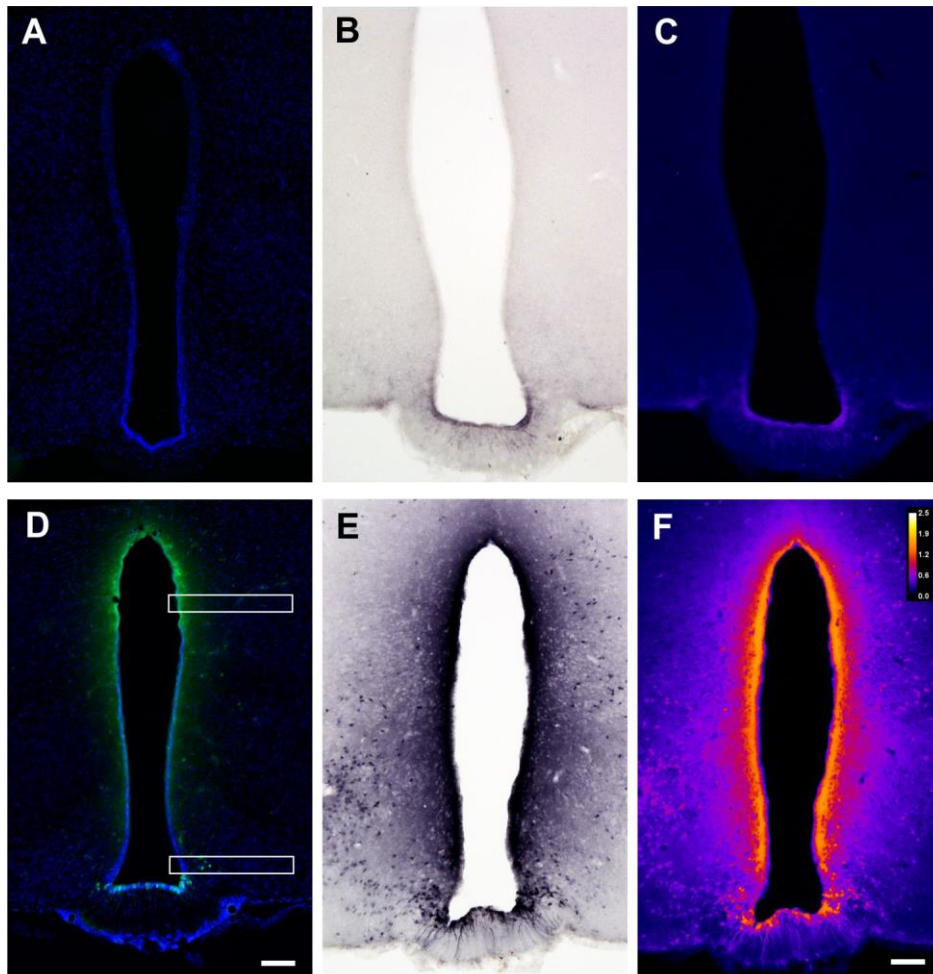


Figura 9. La F-ghrelina administrada de manera central difunde al parénquima cerebral. Las microfotografías muestran el tejido hipotalámico periventricular de ratones inyectados por vía ICV con vehículo (A-C) o F-ghrelina (D-F). A, D: Señal fluorescente directa; B, E: Señal IR cromogénica contra fluoresceína; C, F: Imágenes pseudo-coloreadas. Barra de escala: 100 μ m.

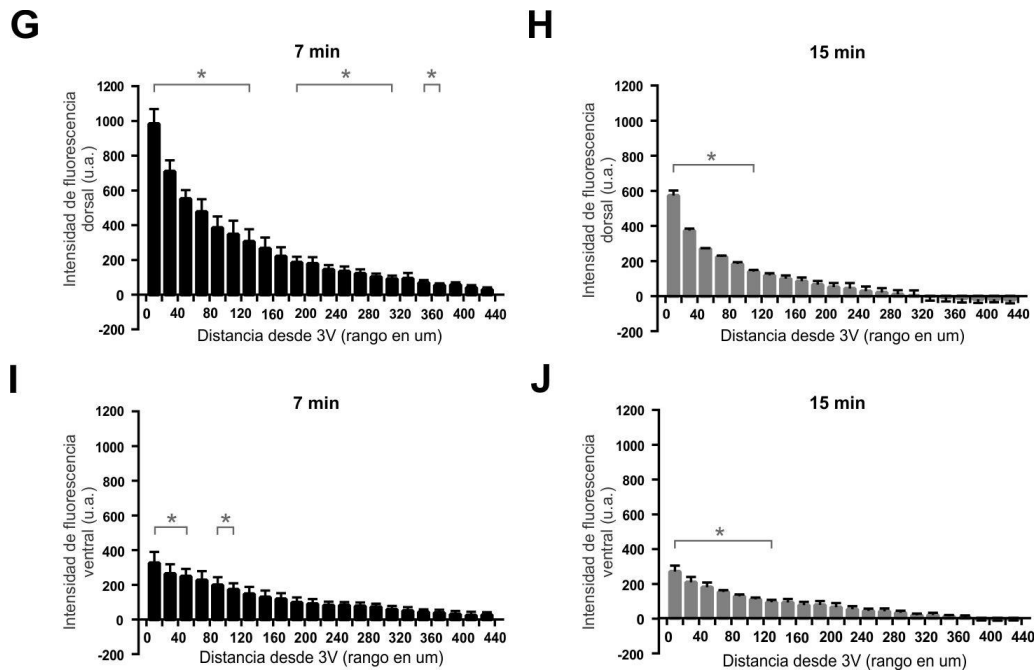


Figura 10. Cuantificación de la difusión de la ghrelina administrada de manera central al parénquima cerebral. El gráfico de barras representa la cuantificación de la señal fluorescente directa a un nivel dorsal (G, H) y a uno ventral (I, J) en ratones tratados con F-ghrelina por vía ICV y perfundidos a los 7 (G, I) o 15 (H, J) minutos post-inyección. Los datos representan la media \pm SEM y fueron analizados mediante un test t para muestra única. $* < 0.05$ vs valor 0.

En el caso de los cerebros de ratones inyectados con F-ghrelina por vía SC, observamos una señal IR contra fluoresceína de color negro/ violeta, cuantificada como densidad óptica, que se diferenció significativamente de los ratones inyectados con vehículo (**Figura 11**). En el nivel dorsal, no detectamos señal de F-ghrelina a los 7 minutos post-inyección, mientras que pudimos detectarla a los 15 y a los 30 minutos en la zona más cercana a la pared ventricular (aproximadamente entre los 0 y los 100 micrones en el eje x). En el nivel ventral, en cambio, la señal IR para fluoresceína fue significativamente mayor que para los ratones control en los tres tiempos medidos (**Figura 12**).

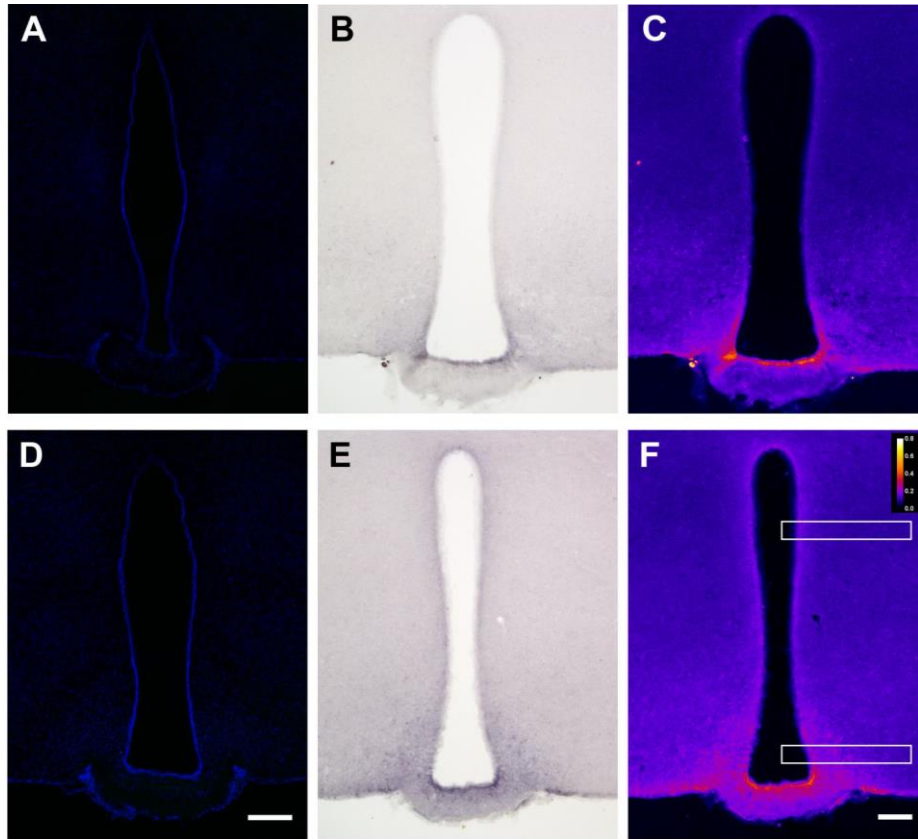


Figura 11. La F-ghrelin administrada de manera sistémica difunde al parénquima cerebral. Las microfotografías muestran el tejido hipotalámico periventricular de ratones inyectados por vía SC con vehículo (A-C) o F-ghrelin (D-F). A, D: Señal fluorescente directa; B, E: Señal IR cromogénica contra fluoresceína; C, F: Imágenes pseudocoloreadas. Barra de escala: 100 μm .

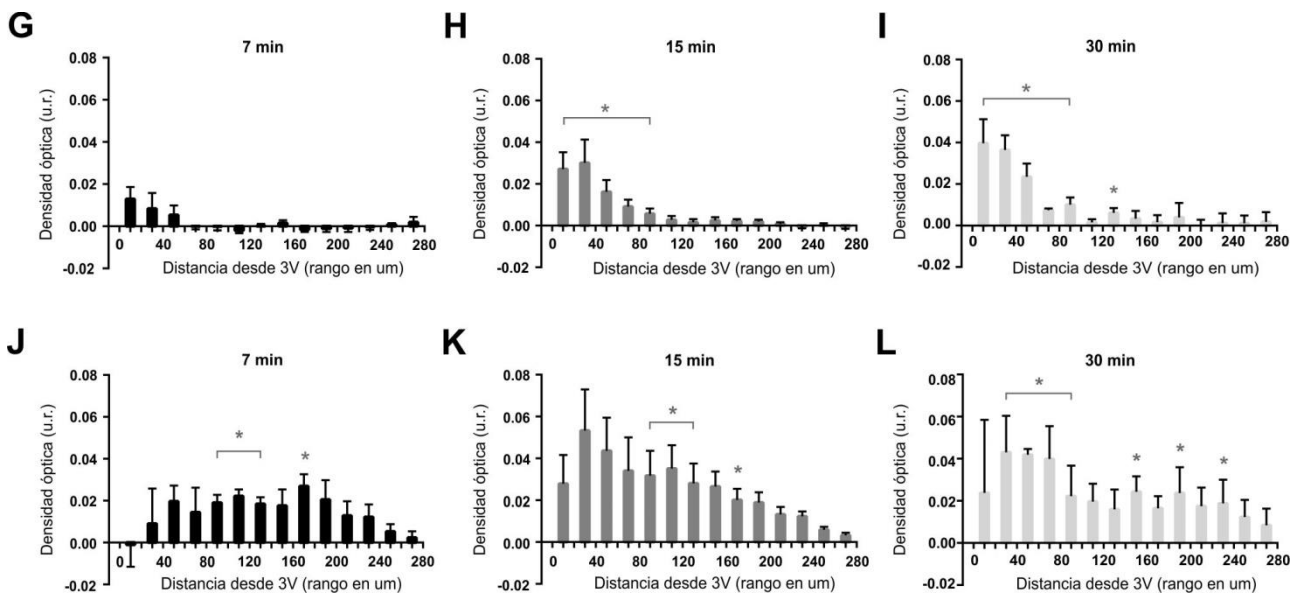


Figura 12. Cuantificación de la difusión de la ghrelina administrada de manera sistémica al parénquima cerebral. El gráfico de barras representa la cuantificación de la densidad óptica a un nivel dorsal (G, H, I) y a uno ventral (J, K, L) en ratones tratados con F-ghrelina por vía SC y perfundidos a los 7 (G, J), 15 (H, K) o 30 (I, L) minutos post-inyección. Los datos representan la media \pm SEM y fueron analizados mediante un test t punto a punto. * <0.05 vs grupo vehículo.

3. Estudio de la selectividad de la barrera sangre-LCR

Con el fin de determinar la selectividad de la barrera sangre-LCR utilizamos 1) ghrelina nativa, 2) fluoresceína sódica y 3) un análogo fluorescente de la ghrelina llamado ghrelina fluorescente verde desordenada o *scrambled* (scr-F-ghrelina), que contiene los mismos aminoácidos que la F-ghrelina, pero en otro orden, conjugados a una molécula de isotiocianato de fluoresceína en su extremo C-terminal. La scr-F-ghrelina no es capaz de unirse al GHSR. Inyectamos estas tres moléculas tanto por vía ICV como por vía SC a ratones WT, perfundimos a los animales 15 minutos después y realizamos una IHQ fluorescente contra ghrelina nativa o contra fluoresceína en cortes coronales de sus cerebros.

Cuando inyectamos ghrelina nativa, observamos señal IR para ghrelina con un patrón similar al observado con F-ghrelina tanto en las células epiteliales de los plexos coroideos como en los tanicitos hipotalámicos para ambas vías de administración. En los animales inyectados con vehículo observamos algo de señal basal, aunque en menor medida que en los animales inyectados con ghrelina, que atribuimos a la ghrelina endógena de los ratones. Cuando inyectamos fluoresceína sódica, en cambio, no observamos señal IR para fluoresceína para ninguna de las dos vías de administración. Por último, cuando inyectamos la scr-F-ghrelina, observamos una señal IR para fluoresceína similar a la observada con F-ghrelina en los animales inyectados con el análogo por vía ICV, mientras que en el caso de los animales inyectados con la scr-F-ghrelina por vía SC no observamos ninguna señal.

En conjunto, estos resultados nos indican que la F-ghrelina se comporta de manera similar a la ghrelina nativa, tanto cuando se la administra por vía central como por sistémica. Además, nos permiten afirmar que la molécula de fluoresceína por sí sola no es incorporada por las células de la barrera sangre-LCR y que su selectividad para la internalización de scr-F-ghrelina es diferente si se administra el análogo por vía ICV o SC. En particular, cuando se lo inyecta de manera central, las células de la barrera parecen no ser selectivas, mientras que cuando se lo administra sistémicamente se observa selectividad (**Figuras 13 y 14**).

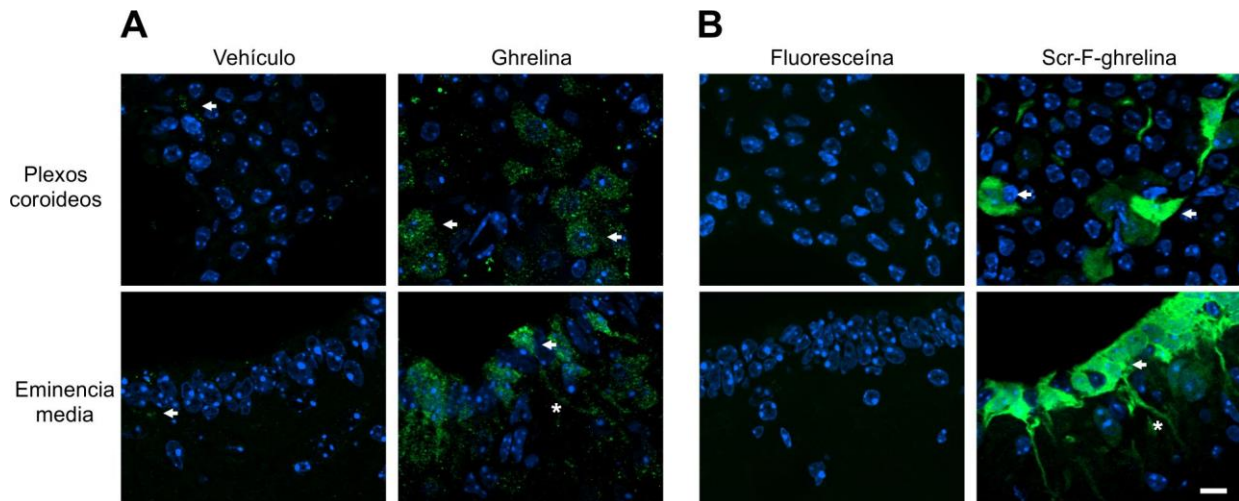


Figura 13. Selectividad de la barrera sangre-LCR en la internalización de F-ghrelina presente en el LCR. IHQ fluorescente para ghrelina (A) o fluoresceína (B), donde se muestra el patrón de señal IR en los plexos coroideos y en la eminencia media de ratones inyectados por vía ICV con vehículo, ghrelina, fluoresceína sódica o scr-F-ghrelina. Las flechas indican cuerpos celulares inmunomarcados y los asteriscos, procesos inmunomarcados. Barra de escala: 10 μ m.

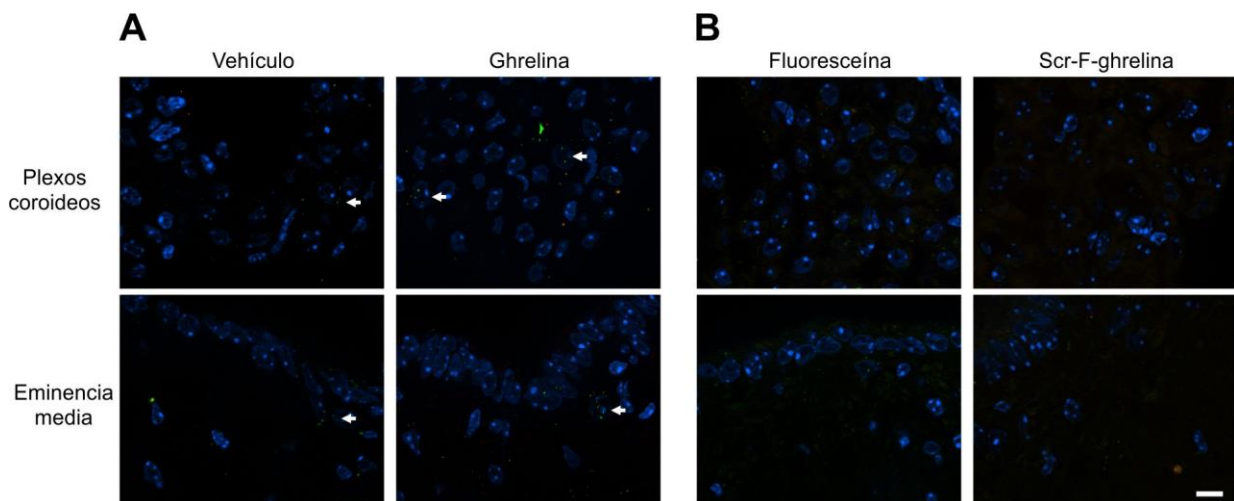


Figura 14. Selectividad de la barrera sangre-LCR en la internalización de F-ghrelina presente en el plasma. IHQ fluorescente para ghrelina (A) o fluoresceína (B), donde se muestra el patrón de señal IR en los plexos coroideos y en la eminencia media de ratones inyectados por vía SC con vehículo, ghrelina, fluoresceína sódica o scr-F-ghrelina. Las flechas indican señal IR positiva. Barra de escala: 10 μ m.

4. Estudio del acceso de la ghrelina circulante al LCR

Con el objetivo de determinar si la ghrelina en plasma es capaz de acceder al LCR, inyectamos ratones WT con vehículo o ghrelina por vía SC y, luego de 15 minutos, realizamos extracciones de LCR de la cisterna magna. A continuación, analizamos la presencia de ghrelina utilizando dos métodos: espectrometría de masas o un ensayo de ELISA. Por espectrometría de masas, no pudimos detectar ghrelina en ninguna de las dos condiciones experimentales, lo que sugiere que los niveles de ghrelina en

el LCR fueron menores que 60 fmol/ml (6.7 pg/ml), que es el límite de detección del equipo. De forma similar, los niveles de ghrelina en el LCR de los ratones inyectados con vehículo fueron indetectables utilizando ELISA, indicando que la concentración endógena del péptido en el LCR de ratones alimentados *ad libitum* es menor que 2 fmol/ml (6.7 pg/ml), que es el límite de detección de este método. Por el contrario, pudimos medir una concentración de 19.2 fmol/ml (63 pg/ml) en el LCR de ratones inyectados con ghrelina. Por lo tanto, la ghrelina en el LCR aumenta de manera paralela al aumento en plasma luego de una inyección sistémica.

5. Estudio del efecto de bloqueo de la entrada de la ghrelina circulante por la administración central de scr-F-ghrelina o de un anticuerpo anti-ghrelina

Con el fin de estudiar si el pasaje de ghrelina circulante a través de la barrera sangre-LCR se requiere para la acción orexigénica de la hormona, utilizamos dos estrategias. Dado que las células de la barrera sangre-LCR internalizan la scr-F-ghrelina cuando esta molécula se inyecta por vía ICV, planteamos la hipótesis de que la presencia de scr-F-ghrelina en dichas células podría afectar su capacidad para transportar ghrelina inyectada sistémicamente hacia el cerebro. En un segundo caso, examinamos si la inmuno-neutralización de ghrelina en el LCR influiría en el efecto de la ghrelina inyectada sistémicamente. Por lo tanto, evaluamos la ingesta de alimento en ratones que fueron primero inyectados de manera central con vehículo, scr-F-ghrelina o anticuerpos anti-ghrelina y luego inyectados de manera sistémica con vehículo o ghrelina, en una dosis de 60 pmol/g peso corporal. Es importante destacar que la scr-F-ghrelina inyectada centralmente se encontró exclusivamente en las células de la barrera sangre-LCR y que los anticuerpos anti-ghrelina no fueron captados por las células de la barrera ni por las células ependimarias y que no difundieron desde el LCR hacia el tejido hipotalámico.

En ausencia de tratamiento sistémico con ghrelina, el consumo de alimento fue similar en los ratones inyectados de manera central con vehículo, scr-F-ghrelina o anti-ghrelina (**Figura 15 A-B**). En los ratones inyectados de manera central con vehículo y tratados con ghrelina sistémica, el consumo de alimento aumentó en los 30 minutos iniciales post-inyección de ghrelina y también en el intervalo de 30 a 120 minutos posteriores. En los ratones inyectados de manera central con scr-F-ghrelina y tratados con ghrelina sistémica, el consumo de alimento también aumentó, respecto al tratamiento con vehículo sistémico, en los primeros 30 minutos post-inyección de ghrelina. Sin embargo, el consumo de alimento en este punto fue menor que en los ratones con inyección central de vehículo, y no se siguió incrementando en el intervalo posterior de 30 a 120 minutos. Finalmente, en los ratones inyectados de manera central con anti-ghrelina y tratados con ghrelina sistémica, el consumo de alimento aumentó de manera similar que en los ratones inyectados centralmente con vehículo a los 30 minutos, pero luego no aumentó en el intervalo entre 30 y 120 minutos.

Debido a que la ghrelina sistémica aumenta el consumo de alimento actuando principalmente en el ARC, cuantificamos las neuronas IR para el marcador de activación neuronal c-fos en esta región. En ausencia de tratamiento con ghrelina, los niveles de c-fos en el ARC fueron similares en los ratones inyectados de manera central con vehículo, scr-F-ghrelina o anti-ghrelina. En comparación con los ratones inyectados de forma sistémica con vehículo, los niveles de c-fos en el ARC de ratones inyectados centralmente con vehículo o con anti-ghrelina y tratados con ghrelina sistémica aumentaron de forma similar. Por el contrario, los niveles de c-fos en el ARC de ratones inyectados centralmente con scr-F-ghrelina y tratados con ghrelina sistémica fueron menores (**Figura 15 C-D**).

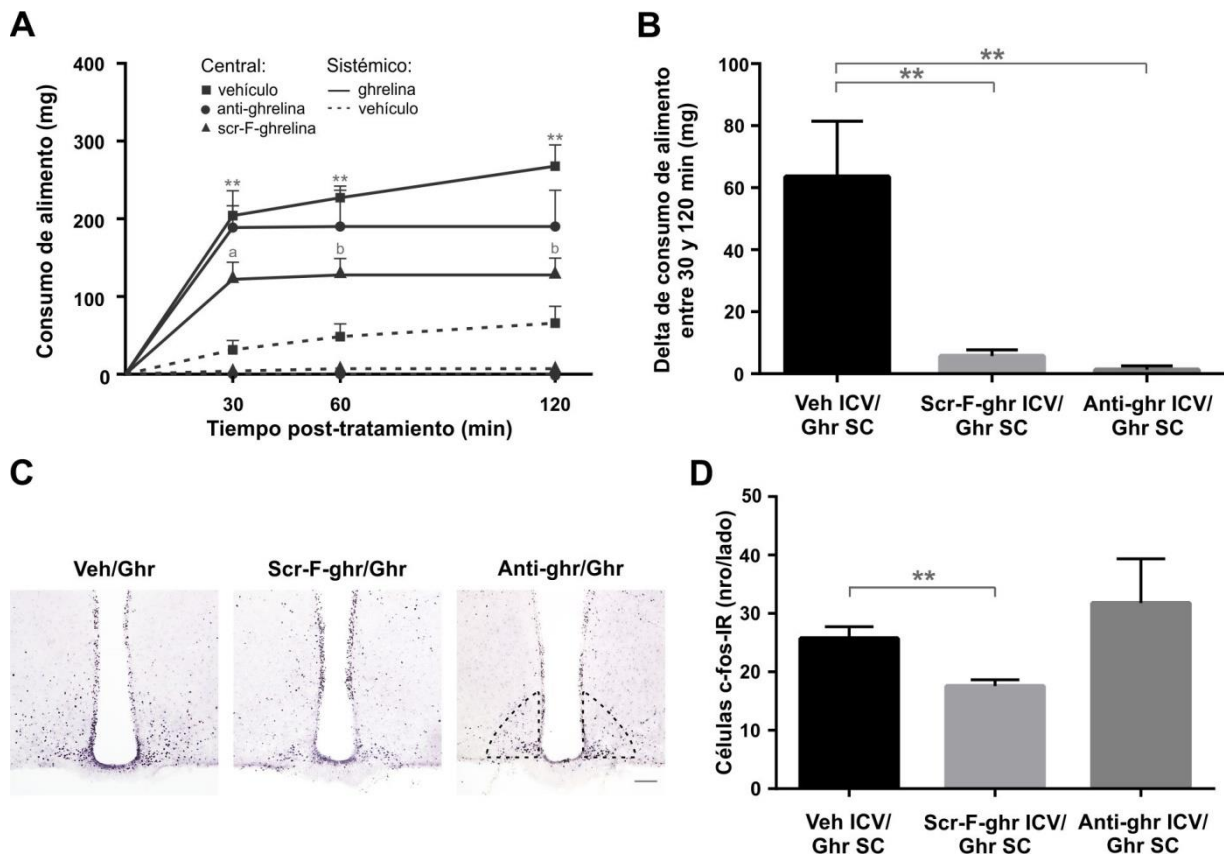


Figura 15. El efecto orexigénico de la ghrelina inyectada de manera sistémica es parcialmente bloqueado por la infusión central de scr-F-ghrelina o de anticuerpos anti-ghrelina. Los ratones fueron inyectados en primer lugar por vía ICV con vehículo, scr-F-ghrelina o anti-ghrelina y, 15 minutos después, fueron inyectados por vía SC con vehículo o ghrelina (60 pmol/g). **A:** Se muestra el consumo de alimento a los 30, 60 y 120 minutos post-tratamiento. **B:** Se muestra el consumo de alimento acumulado en el intervalo de 30 a 120 minutos. **C:** Se muestran imágenes representativas de la IHQ contra c-fos en el ARC (marcado con línea de puntos). Barra de escala: 100 μ m. **D:** El gráfico de barras muestra el análisis cuantitativo del número de neuronas IR para c-fos en el ARC ventromedial. Los datos representan la media \pm SEM y fueron analizados mediante ANOVA de dos vías con medidas repetidas (A) o ANOVA de una vía (B, D), seguido del post test de Bonferroni. **< 0.01 vs grupo vehículo/vehículo, a < 0.05 y b < 0.01 vs grupo vehículo/ghrelina.

DISCUSIÓN

En este capítulo utilizamos un análogo fluorescente de ghrelina, F-ghrelina, para visualizar las áreas del cerebro a las cuales puede acceder la hormona. El uso de la F-ghrelina nos permitió no sólo estimar la cantidad presente en el cerebro mediante cuantificación directa de la fluorescencia, sino también realizar ensayos de inmuno-fluorescencia dobles con el objetivo de caracterizar el tipo celular que puede internalizarla. Además, la inmuno-detección de la F-ghrelina utilizando anticuerpos anti-fluoresceína nos permitió amplificar específicamente la señal, aumentando así la sensibilidad de los ensayos independientemente de las interferencias que podría ocasionar la ghrelina endógena del animal.

En este estudio utilizamos inyecciones de ghrelina en un bolo único que causan aumentos transitorios supra fisiológicos en los niveles plasmáticos de la hormona. Predecimos que esta característica de nuestros experimentos, que se produce debido a la técnica utilizada, no afectará el mecanismo por el cual la ghrelina ingresa al cerebro en general, sino que quizás podría afectar a los aspectos cinéticos de la accesibilidad. Con los resultados de esta primera parte, mostramos evidencias de que tanto la ghrelina plasmática como la que se encuentra en el LCR interactúan con las células que conforman la barrera sangre-LCR. En particular, encontramos que la ghrelina, la F-ghrelina y la scr-F-ghrelina inyectadas de manera central son internalizadas en las células epiteliales de los plexos coroideos y en los tanicitos β . El hecho de que la scr-F-ghrelina se haya comportado de la misma forma que los otros dos péptidos nos indica que las células de la barrera sangre-LCR pueden internalizar moléculas presentes en el LCR de forma independiente de la secuencia aminoacídica que contengan y de las modificaciones por grupos fluorescentes, lo cual da una idea de falta de selectividad. Además, resultados previos de nuestro laboratorio indicaron que la ghrelina fluorescente desacilada también fue internalizada por las células de los plexos coroideos y por los tanicitos β cuando se la inyectó de manera central⁶, por lo que el grupo octanoílo tampoco sería esencial para la internalización de la ghrelina en las células de la barrera sangre-LCR desde el LCR. Por el contrario, encontramos que la ghrelina y la F-ghrelina administradas de forma sistémica son internalizadas por las células de la barrera sangre-LCR, mientras que la scr-F-ghrelina no lo es. Así, la integridad estructural y la secuencia primaria de la región N-terminal de la ghrelina parecen ser clave para la internalización en las células de la barrera. Además, encontramos un patrón de señal fluorescente que es marcadamente diferente cuando la ghrelina o la F-ghrelina se administra por vía ICV, respecto de la vía SC. Cuando la hormona es inyectada de manera central, las células de la barrera sangre-LCR que la internalizan muestran una señal fluorescente homogénea y distribuida en todo el citoplasma de la célula, mientras que cuando se la inyecta de manera sistémica, el perfil observado en las células es de tipo punteado, compatible con un perfil vesicular. Esto podría deberse a que las concentraciones alcanzadas por la hormona en el cerebro es mucho mayor en el caso de las inyecciones por vía ICV que

por vía SC. La fluoresceína libre no se internalizó en las células de la barrera desde el LCR ni tampoco desde la sangre. Estos resultados nos permiten hipotetizar que las células de la barrera sangre-LCR “depurarían” el LCR, es decir, transportarían sustancias desde el LCR a la sangre de forma poco selectiva. En apoyo de esta hipótesis se ha descrito anteriormente la capacidad de los tanicitos β para transportar moléculas de forma inespecífica desde el LCR hacia los capilares de la EM, como por ejemplo WGA¹⁴⁰.

El análisis de la señal de F-ghrelina en el parénquima hipotalámico de ratones inyectados de manera central con F-ghrelina confirmó que la interfase LCR-parénquima cerebral tiene características diferentes en los niveles dorsales y ventrales del tercer ventrículo. En la región dorsal del tejido periventricular, la señal fluorescente de F-ghrelina fue mayor a los 7 minutos post-inyección, comparado con la señal a los 15 minutos post-inyección y muestra un decaimiento exponencial lateral a ambos tiempos. Estas observaciones indican un perfil difusivo, sugiriendo que la ghrelina en la región dorsal del tercer ventrículo accede desde el LCR al parénquima cerebral por difusión simple. Estos resultados concuerdan con el hecho bien establecido de que dicha región de la pared ventricular está recubierta por células endoteliales, las cuales carecen de uniones estrechas entre ellas por lo que permiten el pasaje por difusión simple de una variedad de moléculas, incluyendo polipéptidos y moléculas como la HRP de ~ 44 kDa⁸² que pueden ingresar al parénquima de manera paracelular. El análisis cuantitativo de la señal fluorescente de F-ghrelina mostró que la mayor parte de la misma penetra a los primeros 400 μm de tejido desde la pared del ventrículo y que sólo pequeñas cantidades del péptido son capaces de acceder a núcleos más profundos y alejados del ventrículo, como se evidencia por la presencia de señal fluorescente en células distantes. Así, la F-ghrelina inyectada de manera central podría alcanzar células que expresan el GHSR, incluyendo aquellas alejadas de los ventrículos y de los CVOs, aunque ingresaría preferentemente y en mayores concentraciones a la zona periventricular. De todas formas, no podemos descartar que los niveles transitoriamente altos de F-ghrelina alcanzados en el LCR en comparación de los que se encuentran en condiciones basales, hayan saturado los mecanismos normales de transporte de ghrelina y que los resultados observados no ocurran de la misma forma en condiciones fisiológicas. Por otro lado, en el análisis de la difusión periventricular en la región ventral del tercer ventrículo detectamos niveles menores de fluorescencia tanto a 7 minutos como a 15 minutos, en comparación con el nivel dorsal. Estos resultados muestran que la difusión de ghrelina al parénquima que se observa en la región dorsal se encuentra restringida en la zona ventral debido a las uniones estrechas presentes entre los tanicitos β . Así, el perfil observado no es un perfil compatible con el de una difusión simple, lo cual es esperable debido a las barreras existentes en esta región que previenen el libre acceso de las moléculas desde el LCR al ARC.

El análisis de la señal de F-ghrelina en el parénquima hipotalámico de ratones inyectados de manera sistémica sugiere que la ghrelina accede de manera diferencial a la región periventricular dorsal

respecto de la ventral. En estos estudios, encontramos que la F-ghrelina es detectada en la zona periventricular ventral, incluido el ARC, a los 7 minutos, 15 minutos y 30 minutos post-inyección. Es importante destacar que esta señal no fue detectada cerca de la pared ventricular y, por lo tanto, no sugiere un mecanismo de difusión desde el LCR. Estudios previos han mostrado que la ghrelina fluorescente inyectada de manera sistémica extravasa desde los capilares fenestrados de la EM hacia la región ventromedial del ARC^{33,37,81}. Nuestros resultados indican, de igual manera, que la ghrelina puede alcanzar el ARC desde la sangre a los tiempos medidos. En la región dorsal del tercer ventrículo, en cambio, la F-ghrelina no se detectó a los 7 minutos post-inyección, pero sí se observó a los 15 minutos y 30 minutos post-inyección. Para estos dos últimos tiempos, la F-ghrelina se detectó en la zona adyacente a la pared ventricular. El nivel de señal de F-ghrelina, desde la pared del ventrículo fue decayendo progresivamente hacia el interior del tejido, al igual que el patrón observado con las inyecciones centrales, sugiriendo un patrón difusivo desde el LCR. En línea con este resultado, los niveles de ghrelina aumentaron en el LCR 15 minutos post-inyección de ghrelina sistémica. Así, nuestros datos sugieren que una parte de la ghrelina circulante accede rápidamente al ARC a través de los capilares fenestrados que se extienden desde la EM y otra parte accede, más lentamente, al LCR desde el cual difunde hacia el parénquima cerebral de la región dorsal del tercer ventrículo. También se observó la llegada de la hormona al ARC desde el LCR, pero más lentamente, por lo que la ghrelina circulante estaría accediendo a este núcleo de dos formas diferentes: a través de los capilares fenestrados de manera rápida (7-30 min) y desde el LCR, posiblemente mediante transporte a través de los tanicitos β , de manera más lenta (>30 min).

Por último, evaluamos si el pasaje de ghrelina a través de la barrera sangre-LCR es requerido para que la ghrelina ejerza sus efectos orexigénicos. Las inyecciones sistémicas de ghrelina inducen un gran aumento del consumo de alimento en los ratones en los primeros 30 minutos post-administración, y luego un aumento menor entre los 30 minutos y los 120 minutos post-administración. La cantidad de alimento ingerida en este intervalo de 30 a 120 minutos representa aproximadamente un 20% del total de alimento consumido en las dos horas¹⁵². En base a nuestros resultados mostrando que la scr-F-ghrelina inyectada de manera central es incorporada únicamente en las células de la barrera sangre-LCR, hipotetizamos que este péptido inyectado por vía ICV podría disminuir la capacidad de transporte de la F-ghrelina por estas células. Efectivamente, encontramos que las inyecciones centrales de scr-F-ghrelina disminuyen el efecto orexigénico de la ghrelina inyectada de forma sistémica tanto a los 30 minutos post-inyección como en el intervalo 30-120 minutos. Un estudio previo utilizó con éxito anticuerpos anti-leptina inyectados en el LCR para bloquear los efectos de la leptina circulante demostrando que el pasaje de leptina al LCR es necesario para las acciones de la hormona en el hipotálamo⁹³. De manera análoga, en este trabajo evaluamos si inyecciones centrales de anticuerpos anti-ghrelina disminuían el efecto de la

ghrelina inyectada de forma sistémica. Los resultados indicaron que la inmuno-neutralización central de la ghrelina disminuyó parcialmente su efecto orexigénico, ya que no se observaron modificaciones en la cantidad de alimento consumido por los ratones a los 30 minutos post-administración de ghrelina, pero sí se observó una disminución del consumo en el intervalo 30-120 minutos. Además, en ambos experimentos evaluamos en el ARC los niveles del marcador de activación neuronal c-fos, indicativo de un aumento de la actividad transcripcional en dicho núcleo. En este sentido encontramos que la inducción de c-fos por ghrelina disminuyó en los ratones pre-tratados con scr-F-ghrelina, y no lo hizo en los ratones pre-tratados con el anti-ghrelina, lo cual puede ser un indicativo de que c-fos es un buen indicador de aumento de la actividad neuronal dada por los efectos tempranos de ghrelina, pero no por los que ocurren a tiempos más extensos. En relación a esto, se conoce que el pico de ARNm de c-fos se produce a los 30 minutos de un estímulo agudo, mientras que la proteína se detecta a los 90-120 minutos¹⁵³. Estos resultados nos permiten hipotetizar que los efectos orexigénicos iniciales (primeros ~30 minutos post-administración) de ghrelina circulante se encuentran principalmente mediados por el ARC, adonde la ghrelina accede rápidamente, mientras que efectos más tardíos y dependientes de otros núcleos cerebrales alejados de los CVOs dependen del pasaje de la hormona a través del LCR. Los resultados previos de nuestro laboratorio que muestran que ratones con el ARC ablacionado no aumentan el consumo de alimento en respuesta a la ghrelina sistémica³⁷ podrían explicarse, en parte, debido a que otras regiones del ARC como su región dorsomedial no poseen capilares fenestrados pero se encuentran cerca de la pared ventricular y podrían estar mediando también los efectos orexigénicos. La ghrelina podría estar accediendo a la región dorsomedial del ARC únicamente desde el LCR y sería necesaria la activación del núcleo en su totalidad para ver la respuesta orexigénica completa de la ghrelina, incluyendo el período entre 30 y 120 minutos.

Los niveles de ghrelina en LCR son mucho menores que los niveles plasmáticos en ratones alimentados *ad libitum*. Se han reportado niveles de ghrelina en LCR y plasma de ~4 y ~200 pg/ml, respectivamente, en vacas¹⁵⁴ y de ~24 y ~30.000 pg/ml, respectivamente, en ovejas⁹⁸. En individuos sanos, los niveles totales de ghrelina en LCR y en plasma fueron reportados como ~400 y ~2800 pg/ml, respectivamente, o ~4 y ~260 pg/ml, respectivamente, en dos estudios diferentes^{155,156}. Dicha diferencia en la concentración de ghrelina a un lado y al otro de la barrera indica que la accesibilidad de la ghrelina plasmática al LCR está restringida, que no ocurre por un mecanismo de difusión simple y que es limitada. Un estudio realizado en ovejas mostró que los aumentos de ghrelina en plasma, ya sean endógenos o producidos por inyecciones de la hormona, son seguidos por aumentos de ghrelina en el LCR, apoyando la idea de que la hormona es transportada en dirección sangre-LCR⁹⁸. Estudiar el transporte de ghrelina a través de la barrera sangre-LCR en ratones es complicado debido a su pequeño tamaño y al pequeño volumen de LCR que poseen. En nuestro conocimiento, nuestro trabajo fue el primero en reportar niveles

de ghrelina en LCR de ratón¹⁵⁷. Aquí, encontramos que los niveles de ghrelina en el LCR de ratones alimentados *ad libitum* en condiciones basales son menores a 6,7 pg/ml, mientras que los niveles plasmáticos de la hormona son de ~250 pg/ml. Las medidas en LCR se realizaron con dos técnicas altamente sensibles como son la espectrometría de masas y el ensayo de ELISA, sin embargo, con ninguno de los dos pudimos detectar los niveles basales de la hormona. Actualmente desconocemos si la concentración de ghrelina en el LCR está por debajo del límite de detección de estos ensayos o si la ghrelina no está presente en el LCR en condiciones basales. Por otro lado, los niveles de ghrelina en LCR se volvieron detectables en ratones, luego de una inyección sistémica de la hormona, sugiriendo nuevamente que la ghrelina plasmática puede acceder al LCR.

Los resultados de este capítulo nos permiten hipotetizar que la ghrelina plasmática puede ser internalizada por las células de la barrera sangre-LCR, de manera específica y dependiente de la secuencia aminoacídica de, al menos, los primeros 18 aminoácidos de la hormona, y de ser transportada al LCR, desde el cual puede acceder al parénquima cerebral donde ejerce sus acciones. Es interesante la posibilidad de que la ghrelina presente en el LCR pueda acceder a núcleos alejados de los CVOs, donde haya neuronas que expresan el GHSR, y que no pueden acceder a la ghrelina plasmática en condiciones normales. Así, la ghrelina plasmática ejerce sus efectos rápidos principalmente a nivel del ARC, que posee una accesibilidad privilegiada debido a su ubicación cerca de la EM y los capilares fenestrados, mientras que la ghrelina transportada hacia el LCR, condición que se daría en situaciones de déficit energéticos mayores, podría reclutar otros núcleos cerebrales que medien efectos más lentos o a largo plazo.

**CAPÍTULO 2: DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE UN CULTIVO
PRIMARIO DE TANICITOS DE RATA PARA ESTUDIOS *IN VITRO***

RESULTADOS

Con el objetivo de caracterizar y estudiar con mayor detalle los tanicitos β hipotalámicos que forman parte de la barrera sangre-LCR desarrollamos un modelo *in vitro* en el cual realizamos cultivos primarios de estas células. Estos cultivos los comenzaron a poner a punto el Dr. Nicolás De Francesco y el Qco. Daniel Castrogiovanni en el año 2013 y en estos experimentos piloto se determinaron las condiciones idóneas para realizar los cultivos. Por ejemplo, los cultivos primarios de tanicitos los realizamos a partir de disecciones de la EM de ratas de 10 días, ya que en esta etapa post-natal los tanicitos se encuentran completamente desarrollados, son más fáciles de cultivar que los tanicitos de ratón y mantienen una morfología parecida a la observada *in vivo*. Este abordaje experimental nos permitió realizar algunos experimentos que no son posibles *in vivo*.

1. Rendimiento del cultivo primario de tanicitos

El rendimiento promedio del cultivo fue de 60.000 a 90.000 células por porción de EM/ARC colectada. Con el objetivo de evaluar la viabilidad celular, utilizamos una tinción con el colorante azul de tripán y observamos que la gran mayoría de las células estaban vivas antes de la siembra. Para realizar los cultivos, sembramos $\sim 150\text{-}200$ células/ mm^2 , es decir $\sim 75.000\text{-}90.000$ células/vidrio de 22x22 mm. Unos minutos luego de la siembra, la mayoría de las células mostraron una morfología esférica, mientras que algunas de ellas mostraron también una corta prolongación. 24 horas después de la siembra, observamos la presencia de células con morfología de tanicito y otras sin esta morfología, rodeadas de gran cantidad de células de variada forma, vivas y muertas, y con presencia de agregados de detrito celular. Al día 3 de cultivo, removimos la mitad del medio de cultivo y lo reemplazamos por medio fresco suplementado con trombina, la cual favorece el crecimiento de las células del linaje de los tanicitos¹⁵⁸. Entre el día 4 y el día 5 de cultivo, observamos un aumento en el número de células con morfología de tanicito y una disminución del número de células muertas y del detrito celular, que se mantuvo hasta el día 7 de cultivo, el cual concluimos que es el ideal para el procesamiento y caracterización del cultivo, ya que a partir del día 8 de cultivo la viabilidad celular comienza a disminuir.

2. Caracterización de las células compatibles con tanicitos

2.1. Caracterización morfológica

Con el objetivo de caracterizar las células que tenían una morfología compatible con tanicitos, observamos el cultivo con un microscopio de campo claro con contraste de fase al día 7 de cultivo. Pudimos observar células con la misma morfología que presentan los tanicitos *in vivo*, representando entre un 20% y un 30% del total de las células del cultivo (**Figura 16A**). Las células que no son tanicitos

constituyen un grupo heterogéneo de células, incluyendo células gliales, células planas y poligonales de tipo epitelial, células redondeadas de tipo epitelial, fibroblastos y células compatibles con macrófagos. Es importante destacar que no observamos en nuestros cultivos la presencia de células ciliadas por observación microscópica con objetivos de alta magnificación. Además, realizamos IHQs fluorescentes contra NeuN, un marcador de neuronas maduras y contra Iba-I, un marcador de microglía, no encontrando células positivas para ninguno de los dos marcadores, lo cual nos permitió descartar la presencia de neuronas y de células de la microglía en nuestros cultivos. Las células compatibles con tanicitos representan una población homogénea de células que contienen un cuerpo celular no ciliado y una larga prolongación citoplasmática. El cuerpo celular es ligeramente elongado (el largo promedio es de $41.5 \pm 1.8 \mu\text{m}$ y el ancho promedio de $19.5 \pm 0.9 \mu\text{m}$) y el núcleo es excéntrico. La prolongación de estas células varía en longitud y ancho y presenta una porción terminal o *endfeet*, una característica típica de este tipo celular. La longitud de las células es variable y presenta una distribución asimétrica, con un grupo de células cuya prolongación tiene un largo medio de $124 \mu\text{m}$ (percentil 25%: $93 \mu\text{m}$; percentil 75%: $190 \mu\text{m}$) y un grupo pequeño de células cuya prolongación tiene un largo medio que supera los $500 \mu\text{m}$. El análisis microscópico con contraste de fases reveló que estas células contienen gran cantidad de estructuras intracelulares altamente refractarias, compatibles con vesículas, tanto en el cuerpo celular como en la prolongación, siendo en éstas últimas de menor tamaño (**Figura 16B**). En el interior del cuerpo celular, estas estructuras están localizadas principalmente en la zona apical y en la zona cercana a la formación de la prolongación. Con el objetivo de analizar la naturaleza de estas vesículas, en primer lugar utilizamos una tinción con naranja de acridina para determinar si eran ácidas, como los lisosomas o los endosomas tardíos. Pudimos observar las vesículas teñidas de color naranja fluorescente principalmente alrededor del núcleo y también algunas en la prolongación y en la zona terminal (**Figura 16C**). Sin embargo, ninguna de las estructuras refractarias observadas con el contraste de fase se teñió con naranja de acridina. En segundo lugar, debido a que previamente se habían descrito *lipid droplets* en los tanicitos^{89,140,159}, realizamos una tinción con oil red O, un colorante hidrofóbico soluble en medios lipídicos (**Figura 16D**). Las vesículas teñidas con este colorante coincidieron con aquellas vesículas refractarias observadas con contraste de fases, indicando la naturaleza lipídica de las mismas. Además, realizamos análisis a través de la técnica de microscopía electrónica, la cual nos permitió observar que las células compatibles con tanicitos presentan protrusiones y pequeños procesos en el cuerpo celular adheridos a la superficie del vidrio de cultivo, mientras que las prolongaciones contienen menos y más pequeñas estructuras de adhesión (**Figura 16E**).

Como conclusión, las condiciones experimentales empleadas nos permitieron obtener cultivos con células compatibles con tanicitos, que conservan algunas de las características de dichas células observadas *in vivo*.

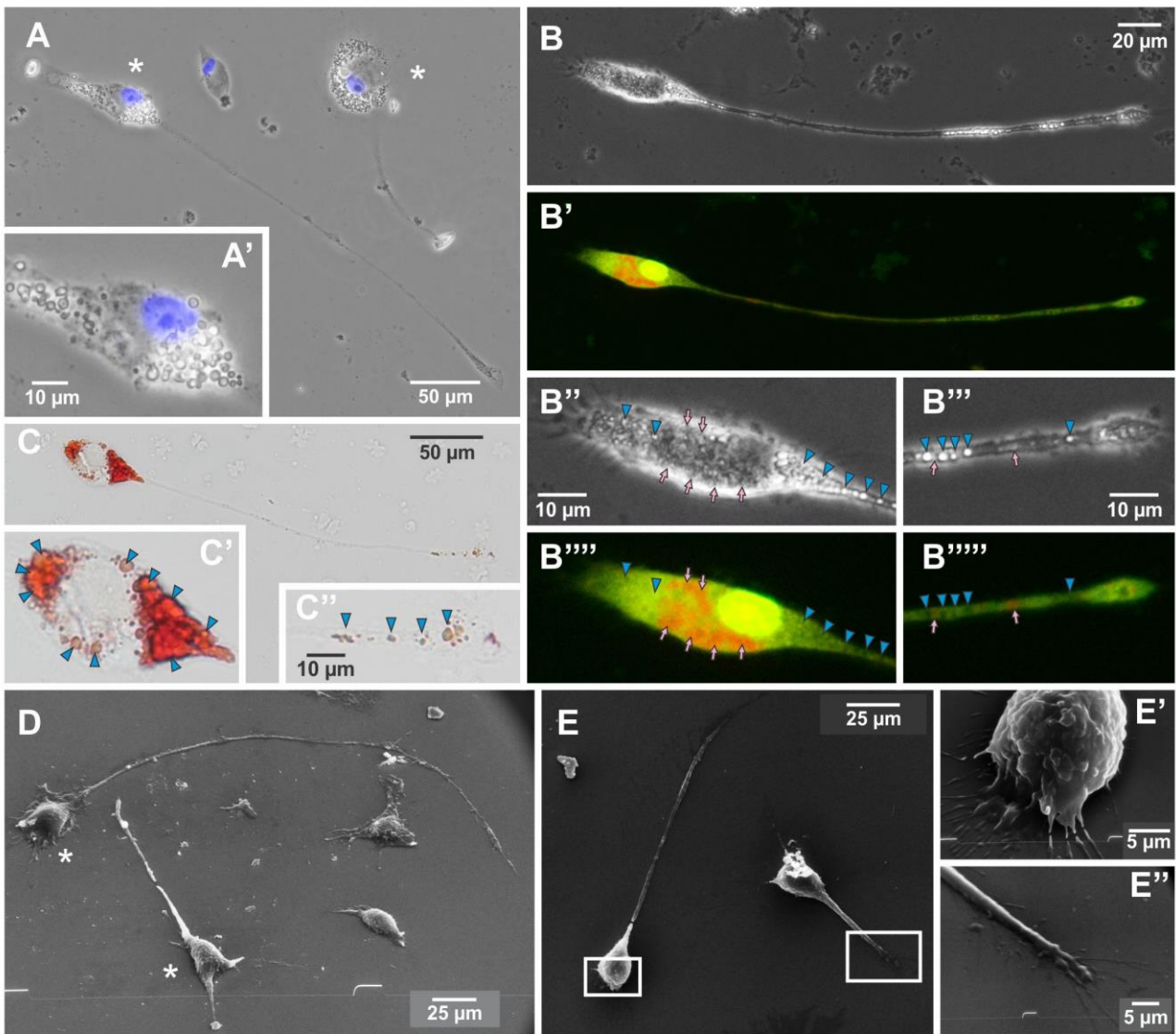


Figura 16. Caracterización morfológica y ultraestructural de células compatibles con tanicitos. **A.** Microfotografía en contraste de fase, representativa de las células en cultivo al día 7. La imagen en escala de grises se encuentra superpuesta con una tinción nuclear para Hoechst (azul). Los asteriscos indican células con morfología de tanicito, mientras que las demás células presentes en la imagen no son consideradas tanicitos. Una imagen a alta magnificación del cuerpo celular de una de las células con morfología de tanicito se muestra en **A'**, en la cual se evidencia la presencia de vesículas intracelulares refractarias. **B, B'**. Microfotografías de contraste de fase y de fluorescencia, respectivamente, representativas de una célula con morfología de tanicito sometida a una tinción con naranja de acridina. Se muestran también imágenes a alta magnificación del cuerpo celular (**B''**, **B''''**) y de la zona terminal del tanicito (**B'''**, **B''''**). Las cabezas de flecha en color cian apuntan a estructuras altamente refractarias, compatibles con vesículas, mientras que las flechas color magenta indican estructuras ácidas teñidas con naranja de acridina. **C.** Microfotografía representativa de una célula con morfología de tanicito sometida a una tinción con Oil Red O. **C'** y **C''** muestran imágenes a alta magnificación del cuerpo celular y la zona terminal, respectivamente, de la célula. Las cabezas de flecha en color cian apuntan a estructuras compatibles con vesículas teñidas con Oil Red O. **D.** Microfotografía representativa a baja magnificación obtenida con microscopía electrónica de células presentes en el cultivo al día 7. Las células con morfología de tanicito se indican con un asterisco y presentan pequeñas estructuras

ramificadas que se extienden a lo largo del cuerpo celular. **E.** Microfotografía obtenida con microscopía electrónica mostrando dos células con morfología de tanicito: una larga y otra de largo intermedio, con imágenes a alta magnificación del cuerpo celular (**E'**) y de la zona terminal (**E''**). Tanto en **E'** como en **E''** se observan pequeñas protuberancias y prolongaciones cortas de adhesión.

2.2. Caracterización inmuno-citoquímica

Con el objetivo de estudiar la presencia de marcadores específicos de los tanicitos, realizamos estudios de ICQ fluorescente en nuestros cultivos (**Figura 17**). En primer lugar, analizamos la inmunoreactividad contra vimentina, y encontramos que todas las células compatibles con tanicitos fueron positivas para vimentina, así como también lo fueron otros de los tipos celulares presentes en el cultivo. Este resultado puede deberse a que los astrocitos en cultivos primarios pueden ser inducidos a expresar vimentina debido a las condiciones experimentales¹⁶⁰. En segundo lugar, encontramos que todas las células compatibles con tanicitos fueron IR contra la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), aunque la intensidad de la señal en estas células fue menor que la observada para células sin morfología de tanicito. Las células compatibles con tanicitos mostraron colocalización de las señales IR para vimentina y para GFAP, como esperábamos debido a que ambas proteínas forman parte de filamentos intermedios y tienen la misma localización celular¹⁶¹ (**Figura 17 A-C**). En tercer lugar, encontramos que aproximadamente el 90% de las células compatibles con tanicitos fueron IR para DARPP-32, mientras que el resto de las células no lo fueron (**Figura 17D**).

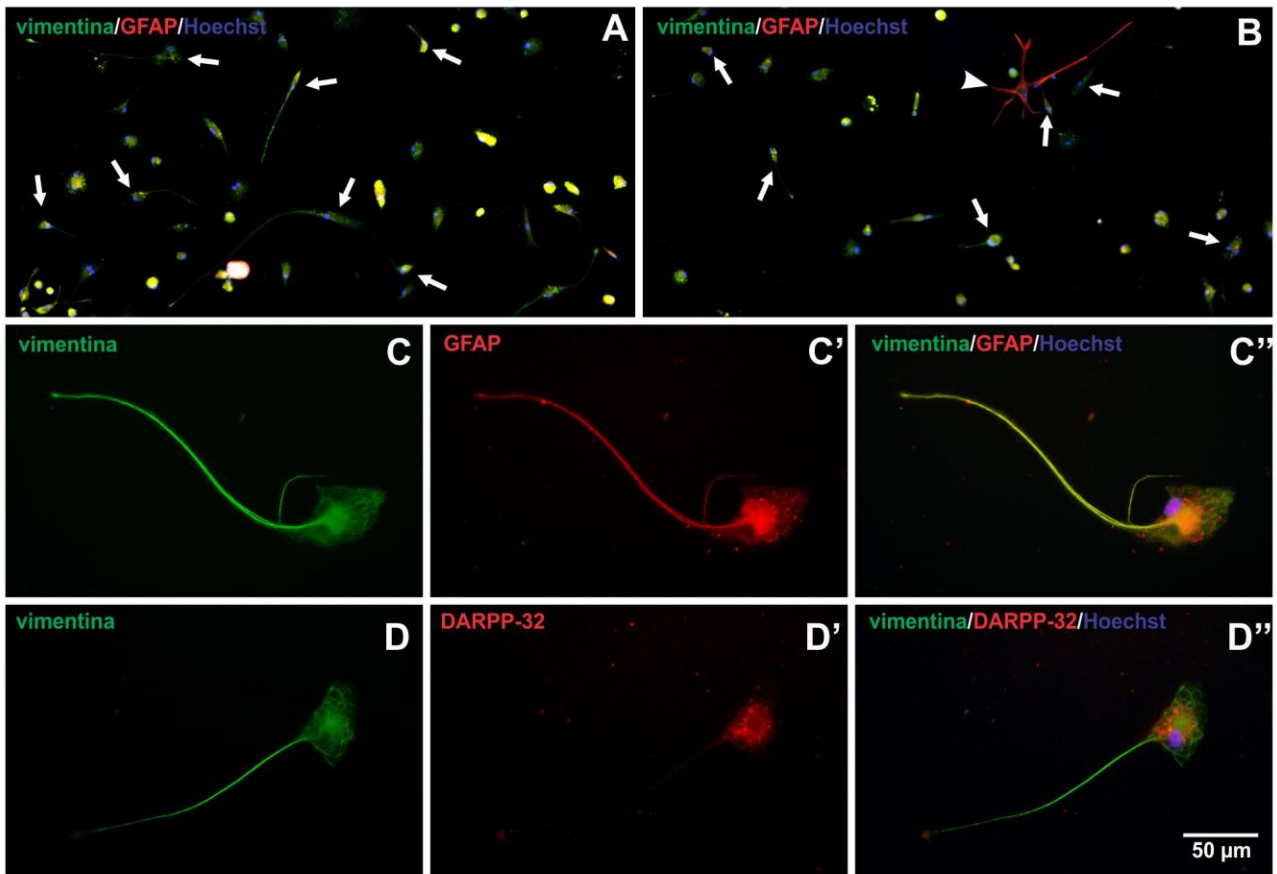


Figura 17. Caracterización ICQ de células con morfología de tanicito. A, B. Microfotografías a baja magnificación del cultivo al día 7 al que se le realizó una ICQ doble para vimentina y GFAP. Pueden observarse varias células compatibles con tanicitos marcadas con flechas. Un grupo de células diferentes a tanicitos fuertemente IR para GFAP se señala con una cabeza de flecha en B. C-C''. Microfotografías representativas a alta magnificación de una célula compatible con tanicito típica a la que se le realizó una ICQ doble contra vimentina y GFAP. D-D''. Microfotografías representativas a alta magnificación de una célula compatible con tanicito típica a la que se le realizó una ICQ doble contra vimentina y DARPP-32. En C'' y D'' se muestran imágenes de la colocalización de ambos marcadores, junto con una tinción nuclear para Hoechst.

2.3. Caracterización electrofisiológica

Por otro lado, en colaboración con el Laboratorio de Electrofisiología del IMBICE, realizamos estudios de patch-clamp de célula entera para caracterizar los aspectos electrofisiológicos de las células compatibles con tanicitos de nuestro cultivo. Los registros indicaron que estas células poseen un potencial de reposo promedio de -49.9 ± 4.7 mV ($n = 13$, **Figura 18 A-B**). Las células no mostraron fluctuaciones espontáneas en su potencial de membrana ni cambios de voltaje en respuesta a inyecciones de corriente en un rango entre -100 a $+100$ pA (**Figura 18C**). En conclusión, las células compatibles con tanicitos poseen las características electrofisiológicas esperadas para este tipo celular.

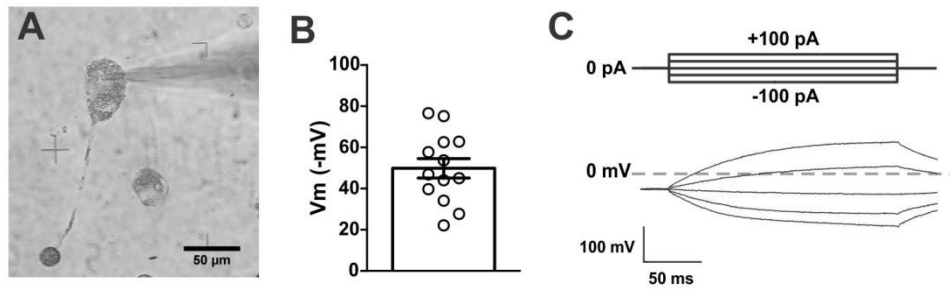


Figura 18. Caracterización electrofisiológica de células con morfología de tanicito. **A.** Microfotografía representativa de una célula con morfología típica de tanicito durante el registro electrofisiológico. **B.** Gráfico de distribución de los valores del potencial de membrana observados en los tanicitos en cultivo. **C.** Trazos representativos de voltaje en respuesta a inyecciones de corriente realizadas en estas células. Los registros fueron realizados en configuración de célula entera fijando la corriente y aplicando inyecciones de corriente desde -100 hasta +100 pA en pulsos cuadrados de 200 ms.

3. Caracterización de la actividad endocítica de las células con morfología de tanicitos

Debido a que se ha descrito que los tanicitos hipotalámicos son capaces de realizar procesos de endocitosis *in vivo*¹⁴⁰, estudiamos la capacidad endocítica *in vitro* de estas células en nuestros cultivos. En primer lugar, incubamos las células durante 15 minutos a 37°C con fluoroesferas rojas y detectamos una señal fluorescente roja que mostraba un patrón punteado dentro del cuerpo celular de algunos tipos de células presentes en el cultivo y, entre ellas, de las células compatibles con tanicitos (**Figura 19 D-F**). Esta señal intracelular punteada no se observó cuando realizamos la misma incubación a 4°C (**Figura 19 A-C**), una temperatura a la cual se sabe que los procesos endocíticos de transporte vesicular se encuentran enlentecidos. Con el objetivo de estudiar si las moléculas internalizadas se encontraban en un compartimento vesicular endocítico, realizamos una ICQ fluorescente contra Rab5A, un marcador de vesículas endocíticas tempranas, en células previamente incubadas con las fluoroesferas a 37°C. Los resultados mostraron una porción significativa de colocalización entre la señal punteada roja de las fluoroesferas y la señal verde IR para Rab5A (**Figura 19 G-J**). En conclusión, las células compatibles con tanicitos son capaces de realizar procesos de endocitosis bajo nuestras condiciones experimentales.

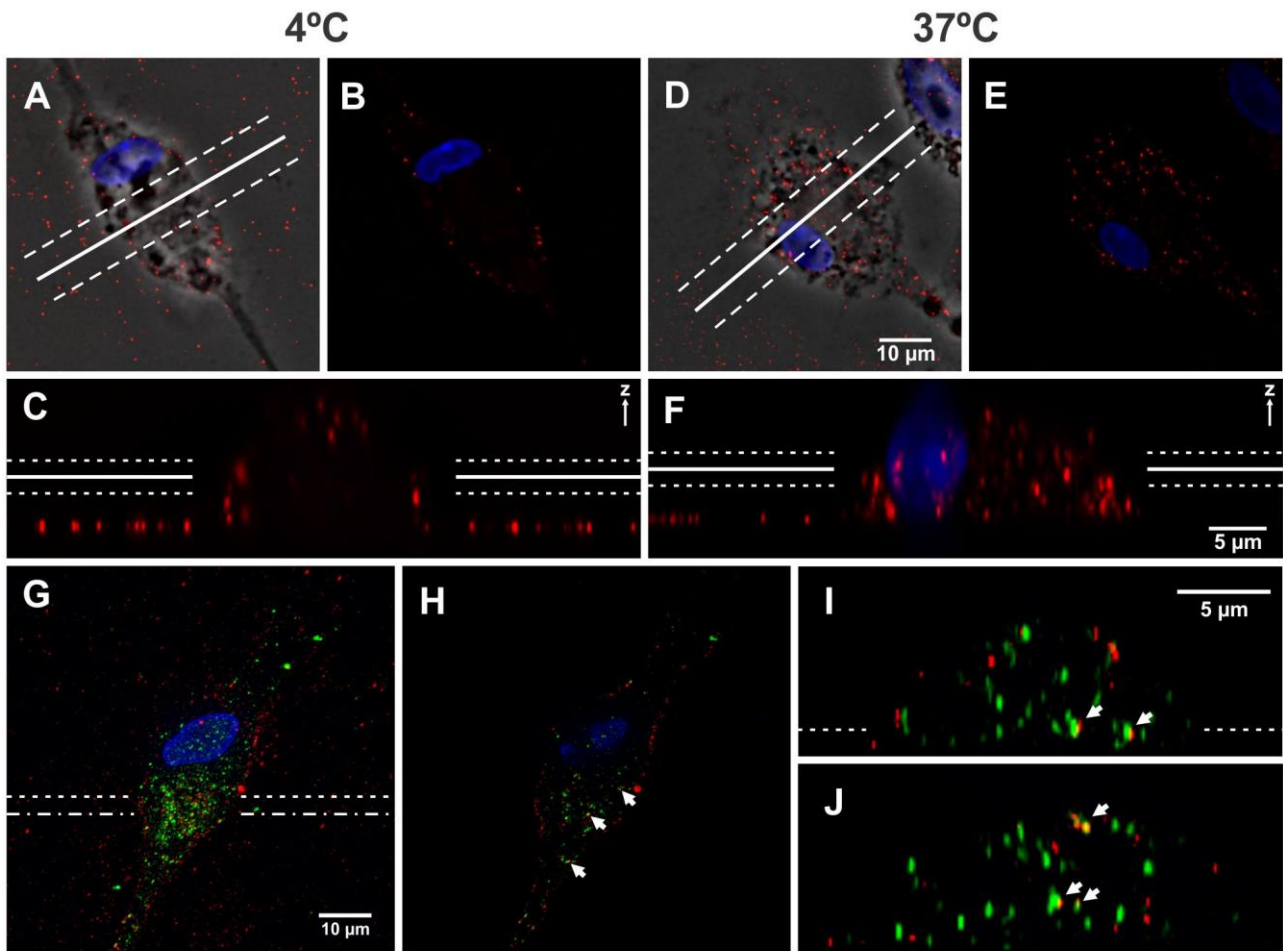


Figura 19. Caracterización de la actividad endocítica de las células con morfología de tanicito. Los cultivos de tanicitos se incubaron con fluoroesferas rojas durante 15 min a 4°C o 37°C, luego se fijaron las células y se tomaron imágenes de fluorescencia a lo largo del eje Z para realizar un stack con intervalos de 200 nM, el cual posteriormente se deconvolucionó. **A,D.** Microfotografías representativas realizadas con una proyección máxima de los stacks de células compatibles con tanicitos incubadas a 4°C o 37°C, respectivamente. Las imágenes de contraste de fase y de la tinción nuclear con Hoechst correspondientes fueron superpuestas a las anteriores. **B,E.** Microfotografías representativas realizadas con una proyección máxima de los mismos stacks que en A y D, pero realizados con menor cantidad de planos en Z, de forma que únicamente muestran la zona interna citoplasmática donde se observa la mayor cantidad de señal roja fluorescente. Para las mismas células, **C y F** muestran una proyección máxima ortogonal (10 μm de largo) de los planos que atraviesan la célula por la región medial del cuerpo celular. El centro de la proyección y el rango de la misma se indican en A y D con líneas continuas y punteadas, respectivamente. **G-J.** Experimento análogo al descrito anteriormente incubando con fluoroesferas rojas a 37°C con una ICQ posterior contra Rab5A (verde). G muestra una proyección máxima de un stack realizado sobre una célula compatible con tanicito; H muestra la imagen a un único nivel del stack (indicado en I); I y J muestran la vista ortogonal a los niveles indicados en G. Las flechas indican fluoroesferas colocalizando con Rab5A.

4. Estudio de la capacidad de internalización de rF-ghrelina de los tanicitos en cultivo

Con el objetivo de investigar si la ghrelina es internalizada en los tanicitos *in vitro*, incubamos las células con vehículo (medio Hanks) o con distintas concentraciones del análogo rF-ghrelina (50 nM, 150 nM o 300 nM) por 15 minutos a 37°C y luego determinamos su localización utilizando microscopía de

fluorescencia y realizamos análisis cuantitativos de la fluorescencia presente en el interior de las células. Pudimos confirmar que la rF-ghrelina es internalizada en los tanicitos siguiendo una curva de dosis-respuesta, en la cual la mayor concentración utilizada (300 nM) fue la óptima para observar una señal específica y significativamente diferente del control incubado con vehículo. El patrón de señal observado fue de tipo punteado, compatible con una señal vesicular y principalmente se localizó en el cuerpo celular, pero también en menor medida en la prolongación. Seguidamente, incubamos las células con rF-ghrelina durante 15 minutos a 4°C y observamos una disminución de la señal fluorescente en el interior de los tanicitos, que no resultó significativamente diferente del control, lo cual, al igual que ocurrió con las fluoroesferas, sugiere que se trata de un proceso de tipo endocítico que depende de una temperatura biológicamente compatible (**Figuras 20 y 21**).

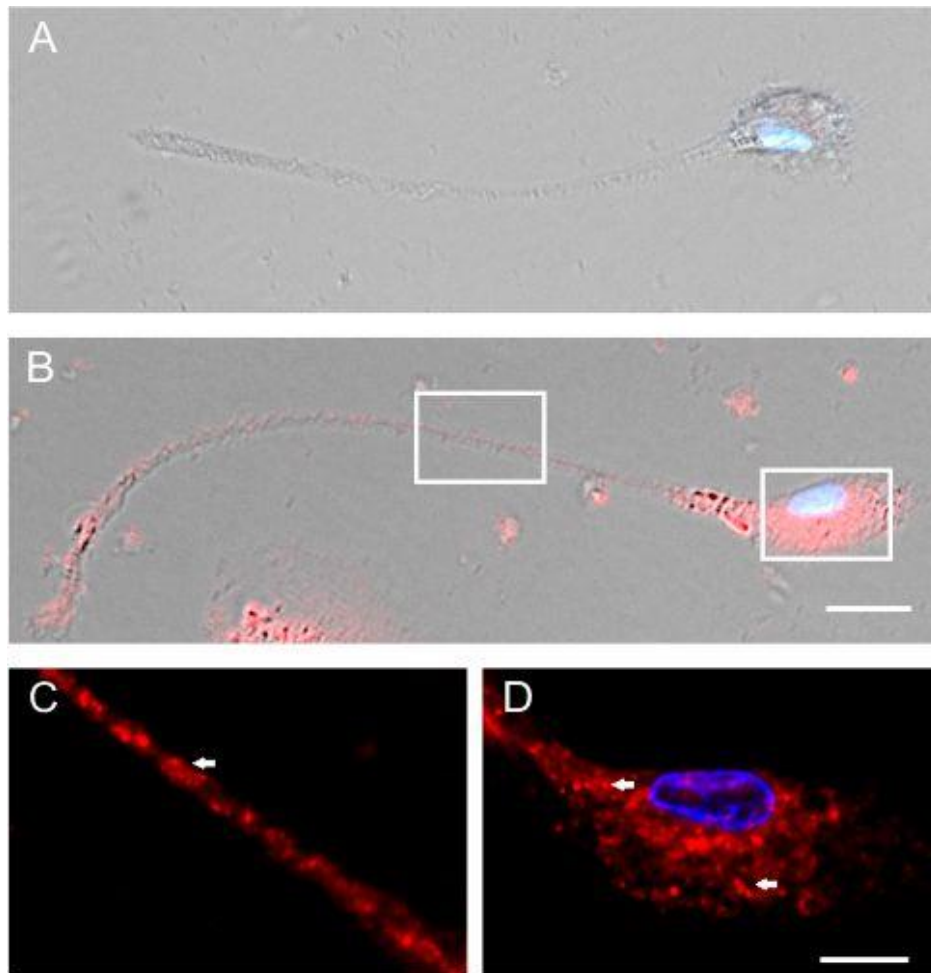


Figura 20. Internalización de rF-ghrelina en los tanicitos en cultivo. Microfotografías representativas de un tanicito al día 7 de cultivo incubado con vehículo (A) o rF-ghrelina (B) por 15 min. C y D muestran imágenes a alta magnificación de la prolongación y del cuerpo celular, respectivamente, de la figura B. Las flechas señalan la señal punteada de rF-ghrelina. La tinción nuclear con Hoechst se observa en azul y en A y B se le superpuso la microfotografía correspondiente obtenida con contraste de fase. Barra de escala: 20 μ M (40X), 10 μ M (63X).

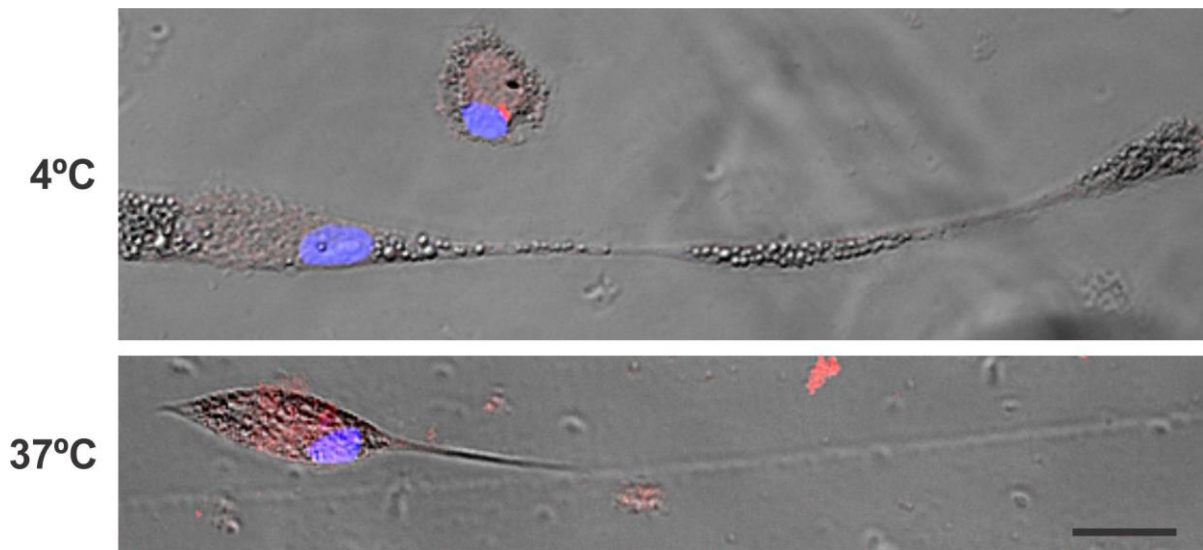


Figura 21. Internalización de rF-ghrelina en los tanicitos en cultivo a 4°C vs 37°C. Microfotografías confocales fluorescentes de tanicitos representativos en un cultivo al día 7, incubados con rF-ghrelina (roja) durante 15 min a 4°C o a 37°C. La tinción nuclear con Hoechst se observa en azul y se le superpuso la microfotografía correspondiente obtenida con contraste de fase. Barra de escala: 20 μ M (20X).

DISCUSIÓN

Los tanicitos de rata mantenidos en cultivo poseen características similares a las de los tanicitos *in vivo* en términos de estructura, marcadores moleculares y actividad biológica. Para obtener estos cultivos realizamos una disección cuidadosa de la muestra de tejido a una determinada edad de los animales y utilizamos un medio de cultivo definido. De esta forma, establecimos un método simple y reproducible para realizar cultivos primarios de tanicitos de rata. En nuestro conocimiento, este es el primer cultivo en el cual se logran obtener tanicitos con una morfología conservada, que permite identificar cada célula de manera independiente y realizar estudios de la biología de los tanicitos que requieran estas características, como la evaluación de los mecanismos de endocitosis o transcitosis.

La edad de los animales que se utilizan para realizar el cultivo (P10) se basó en estudios previos^{162,163} y parece ser crítica para el éxito del cultivo. Aunque también se reportaron cultivos de tanicitos realizados a partir de animales en edades más tempranas¹⁶⁴⁻¹⁶⁶, el estado de las células en P10 fue el que mejor nos funcionó, en cuanto a características del cultivo y reproducibilidad. Sin embargo, de manera similar a lo que ocurre con otros tipos celulares del sistema nervioso central, la aptitud de los tanicitos para ser cultivados *in vitro* disminuye rápidamente con la edad del animal del cual se extrae el tejido¹⁶². De hecho, no pudimos cultivar tanicitos de roedores adultos. La razón para esto probablemente se deba a que los tanicitos maduros son más sensibles a los pasos de disgregación celular, como ocurre con las células gliales y las neuronas¹⁶². Por otro lado, el cultivo resulta menos enriquecido en tanicitos cuando se realizan a partir de embriones, probablemente debido a una combinación de efectos, entre ellos la dificultad para distinguir los límites neuroanatómicos de la región EM/ARC y el mayor potencial mitótico de otros tipos de células de la glía durante este período¹⁶⁷. Además, los tanicitos de los cerebros embrionarios podrían comportarse de forma diferente a la de los tanicitos maduros, ya que la EM termina de desarrollarse en la etapa post-natal¹⁶⁸. Considerando todos estos aspectos, determinamos que la mejor edad de los animales para realizar el cultivo es P10, ya que a esta edad la región EM/ARC es una excelente fuente de tanicitos que se mantienen lo suficientemente plásticos como para resistir los procesos de disgregación celular y para sobrevivir *in vitro*, pero que ya poseen las características fisiológicas de los tanicitos maduros.

Nuestro protocolo de cultivo utiliza un medio definido sin suero, a diferencia de la mayoría de los trabajos donde se describen protocolos para el cultivo de este tipo celular. La utilización de un medio definido reduce la variabilidad del cultivo, ya que la composición química es conocida. El medio está compuesto por DMEM:F12 suplementado con seroalbúmina bovina, transferrina, insulina y gentamicina. Como se reportó previamente¹⁶⁵ se utilizó trombina, que se agregó al día 3 de cultivo. La trombina es una serina proteasa involucrada en la cascada de coagulación que aumenta la viabilidad de las células

ependimarias, y que no tiene efecto en la proliferación de los oligodendrocitos, macrófagos o fibroblastos. Se ha descrito que la trombina actúa a través de la activación del receptor 1 activado por proteasa^{158,169}. La transferrina, la insulina y la gentamicina son componentes habituales de los medios de cultivo que no poseen suero y son ampliamente utilizadas en cultivo de células endimarias con medio definido^{158,165,170-173}. Las condiciones de cultivo parecen favorecer el crecimiento y la supervivencia de los tanicitos, ya que no encontramos neuronas, microglía ni células endimarias ciliadas presentes en el cultivo. Sin embargo, las condiciones del cultivo anularon la capacidad proliferativa de los tanicitos, ya que su número no aumentó a lo largo del cultivo¹⁷⁴, así como su potencial neurogénico, ya que no se observó la formación de neuroesferas⁹⁷. Este hecho y la baja densidad celular alcanzada podría deberse a la falta de factores de crecimiento claves en el medio de cultivo. Una posibilidad es que la baja cantidad de células presentes en el cultivo favorezca el desarrollo de tanicitos mejor conservados morfológicamente. Es importante mencionar que alrededor del 70-80% de las células en cultivo no presenta morfología de tanicito. Estas células no tanicitoides no parecen dividirse ni interactuar con otras células, pudiendo representar una población de células gliales quiescentes, que podrían incluir otro tipo de células endimarias. La presencia de células diferentes a tanicitos es una propiedad intrínseca del tipo de cultivo realizado y restringe el uso del cultivo a experimentos en los cuales se puedan analizar las células de manera individual, como ocurre con las técnicas de imágenes o con los registros electrofisiológicos.

Los tanicitos en cultivo poseen un potencial de membrana constante en el estado de reposo (~-50 mV), sin actividad eléctrica espontánea ni evocada. Estudios previos en los que se midió el potencial de membrana en reposo de células endimarias en cultivo indicaron valores similares (-40 mV a -60 mV¹⁷⁵). Sin embargo, otros estudios reportaron que los tanicitos en rodajas de cerebro de rata tienen un potencial de membrana de ~-80 mV y presumieron que los valores descritos previamente podrían ser menos negativos debido a un daño en la membrana de las células¹⁷⁶. Una explicación posible es que los complejos de uniones gap, que *in vivo* conectan los tanicitos entre sí, funcionen como hemi-canales en cultivo y contribuyan parcialmente a despolarizar las células, ya que no son selectivos a las corrientes de cationes en ciertas condiciones¹⁷⁷. En conclusión, nuestros datos muestran que los tanicitos no tienen actividad eléctrica, lo cual los diferencia claramente de células neuronales y concuerda con lo reportado previamente.

Los tanicitos no constituyen una población homogénea de células, sino que se pueden distinguir al menos dos tipos diferentes⁸⁹. Esta diversidad morfológica *in vivo* refleja diferencias en sus funciones. La clasificación de los tanicitos en α y β depende de su localización, morfología, de la expresión de marcadores moleculares, de su ultraestructura y de sus funciones. Los tanicitos α se localizan en la región medial de la pared del tercer ventrículo y extienden sus procesos hacia el DMH, el VMH y a la zona dorsal

del ARC. Los tanicitos β proyectan hacia la región ventral del ARC y a la EM. Las características de nuestros tanicitos en cultivo, como ya mencionamos, imitan las de los tanicitos *in vivo*. Poseen un cuerpo celular de tamaño medio y una prolongación única y larga que termina en una zona terminal o *endfeet*. En términos de los marcadores moleculares, los tanicitos en cultivo expresan vimentina, DARPP32 y, en menor proporción, GFAP. La vimentina es un marcador común de todas las células ependimarias, incluyendo los tanicitos¹⁷⁸. La expresión de GFAP en tanicitos también fue previamente descrita^{179,180}, aunque es mucho menor que para astrocitos^{162,181,182} y debido a ella, muchas veces se describe a los tanicitos como negativos para GFAP^{178,183}. Recientemente, se mapeó la expresión de GFAP en los distintos tipos de tanicitos y se encontró que los tanicitos α eran positivos para el marcador, mientras que los β no lo expresaban⁹⁷. Por lo tanto, nuestros resultados de marcación leve para GFAP junto con una fuerte expresión de vimentina están de acuerdo con su origen en el hipotálamo medio-basal y sugieren que son mayormente tanicitos β . DARPP32 se expresa únicamente en los tanicitos hipotalámicos del cerebro adulto de la rata, lo cual le da una clara identidad a las células presentes en nuestros cultivos^{182,184}.

Los tanicitos presentes en nuestros cultivos contienen inclusiones lipídicas numerosas y grandes. *In vivo*, únicamente los tanicitos β contienen dichas inclusiones, en asociación con el retículo endoplasmático liso¹⁸⁵. Estas estructuras estarían involucradas en la síntesis de prostaglandinas, que a su vez regulan la liberación de neuropéptidos en la EM⁸⁹. Aunque la presencia de las inclusiones lipídicas podría deberse a las condiciones del cultivo, la región de la cual extraemos la muestra de tejido contiene tanicitos β , por lo que la presencia predominante de este tipo de tanicitos es esperable.

El análisis por microscopía electrónica de barrido nos permitió observar en detalle las características morfológicas de las células. Pudimos observar la presencia de protrusiones esféricas en el cuerpo celular de los tanicitos, que ya han sido descritas *in vivo* por microscopía electrónica de barrido y de transmisión^{176,185-188}. Estas protrusiones que contactan con el LCR del tercer ventrículo fueron observadas en tanicitos β , lo cual es otro indicativo de que nuestros cultivos están enriquecidos en este tipo de tanicitos. Este patrón de protrusiones de membrana también se observa en células que están sufriendo procesos apoptóticos pero, dado que nuestros tanicitos en cultivo no poseen ninguna otra característica de apoptosis (como la contracción celular o la fragmentación nuclear), podría ser un indicativo de procesos endocíticos⁸⁹. La presencia de numerosas vesículas ácidas, presumiblemente lisosomas o endosomas tardíos, en el cuerpo celular de los tanicitos, también es compatible con la existencia de procesos endocíticos en estas células. En línea con estos resultados, pudimos observar la internalización de fluoroesferas en los tanicitos, cuando se los incubaba con las mismas a 37°C, proceso que disminuye cuando la incubación se realiza a 4°C. Además, observamos co-localizaciones de la señal IR para Rab5A con las fluoroesferas, sugiriendo que los tanicitos las pueden incorporar por un proceso endocítico. Ha sido descrito que estas fluoroesferas de pequeño tamaño (20-50 nm) pueden

internalizarse tanto por procesos de endocitosis mediada por clatrina, como de endocitosis mediada por caveolina, dependiendo del linaje celular¹⁸⁹⁻¹⁹¹. Por lo tanto, nuestro sistema de cultivo de tanicitos puede resultar útil para describir los procesos de endocitosis y transcitosis que ocurren en estas células.

Además, de manera análoga a lo observado con las fluoroesferas, los tanicitos en cultivo internalizaron rF-ghrelina en un proceso dependiente de la temperatura. Este resultado concuerda con los experimentos realizados *in vivo* en el capítulo 1 de esta Tesis, en los cuales observamos la internalización de F-ghrelina en los tanicitos. El patrón de señal positiva para rF-ghrelina en las células fue de tipo punteado, compatible con una señal vesicular y con un proceso endocítico. En este sentido, nuestros resultados coinciden con el estudio de Collden y colaboradores, en el cual se describe la presencia de FL-rF-ghrelina en tanicitos en cultivo colocalizando con vesículas IR para clatrina⁹⁹.

**CAPÍTULO 3: ESTUDIO DE LA DEPENDENCIA DEL GHSR EN EL
TRANSPORTE DE LA GHRELINA A TRAVÉS DE LA BARRERA SANGRE-LCR**

RESULTADOS

1. Estudio *in vivo* de la dependencia del GHSR en la internalización de rF-ghrelina en las células que conforman la barrera sangre-LCR

Con el objetivo de estudiar si la presencia del GHSR es necesaria para la internalización de rF-ghrelina en las células que conforman la barrera sangre-LCR, analizamos la presencia del análogo en estas células luego de realizar inyecciones centrales o sistémicas del mismo en ratones WT y en ratones deficientes del GHSR.

En primer lugar, inyectamos rF-ghrelina por vía ICV y, luego de 15 minutos, sacrificamos a los animales y analizamos la presencia del análogo fluorescente de ghrelina por observación directa de los cortes de cerebro en un microscopio de fluorescencia. En los ratones WT, la rF-ghrelina fue internalizada en algunas de las células epiteliales de los plexos coroideos, así como también en tanicitos α y β . Como esperábamos, el patrón de rF-ghrelina observado fue similar al que obtuvimos previamente realizando el mismo experimento con la F-ghrelina (**Figura 22**). En los ratones deficientes del GHSR, la rF-ghrelina también se internalizó en algunas células epiteliales de los plexos coroideos y en tanicitos α y β , con un patrón similar al observado para los animales WT. En ambos grupos de animales, la señal se encontró concentrada en el interior de algunas de las células epiteliales de los plexos coroideos, mientras que otras células no mostraron señal fluorescente en su interior, observándose una marcación “en parches” (**Figura 22 A,B,E,F**). En la EM, la señal fluorescente roja fue intensa en la mayoría de los tanicitos β y en algunos pocos tanicitos α , además de en algunas de las células epiteliales de la parte dorsal del tercer ventrículo en ambos grupos de animales (**Figura 22 C,D,G,I,H,J**). En los plexos coroideos, el análisis cuantitativo indicó que los animales deficientes del GHSR poseen un menor porcentaje de células epiteliales marcadas con rF-ghrelina (respecto del total de células epiteliales presentes) que los animales WT ($1,83 \pm 0,52$ y $11,10 \pm 2,50\%$, respectivamente, $p < 0,01$) (**Figura 23A**). Por otro lado, la intensidad de señal dentro de cada una de las células marcadas con rF-ghrelina también fue mayor para el genotipo WT que para el deficiente del GHSR (considerando al promedio de la intensidad de fluorescencia de los animales WT como 100%, para dichos animales la cuantificación fue de $100,0 \pm 16,6\%$ mientras que para los deficientes del GHSR fue de $46,1 \pm 15,9\%$, $p < 0,05$) (**Figura 23B**). Por el contrario, en los tanicitos β cuantificados, no observamos diferencias en la cantidad de células que internalizaron la rF-ghrelina, ni tampoco en la intensidad de fluorescencia presente en cada una de ellas entre los animales WT y los deficientes del GHSR (**Figura 23 C,D**). Estos resultados sugieren que el GHSR es parcialmente necesario para la internalización de ghrelina en las células de los plexos coroideos desde el LCR, mientras que no lo es para la internalización en los tanicitos β .

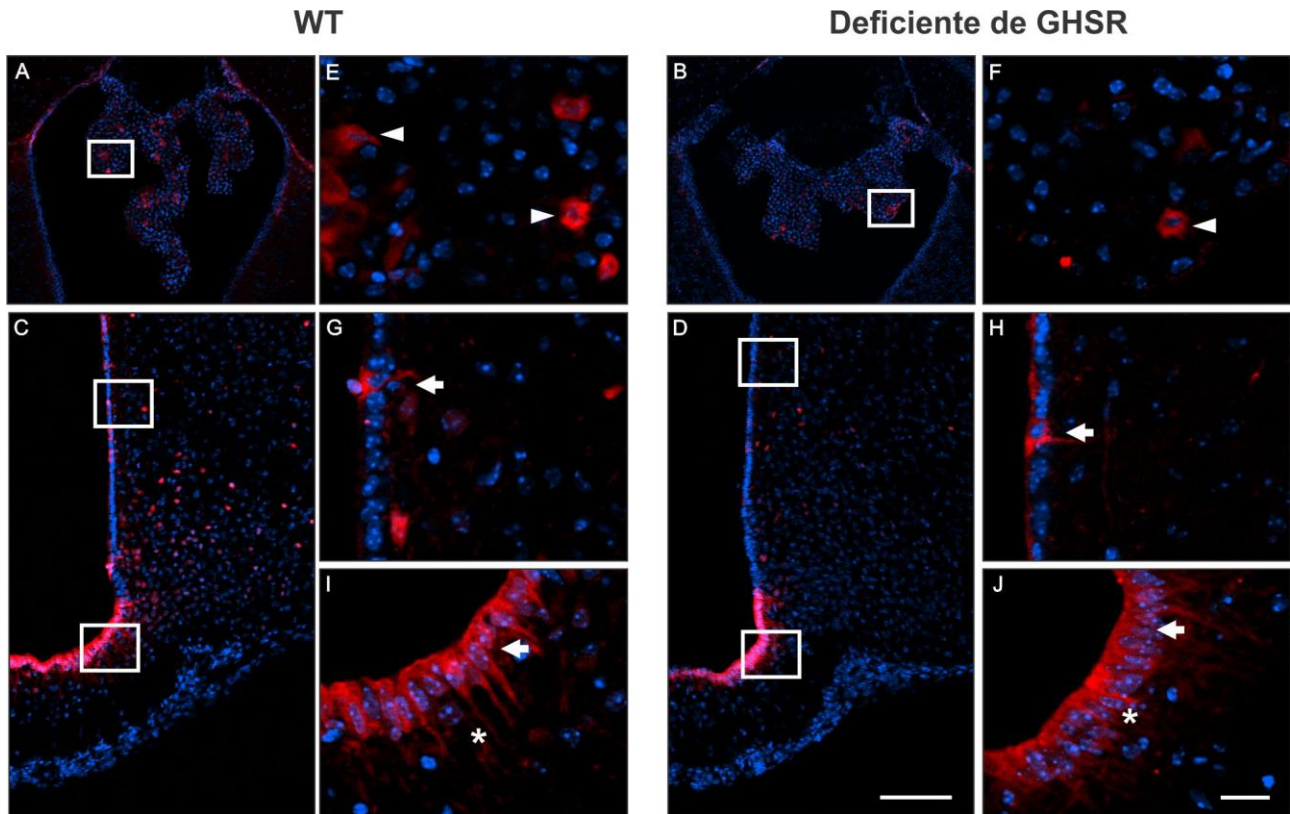


Figura 22. La rF-ghrelina administrada de manera central es internalizada por las células de la barrera sangre-LCR en ratones WT y deficientes del GHSR. Las microfotografías muestran el patrón de distribución de la señal fluorescente de la rF-ghrelina (roja) en los plexos coroideos (**A, B**) y en la pared del tercer ventrículo hipotalámico (**C, D**) de ratones WT o deficientes del GHSR que fueron inyectados por vía ICV con rF-ghrelina y perfundidos 15 minutos después. **E, F, G, I, H y J** muestran imágenes a alta magnificación de las áreas marcadas en las imágenes de baja magnificación. En todos los casos se observan los núcleos marcados con Hoechst (azul). Las cabezas de flecha indican células de los plexos coroideos con señal de rF-ghrelina en el interior celular. Las flechas señalan los cuerpos celulares de células ependimarias o tanicitos con señal de rF-ghrelina y los asteriscos marcan los procesos de estas células. Barras de escala: 100 μm (baja magnificación, 10X) y 20 μm (alta magnificación, 63X).

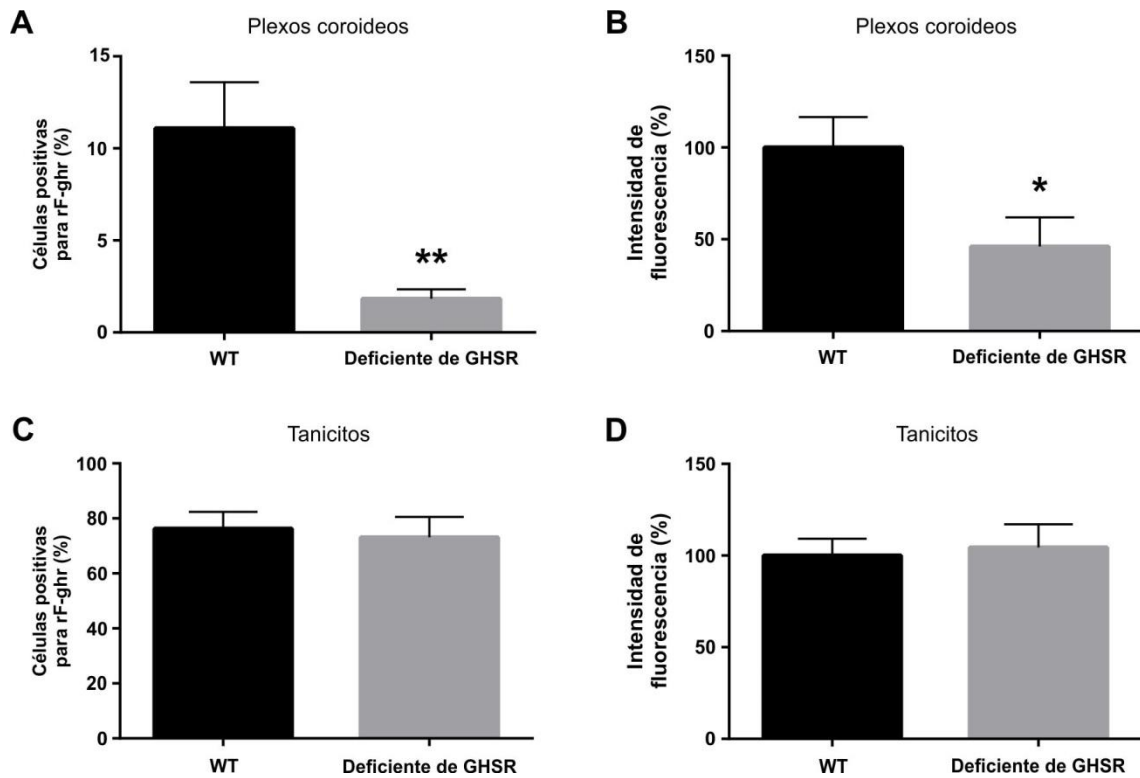


Figura 23. Cuantificación de la rF-ghrelin internalizada por las células de la barrera sangre-LCR en ratones WT y deficientes del GHSR. Los gráficos de barras muestran las cuantificaciones del porcentaje de células que internalizaron rF-ghrelin (A, C) y de la intensidad de fluorescencia en el interior de dichas células (B, D) para los plexos coroideos (A, B) y los tanicitos β (C, D) de animales WT o deficientes del GHSR inyectados con rF-ghrelin por vía ICV. La intensidad de fluorescencia se expresa en porcentaje respecto de la intensidad promedio de los animales WT. Los datos representan la media \pm SEM y fueron analizados mediante test t, con corrección de Welch en los casos en los que corresponde. * < 0,05; ** < 0,01, vs el grupo WT.

En segundo lugar, inyectamos rF-ghrelin por vía SC en ratones WT, perfundimos a los animales 15 minutos después y analizamos la localización de la señal fluorescente roja en sus cerebros. La rF-ghrelin fue internalizada en los plexos coroideos y en la cara apical, en contacto con el LCR, de los tanicitos α y β (**Figura 24 A,E**). En ambos casos, la señal de rF-ghrelin mostró un patrón punteado, de forma similar a lo observado con la F-ghrelin (**Figura 24 C,G,I**). Además, la rF-ghrelin marcó células del ARC. Luego, realizamos el mismo experimento pero perfundiendo a los animales 5 o 30 minutos post-tratamiento con rF-ghrelin. Aquí observamos que la señal fluorescente presente tanto en los plexos coroideos como en los tanicitos para ambos tiempos fue menor que para el tiempo de 15 minutos. Debido a ello, utilizamos el tiempo de 15 minutos para realizar el experimento en animales deficientes del GHSR. En estos animales, no observamos señal de rF-ghrelin en los plexos coroideos ni en los tanicitos, así como tampoco en el ARC (**Figura 24 B,F,D,H,J**). El análisis cuantitativo indicó que, la señal fluorescente roja en los animales WT inyectados con rF-ghrelin por vía SC fue mayor que en los inyectados con vehículo,

tanto en los plexos coroideos ($136,3 \pm 24,6$ y $37,7 \pm 6,6$ u.a., respectivamente, $p < 0,01$) como en los tanicitos ($94,0 \pm 13,6$ y $43,2 \pm 8,9$ u.a., respectivamente, $p < 0,05$). En cambio, la señal fluorescente roja en dichas células en los animales deficientes del GHSR no fue diferente para los inyectados con rF-ghrelina respecto de los inyectados con vehículo (**Figura 25**). Este resultado indicaría que el GHSR es necesario para la internalización de rF-ghrelina en los plexos coroideos y en los tanicitos cuando la hormona se administra de forma sistémica.

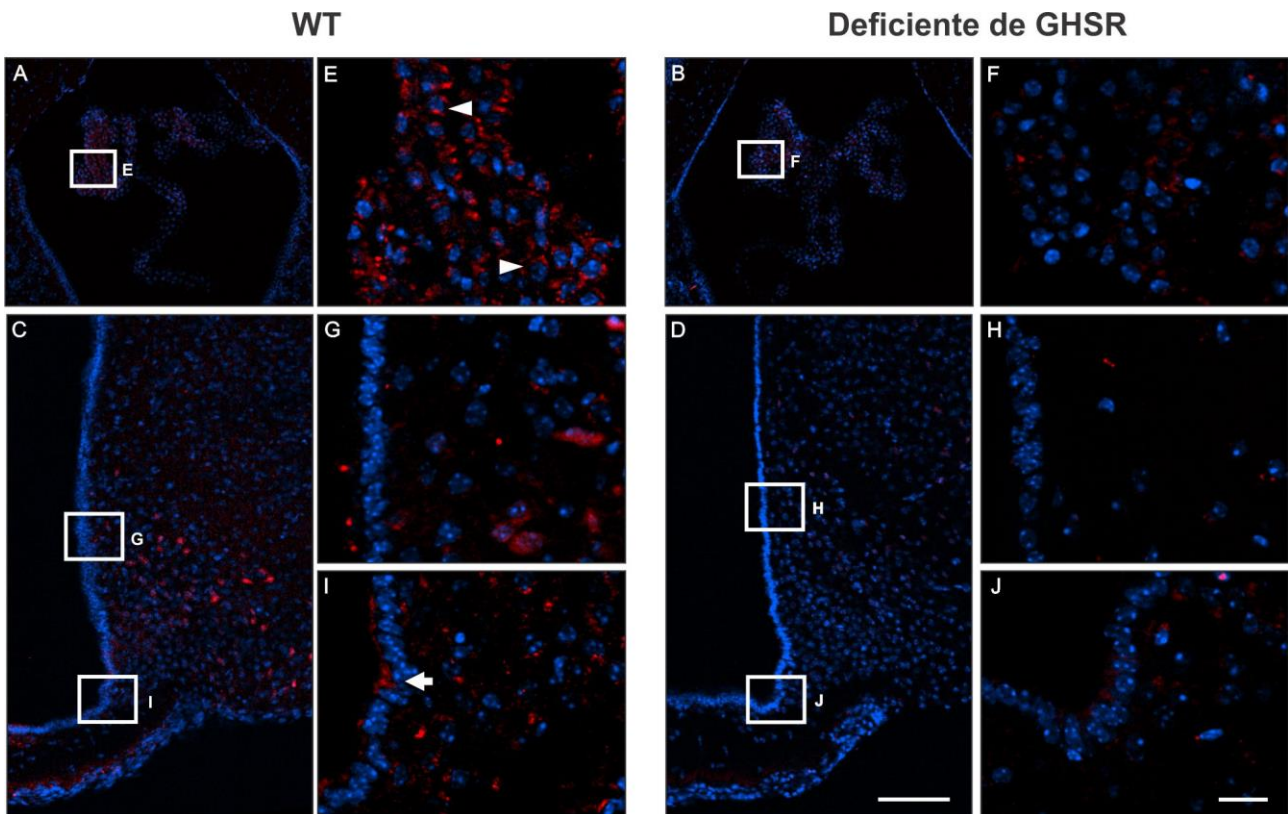


Figura 24. La rF-ghrelina administrada de manera sistémica es internalizada por las células de la barrera sangre-LCR en ratones WT, pero no en los deficientes del GHSR. Las microfotografías muestran el patrón de distribución de la señal fluorescente de la rF-ghrelina (roja) en los plexos coroideos (A, B) y en la pared del tercer ventrículo hipotalámico (C, D) de ratones WT o deficientes del GHSR que fueron inyectados por vía SC con rF-ghrelina y perfundidos 15 minutos después. E, F, G, I, H y J muestran imágenes a alta magnificación de las áreas marcadas en las imágenes de baja magnificación. En todos los casos se observan los núcleos marcados con Hoechst (azul). Las cabezas de flecha indican células de los plexos coroideos con señal de rF-ghrelina. Las flechas señalan los cuerpos celulares de células endimarias o tanicitos con señal de rF-ghrelina. Barras de escala: 100 μm (baja magnificación, 10X) y 20 μm (alta magnificación, 63X).

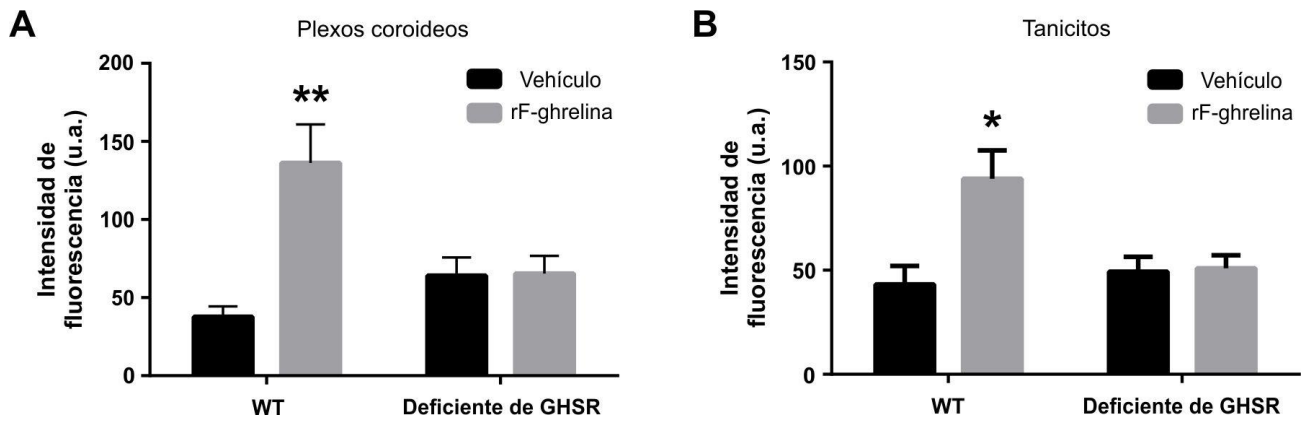


Figura 25. Cuantificación de la señal de rF-ghrelina en las células de la barrera sangre-LCR en ratones WT y deficientes del GHSR. Los gráficos de barras muestran las cuantificaciones de la intensidad de fluorescencia en los plexos coroideos (A) o los cuerpos de los tanicitos β (B) de animales WT o deficientes de GHSR inyectados por vía SC con vehículo o con rF-ghrelina. Los datos representan la media \pm SEM y fueron analizados mediante ANOVA de dos vías, seguido por el post test de Sidak. * < 0,05; ** < 0,01, respecto de los grupos con vehículo.

2. Estudio de la dependencia del GHSR en el acceso de la ghrelina circulante al LCR

Con el objetivo de determinar si la presencia del GHSR es necesaria para el acceso de la ghrelina sistémica al LCR, estudiamos dicho acceso en animales WT y deficientes del GHSR. Para ello medimos por el método de ELISA los niveles de ghrelina tanto en el plasma como en el LCR de ratones expuestos a tres condiciones experimentales distintas: 1) ratones alimentados *ad libitum* inyectados con vehículo por vía SC; 2) ratones alimentados *ad libitum* inyectados con ghrelina por vía SC; y 3) ratones expuestos a un protocolo de 60% de restricción calórica.

Los niveles de ghrelina en plasma no fueron diferentes entre ratones WT y deficientes del GHSR alimentados *ad libitum*, como ya se había descrito previamente¹⁹², mientras que los niveles de ghrelina en el LCR de estos ratones fueron indetectables. Luego de una inyección por vía SC de ghrelina en ratones alimentados *ad libitum*, los niveles de ghrelina en plasma aumentaron de manera similar para ambos genotipos. El nivel de ghrelina en el LCR de los animales WT aumentó, siendo de $30,0 \pm 17,3$ pg/ml. En cambio, en los animales deficientes del GHSR, los niveles de ghrelina en el LCR luego de la inyección sistémica de ghrelina continuaron siendo indetectables. Luego del protocolo de restricción calórica, se observó un aumento en la concentración plasmática de ghrelina, respecto al grupo control alimentado *ad libitum*, en ambos grupos de animales. Sin embargo, los niveles de ghrelina en el LCR de los animales sometidos al protocolo de restricción calórica no pudieron ser detectados de manera certera con este ensayo. Este experimento nos indicaría que el nivel de ghrelina en el LCR aumenta, de forma dependiente del GHSR, cuando la ghrelina se administra de forma exógena.

3. Estudio *in vitro* de la dependencia del GHSR en la internalización de rF-ghrelina en los plexos coroideos

Para evaluar la capacidad de internalización de la rF-ghrelina por las células epiteliales de los plexos coroideos y su dependencia del GHSR, utilizamos también una estrategia *in vitro*. Para ello, sacrificamos ratones WT o deficientes del GHSR, disectamos los plexos coroideos de sus cerebros y los incubamos en medio Hanks a 37°C con 5% CO₂ para estabilizar el tejido. Luego, incubamos los plexos coroideos en las mismas condiciones en medio Hanks solo o conteniendo 300 nM de rF-ghrelina por 15 minutos. La rF-ghrelina fue internalizada en algunas de las células epiteliales, pero no en otras, observándose en las primeras una intensa señal fluorescente en su interior (**Figura 26A**). Los análisis cuantitativos no mostraron diferencias en el porcentaje de células marcadas con rF-ghrelina entre los animales WT y los deficientes del GHSR. Sin embargo, la intensidad de fluorescencia en el interior de las células marcadas fue mayor para los animales WT que para los deficientes del GHSR (considerando al promedio de la intensidad de fluorescencia de los animales WT como 100%, la cuantificación fue de $100,0 \pm 1,6\%$ y $73,9 \pm 3,4\%$, respectivamente, $p < 0,001$). Luego, realizamos el mismo experimento pero pre-incubando los explantes con el ligando del GHSR JMV2959 para evaluar si la presencia del mismo afectaba la capacidad de las células de internalizar la rF-ghrelina. Los resultados mostraron que, en presencia del JMV2959, el número de células epiteliales capaces de internalizar la ghrelina no se modificó pero la intensidad de fluorescencia en el interior de cada una de ellas fue mayor que para el control sin JMV ($136,6 \pm 9,3\%$, $p < 0,001$) (**Figura 26 B,C**).

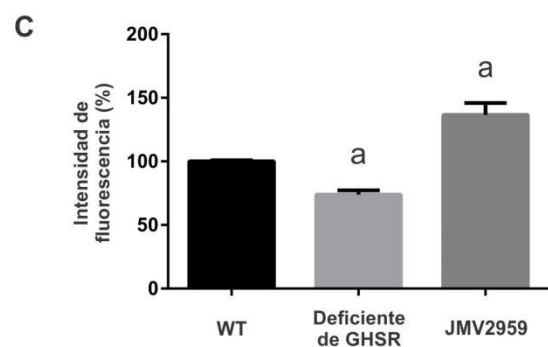
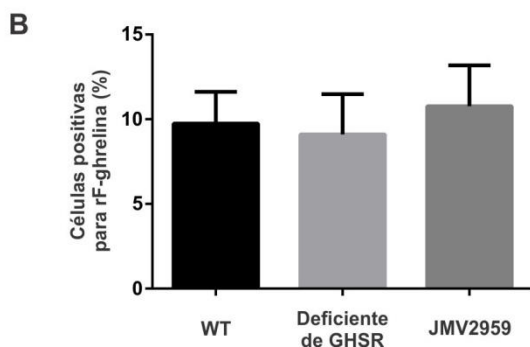
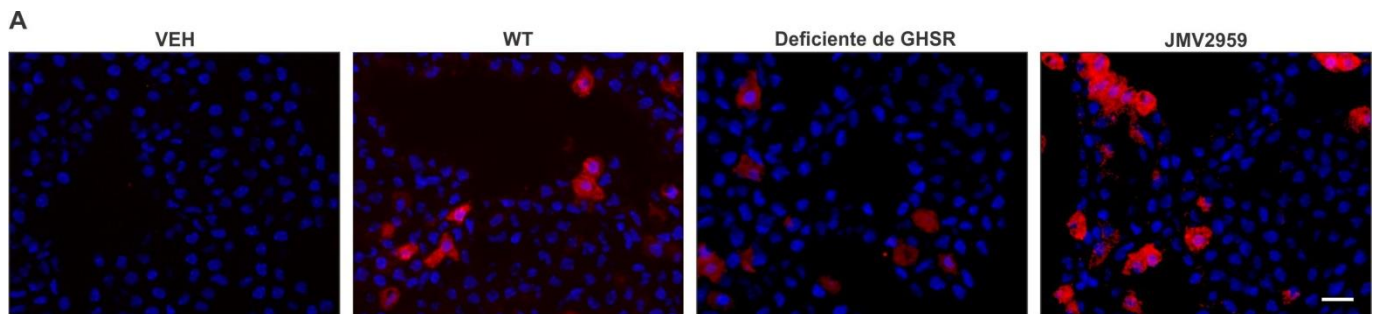


Figura 26. Medidas de la internalización de rF-ghrelina en explantes de plexos coroideos. **A.** Microfotografías representativas de explantes de plexos coroideos incubados con vehículo o con rF-ghrelina (grupos *WT*, *Deficiente de GHSR* y *JMV2959*) durante 15 min. En todos los casos se observan los núcleos marcados con Hoechst (azul). Barra de escala: 20 μm (40X). **B.** El gráfico de barras muestra el porcentaje de células epiteliales marcadas del total de células, que fue estimado cuantificando el número de núcleos, para explantes de plexos coroideos de animales *WT* y deficientes del *GHSR* que fueron incubados con rF-ghrelina a 37°C durante 15 min. El grupo “*JMV2959*” corresponde a explantes de plexos coroideos de animales *WT* que fueron pre-incubados con *JMV2959* durante 15 min y luego incubados con rF-ghrelina durante 15 min a 37°C. **C.** El gráfico de barras muestra el porcentaje de intensidad de fluorescencia, considerando al promedio del *WT* como 100%, dentro de las células consideradas positivas para rF-ghrelina. Los datos representan la media \pm SEM y fueron analizados mediante un ANOVA de una vía, seguido por el post test de Bonferroni. *** < 0,001 respecto del grupo *WT*.

4. Estudio *in vitro* de la dependencia del GHSR en la internalización de rF-ghrelina en los tanicitos hipotalámicos

Para el caso de los tanicitos hipotalámicos, utilizamos diferentes estrategias *in vitro* para estudiar si la internalización de la rF-ghrelina en los tanicitos en cultivo depende del *GHSR*.

En primer lugar, utilizamos el cultivo primario de tanicitos de rata que se describió en el capítulo 2. Aquí pre-incubamos las células con dos concentraciones del ligando del *GHSR*, *JMV2959*, y posteriormente las incubamos con rF-ghrelina 300 nM como en los experimentos anteriores. No observamos diferencias significativas en la cantidad de rF-ghrelina internalizada por los tanicitos en presencia o ausencia del *JMV2959* (**Figura 27A**). Además, adaptamos el cultivo de tanicitos de rata para aplicarlo a tanicitos de ratón. Realizamos cultivos de tanicitos de ratones *WT* y de ratones deficientes del *GHSR* y los incubamos con rF-ghrelina por 15 minutos para realizar el análisis de cuantificación de fluorescencia en el interior de las células, de la misma forma utilizada para los tanicitos de rata. Los tanicitos en cultivo provenientes de ratones *WT* internalizaron la rF-ghrelina con un patrón similar al observado para los tanicitos de rata (**Figura 27B**). Cuando los comparamos con los tanicitos provenientes de ratones deficientes del *GHSR*, los resultados cuantitativos no mostraron diferencias en la internalización de rF-ghrelina por los tanicitos de ratones de ambos genotipos (**Figura 27C**). Estos resultados indicarían que el *GHSR* no es requerido para la internalización de ghrelina en los tanicitos en cultivo de rata o ratón, corroborando nuestras observaciones *in vivo*.

En segundo lugar, utilizamos un cultivo secundario de tanicitos de rata, en el cual los tanicitos forman una monocapa de células. Este tipo de cultivos permite estudiar los procesos de internalización de rF-ghrelina a través de medidas de fluorescencia de los lisados celulares en un fluorímetro¹⁶³. Incubamos los tanicitos en cultivo, de manera análoga a lo ensayado con el cultivo primario, con vehículo (medio Hanks) solo o conteniendo 50 nM de rF-ghrelina durante 15 minutos y, luego de lavarlos, lisamos las células y medimos la fluorescencia presente en los lisados celulares utilizando un fluorímetro. Con este

experimento confirmamos que la rF-ghrelina es internalizada por los tanicitos y que dicha internalización es menor cuando la incubación se realiza a 4°C (**Figura 27D**). Luego, realizamos experimentos pre-incubando las células con dos concentraciones del ligando JMV2959 y realizamos el mismo procesamiento descrito antes. Los resultados indicaron que la internalización de rF-ghrelina en presencia del JMV2959 no se modificó respecto a las células pre-incubadas con vehículo (**Figura 27E**). Es importante mencionar que la concentración de rF-ghrelina utilizada en estos cultivos secundarios fue menor que la utilizada en los cultivos primarios debido a que el método de detección de la fluorescencia por medidas en el fluorímetro resultó más sensible que la cuantificación en las microfotografías tomadas con el microscopio de fluorescencia. Así, adaptamos las concentraciones del JV2959 utilizadas para respetar las proporciones respecto a la rF-ghrelina.

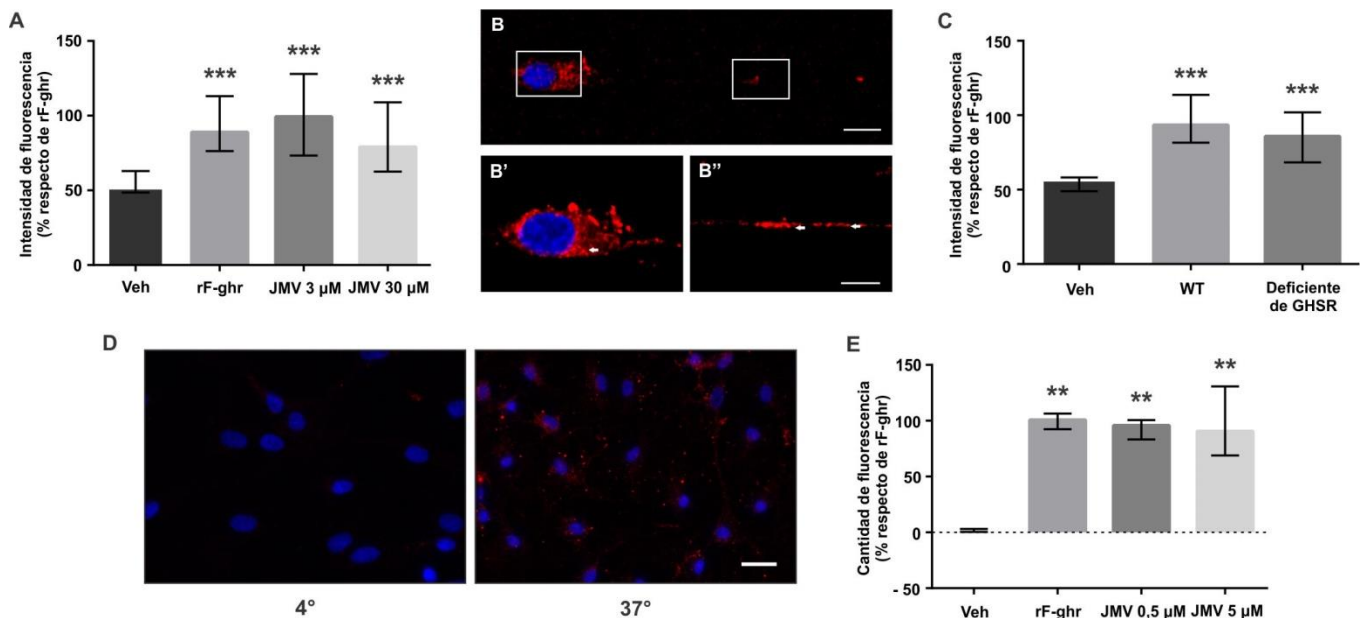


Figura 27. Medidas de la internalización de rF-ghrelina en cultivos de tanicitos. **A.** El gráfico de barras muestra las cuantificaciones de intensidad de fluorescencia para tanicitos en cultivo primario pre-incubados con vehículo (*Veh*) y *rF-ghr*) o con el ligando del GHSR, JMV2959 (*JMV 3 μ M* y *JMV 30 μ M*) e incubados posteriormente con vehículo (*Veh*) o con rF-ghrelina (*rF-ghr*, *JMV 3 μ M* y *JMV 30 μ M*) durante 15 min. Los datos se muestran como porcentaje de intensidad de fluorescencia en el interior de las células respecto del promedio del control positivo (*rF-ghr*). **B.** Microfotografías representativas de un tanicito de ratón al día 7 de cultivo incubado con rF-ghrelina por 15 min. **B'** y **B''** muestran imágenes a alta magnificación del cuerpo celular y de la prolongación, respectivamente, de la figura B. Las flechas señalan la señal punteada de rF-ghrelina. Se observan los núcleos marcados con Hoechst (azul). Barra de escala: 20 μ m (40X), 10 μ m (63X). **C.** El gráfico de barras muestra las cuantificaciones de intensidad de fluorescencia para tanicitos de ratones WT o deficientes del GHSR en cultivo incubados con vehículo (*Veh*) o rF-ghrelina (*WT* y *Deficiente de GHSR*) durante 15 min. Las cuantificaciones se muestran como porcentaje de intensidad de fluorescencia en el interior de las células respecto del promedio del control positivo (*WT*). **D.** Microfotografías representativas de cultivos de tanicitos secundarios de rata que fueron incubados con rF-ghrelina (roja) durante 15 min a 4°C o 37°C. Los núcleos se observan marcados con Hoechst (azul). Barra de escala: 20 μ m (63X). **E.** El gráfico

de barras muestra las cuantificaciones de fluorescencia para lisados celulares obtenidos a partir de tanicitos en cultivo secundario pre-incubados con vehículo (*Veh* y *rF-ghr*) o el ligando del GHSR JMV2959 (*JMV 0,5 μM* y *JMV 5 μM*) e incubados posteriormente con vehículo (*Veh*) o con rF-ghrelina (*rF-ghr, JMV 0,5 μM* y *JMV 5 μM*) durante 15 min. Las cuantificaciones se muestran como porcentaje de fluorescencia en el lisado respecto del promedio del control positivo (*rF-ghr*). Las barras en A, C y E representan la mediana con el rango intercuartil y el análisis estadístico se realizó mediante un test de Kruskal-Wallis, seguido del post test de Dunn. **<0,01; ***<0,001 respecto del grupo *Veh*.

5. Medidas de expresión del GHSR en los plexos coroideos y en los tanicitos

Con el objetivo de evaluar si las células que conforman la barrera sangre-LCR expresan el GHSR, realizamos medidas de los niveles de ARN mensajero (ARNm) en ambos tipos celulares utilizando qPCR en tiempo real.

Para el caso de los plexos coroideos, utilizamos los explantes descritos antes para medir la expresión del GHSR en ratones WT y en ratones deficientes del GHSR. En estos análisis encontramos que el ARNm de GHSR se pudo detectar en los plexos coroideos de animales WT (nivel de expresión relativa = 1,0 (0,4 - 2,3), considerando 1 al promedio de los animales WT), mientras que el ARNm fue prácticamente indetectable en los plexos coroideos de los animales deficientes del GHSR (nivel de expresión = 0,07 (0,03 - 0,09)) (**Figura 28 A,B**).

Para el caso de los tanicitos medimos los niveles de expresión del GHSR en tanicitos de ratones *in vivo* y en tanicitos de rata en cultivo. En el primer caso, utilizamos ratones WT que expresan la proteína fluorescente roja TdTomato exclusivamente en las células del epéndima y los tanicitos, luego de ser inyectados en el tercer ventrículo cerebral con la proteína recombinante TAT-CRE. Dissectamos las EM de estos ratones y las sometimos a una disgregación y posterior separación por citometría de flujo con separación de células fluorescentes rojas (los tanicitos de la EM) de las no rojas. Luego medimos los niveles de ARNm de GHSR en ambas fracciones de células por qPCR en tiempo real. Encontramos que el nivel de ARNm de GHSR fue prácticamente indetectable en la fracción de células rojas, donde se encontraban los tanicitos (nivel de expresión relativa = 0,004 (0,002 - 0,2), considerando 1 al promedio de las células no rojas), mientras que pudo detectarse presencia de dicho ARNm en algunas células no rojas (nivel de expresión relativa = 0,7 (0,4 - 1,7)), que incluye células presentes en la EM diferentes de tanicitos (**Figura 28 C,D**). En los cultivos secundarios de tanicitos de rata descritos antes, el nivel de ARNm de GHSR fue indetectable (Ct > 40). Estos resultados nos permiten concluir que los tanicitos hipotalámicos no expresan niveles detectables del ARNm de GHSR.

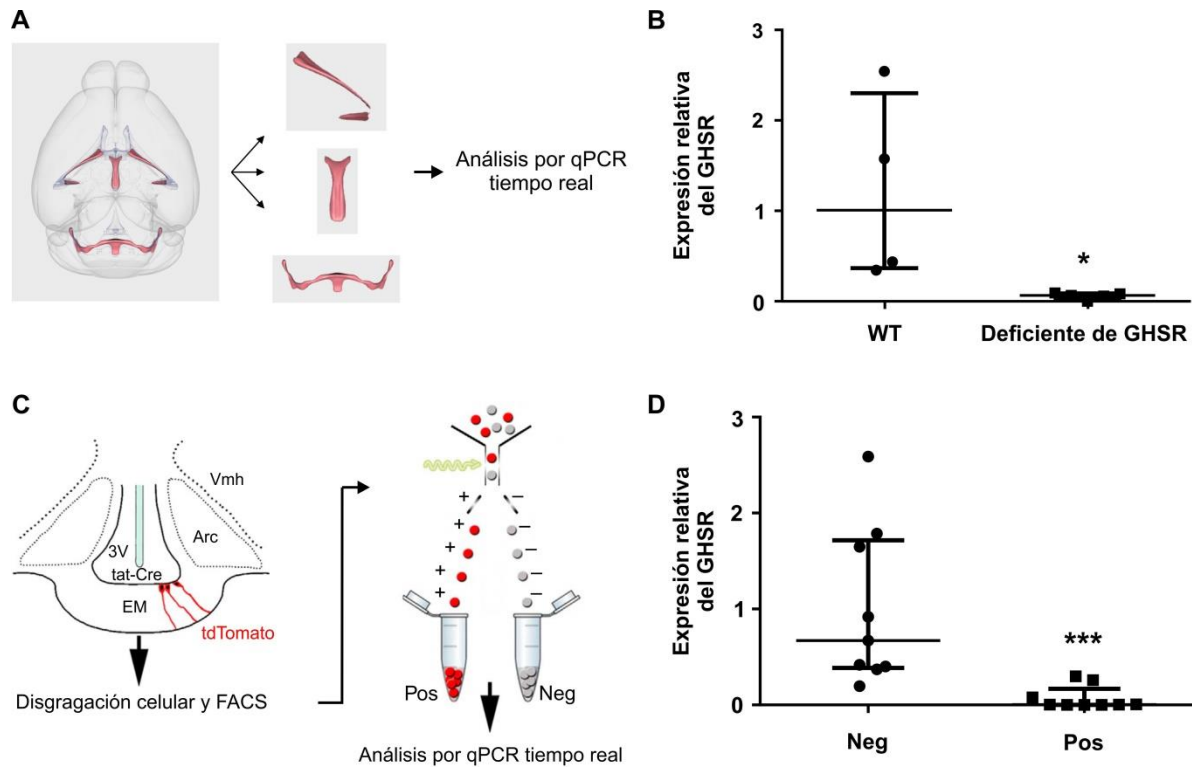


Figura 28. Obtención de células de interés para medidas por qPCR. **A.** Esquema del aislamiento de los explantes de plexos coroideos por disección bajo lupa. **B.** El gráfico muestra la expresión relativa de *ghsr* en los plexos coroideos de ratones WT y deficientes del GHSR, medida por qPCR en tiempo real. **C.** Esquema del aislamiento de tanicitos por el método Clasificación Celular Activada por Fluorescencia (FACS, de sus siglas en inglés para *fluorescence-activated cell sorting*) en ratones tdTomato loxP/+ inyectados con la proteína Tat-cre en el tercer ventrículo. *Pos*: células Tomato-positivas (tanicitos); *Neg*: células Tomato-negativas. **D.** El gráfico muestra la expresión relativa de *ghsr* para las células Tomato-positivas y negativas, medida por qPCR en tiempo real. Los datos representan la mediana con el rango intercuartil y fueron analizados mediante un test de Mann-Whitney. * <0.05 vs grupo *Deficiente de GHSR*, *** <0.001 vs grupo *Neg*.

DISCUSIÓN

En este capítulo estudiamos si la internalización de la ghrelina en las células de la barrera sangre-LCR y la accesibilidad de la misma al LCR dependen del GHSR. Para ello utilizamos estrategias *in vivo* e *in vitro*.

Cuando inyectamos rF-ghrelina de manera central, el número de células de los plexos coroideos capaces de internalizar la rF-ghrelina presente en el LCR de los animales deficientes del GHSR es menor que en los animales WT. Dicha observación sugiere que una subpoblación de células de los plexos coroideos internalizan la rF-ghrelina únicamente en presencia del GHSR (~9,3%). Por otro lado, las células que tienen la capacidad de internalizar ghrelina en forma independiente del GHSR, internalizan una cantidad menor de ghrelina que las células de los animales WT. Una interpretación de estos resultados es que una subpoblación de células epiteliales de los plexos coroideos internaliza la ghrelina a través de dos formas diferentes, una dependiente del GHSR y otra independiente del mismo (~1,8%). Además, existirá una tercera población de células que no internaliza la rF-ghrelina (~88,9%). La morfología de las células que internalizan rF-ghrelina indica que son células epiteliales, aunque dicha identidad no fue corroborada, para eso necesitaríamos realizar experimentos análogos pero utilizando marcadores específicos de células epiteliales, como por ejemplo anticuerpos contra tubulina, y/o de células endoteliales, como lectina de tomate o anticuerpos contra CD31. Por otro lado, la presencia del GHSR no sería necesaria para la internalización de rF-ghrelina en los tanicitos desde el LCR, ya que no observamos diferencias en la internalización entre los animales WT y los deficientes del GHSR.

Cuando inyectamos rF-ghrelina de manera sistémica, no observamos internalización en las células de la barrera sangre-LCR de los animales deficientes del GHSR, lo cual sugiere que el GHSR es necesario para la internalización de rF-ghrelina plasmática en estas células. La señal de rF-ghrelina en los animales WT se localizó únicamente en el lado apical de los tanicitos y no en su citoplasma como ocurre con las inyecciones por vía ICV, por lo que no podemos asegurar que estas células sean capaces de incorporar la rF-ghrelina desde la sangre. Una hipótesis es que la rF-ghrelina acceda al LCR a través de otra vía, como podrían ser los plexos coroideos, y luego fuera captada por los tanicitos desde el LCR. Para poner a prueba esta hipótesis se necesita de un análisis más detallado para lograr dilucidar la vía de entrada de la ghrelina a los tanicitos. Es importante mencionar que la distribución punteada de señal fluorescente observada con las inyecciones sistémicas de rF-ghrelina no nos permite determinar el porcentaje de células con marca respecto del total de células presentes, ya que la señal observada no puede asignarse con seguridad a una célula o a otra y por ello, en este caso, cuantificamos únicamente la intensidad de fluorescencia correspondiente a la región de tejido estudiada en conjunto.

Las medidas de ghrelina en el LCR de animales WT y deficientes del GHSR inyectados con ghrelina por vía SC indicarían que el GHSR es necesario para el acceso de la ghrelina al LCR. De la mano con este resultado, en los ratones deficientes del GHSR la rF-ghrelina plasmática no se internaliza en las células de la barrera sangre-LCR, lo cual sugiere que estas células cumplen un rol en el transporte de la hormona al LCR. Es importante aclarar que las extracciones de LCR para estos experimentos las realizamos desde la cisterna magna y no desde los ventrículos debido a las dificultades técnicas que esto conlleva. Si bien esperamos que la composición del LCR de estos compartimentos sea muy similar, la medida en la cisterna magna podría no reflejar estrictamente lo que ocurre en el sistema ventricular. Por ejemplo, la ghrelina accede al AP a través de sus capilares fenestrados y este CVO se encuentra adyacente al LCR del espacio subaracnoideo. A su vez el LCR del espacio subaracnoideo se comunica directamente con el de la cisterna magna. El AP se encuentra separada del LCR del espacio subaracnoideo por una capa de células de la pía madre, que están contactadas por uniones adherentes, lo que le da cierta permeabilidad a la barrera, permitiendo el pasaje de algunas moléculas de manera no selectiva. En este sentido, se ha descrito que la HRP inyectada por vía ICV atraviesa la capa de pía madre hacia el parénquima cerebral y también que la albúmina radio-iodinada inyectada en el parénquima alcanza el LCR del espacio subaracnoideo^{193,194}. De esta forma podríamos plantear la hipótesis de que la ghrelina accedería al AP a través de los capilares fenestrados y de allí difundiría de manera pasiva hacia el LCR del espacio subaracnoideo, alcanzando la cisterna magna. Para corroborar que nuestras observaciones se deben a un acceso de la ghrelina al LCR de los ventrículos cerebrales, en el futuro intentaremos determinar la concentración de ghrelina en el LCR del sistema ventricular en animales WT y deficientes del GHSR inyectados por vía SC con ghrelina.

Se ha descrito que los niveles de ghrelina plasmática aumentan aproximadamente 18 veces respecto del nivel basal en los animales WT sometidos a un protocolo de 7 días de restricción calórica¹⁸. En nuestras condiciones experimentales dicho protocolo aumentó la concentración de ghrelina en plasma al doble del nivel basal. El nivel de ghrelina en el LCR de estos animales bajo restricción calórica resultó indetectable. Cuando realizamos inyecciones por vía SC de ghrelina los niveles de la hormona en sangre fueron de aproximadamente 17 veces respecto al nivel basal, y este aumento de ghrelina en plasma produjo un aumento medible de ghrelina en el LCR. La baja concentración de ghrelina en plasma alcanzada con nuestro protocolo de restricción calórica podría ser una de las razones por las cuales no fuimos capaces de detectar la ghrelina en el LCR de estos animales, y no necesariamente descarta la posibilidad de que la ghrelina endógena acceda al LCR en situaciones de restricción calórica prolongada.

En este capítulo utilizamos un modelo *in vitro* de explantes de plexos coroideos provenientes de ratones WT o deficientes del GHSR y observamos que la cantidad de rF-ghrelina internalizada en los animales deficientes del GHSR fue menor que en los WT, al igual que lo que encontramos con las inyecciones por vía ICV. Sin embargo, el porcentaje de células epiteliales capaces de internalizar rF-

ghrelina entre ambos genotipos de ratones fue similar, a diferencia de lo que ocurrió cuando administramos la rF-ghrelina por vía ICV. Esta diferencia entre ambos métodos puede deberse a que la polaridad de las células epiteliales de los plexos coroideos se pierde cuando se extrae el tejido. En los explantes ambas caras de las células quedarían en contacto con el medio de incubación, aunque predécimos que la condición *ex vivo* es más parecida a las inyecciones por vía ICV que a las SC. Sin embargo, podrían producirse cambios en las células dados por la extracción y el protocolo experimental que generen las diferencias observadas en el número de células marcadas con rF-ghrelina. Otro posible abordaje experimental para estudiar la captación de ghrelina por las células de la barrera sangre-LCR sería realizar un cultivo primario de plexos coroideos utilizando el método de cultivo en membranas semipermeables, una interfase que separa dos compartimentos y permite el transporte de moléculas, pero no de las células, a través de ella. En el caso de los plexos coroideos, un compartimento correspondería a la superficie apical y el otro a la basal. Cuando el cultivo se encuentra en confluencia las células forman una barrera impermeable entre ambos compartimentos ya que las células epiteliales de los plexos coroideos están unidas entre sí por uniones estrechas. Este método de cultivo mejora la proliferación y supervivencia de las células, ya que contactan con los nutrientes del medio por ambas caras, y permitiría evaluar mejor los aspectos del transporte de ghrelina a través de ellas¹⁶⁵.

Los experimentos pre-incubando las células de los plexos coroideos con el JMV2959 indican que este ligando del GHSR afecta la internalización de la rF-ghrelina. Si bien la farmacología del JMV2959 es compleja, está descrito que este ligando, en concentraciones similares a las utilizadas en nuestros estudios, puede favorecer la permanencia del GHSR en la membrana de las células, lo cual podría aumentar la capacidad de las mismas para internalizar ghrelina¹⁹⁵. Es importante resaltar que el JMV2959 no cambió el número de células capaces de internalizar ghrelina, sino sólo la cantidad internalizada, lo cual es compatible con la hipótesis propuesta en relación a las diferentes poblaciones de células epiteliales con capacidad para internalizar ghrelina. Más allá de esta posible explicación, los resultados constituyen otro indicio de que las células de los plexos coroideos poseen GHSR y de que manipulando este sistema observamos diferencias en la internalización de rF-ghrelina.

Para estudiar si la internalización de la rF-ghrelina depende del GHSR también utilizamos cultivos primarios y secundarios de tanicitos de rata y ratón. Los cultivos primarios permiten estudiar tanicitos morfológicamente conservados, que pueden fotografiarse y analizarse de manera separada uno de otro. Los cultivos secundarios en monocapa permiten realizar experimentos que requieren gran cantidad de células, como son las medidas de fluorescencia en un fluorímetro o medidas de expresión génica. Los cultivos de rata mostraron que la presencia del JMV2959 no afecta la internalización de rF-ghrelina en los tanicitos, lo cual indicaría que el GHSR no es relevante para este proceso. Por otro lado, la internalización de rF-ghrelina fue similar en cultivos primarios de tanicitos de ratones WT y deficientes del GHSR. Los

cultivos de ratón tienen un rendimiento menor que los de rata, con menos tanicitos conservados morfológicamente. Además, se necesita un mayor número de animales para realizar el cultivo, ya que el tamaño de la región EM/ARC es marcadamente menor que en la rata. Debido a ello, en este trabajo de Tesis utilizamos principalmente cultivos primarios de tanicitos de rata, aunque para este experimento fue necesario realizarlo en ratón para poder utilizar el animal deficiente del GHSR. En conjunto, los resultados de los estudios *in vitro* de tanicitos de este capítulo nos indican que estas células son capaces de internalizar la rF-ghrelina de forma independiente del GHSR.

Las medidas de expresión del GHSR indicaron que los plexos coroideos de los ratones WT expresan el ARNm de GHSR y que los tanicitos no expresan el GHSR *in vivo* ni en cultivo. La expresión del GHSR en los plexos coroideos ya había sido descrita previamente¹⁹⁶. Está descrito que el 90% de las células que conforman los plexos coroideos corresponden a células epiteliales¹⁹⁷, por lo que es muy probable que la expresión del GHSR ocurra en dichas células, como lo sugiere también la morfología de las células que internalizan la rF-ghrelina. Por otro lado, estudios previos mostraron que las células endoteliales no expresan el GHSR¹⁹⁸. Debido a que los primers utilizados para realizar las medidas de qPCR en nuestros estudios son complementarios a una secuencia de ADNc compartida por el GHSR1a y el GHSR1b, no podemos asegurar que nuestras medidas indiquen la expresión de una u otra variante en los plexos coroideos. Está descrito que, en el caso del receptor de leptina, variantes cortas del mismo no poseen funciones de señalización, pero podrían estar implicadas en el transporte de la hormona a través de las células de los plexos coroideos^{199,200}. En este sentido podría hipotetizarse una función similar para el GHSR1b en el transporte de ghrelina. Sin embargo, se sabe que el GHSR1b no es capaz de unir ghrelina, por lo que esta hipótesis es improbable²².

En conjunto, los resultados de este capítulo nos permiten hipotetizar que las células de la barrera sangre-LCR internalizan la ghrelina desde la sangre en un proceso dependiente del GHSR y que podrían mediar su transporte hacia el LCR. Debido a que los tanicitos no expresan el GHSR, mientras que los plexos coroideos sí, hipotetizamos que serían estos últimos los encargados de realizar el transporte desde la sangre al LCR. Desde allí, los tanicitos podrían internalizar la hormona en un proceso independiente del GHSR, lo cual es compatible con la señal únicamente apical observada en estas células.

**CAPÍTULO 4: ESTUDIO DE LOS MECANISMOS MOLECULARES POR LOS
CUALES LA GHRELINA ES INTERNALIZADA EN LAS CÉLULAS DE LA
BARRERA SANGRE-LCR**

RESULTADOS

1. Estudio de los efectos de distintos inhibidores de la endocitosis en la internalización de ghrelina en las células de la barrera sangre-LCR utilizando una estrategia *in vitro*

Los resultados mostrados en los capítulos anteriores nos permiten hipotetizar que la ghrelina se internaliza en las células de la barrera sangre-LCR a través de un mecanismo endocítico. Con el objetivo de dilucidar los mecanismos moleculares por los cuales las células de la barrera incorporan la ghrelina realizamos estudios *in vitro* sobre explantes de plexos coroideos y cultivos de tanicitos de rata.

En el caso de los plexos coroideos, pre-incubamos los explantes a 37°C con vehículo (medio Hanks) solo o conteniendo un inhibidor de procesos de transporte intracelular (colchicina) o de la endocitosis mediada por clatrina (Pitstop 2). Los tiempos de pre-incubación fueron diferentes para cada inhibidor y se basaron en datos de bibliografía, siendo de 45 minutos para colchicina y de 30 minutos para Pitstop. Luego incubamos las células con vehículo o con rF-ghrelina 30 nM durante 15 minutos y procesamos los explantes como se describió anteriormente para su observación por microscopía de fluorescencia. Finalmente, tomamos microfotografías del tejido y sobre ellas cuantificamos el porcentaje de células positivas para rF-ghrelina y la intensidad de fluorescencia dentro de cada una de ellas. Los resultados de estas cuantificaciones mostraron que Pitstop disminuyó la internalización de rF-ghrelina en las células de los plexos coroideos, ya que encontramos un menor número de células positivas para el análogo y también menor intensidad de fluorescencia en las células que lo internalizaron. La colchicina, en cambio, no afectó el número de células capaces de internalizar la rF-ghrelina ni tampoco la intensidad de fluorescencia medida en ellas (**Figura 29 A-B**).

En el caso de los tanicitos, pre-incubamos las células en cultivo con vehículo (medio de cultivo) sólo o conteniendo colchicina, Pitstop 2, un inhibidor de la dinamina (Dyngo 4a) o de la endocitosis mediada por caveolina (metil β -ciclodextrina). De la misma forma que para los plexos coroideos, los tiempos de pre-incubación fueron diferentes para cada inhibidor y se basaron en datos de bibliografía, siendo de 45 minutos para colchicina y de 30 minutos para Pitstop, Dyngo y metil β -ciclodextrina. Luego incubamos las células con rF-ghrelina, de la misma forma que se describió previamente, durante 15 minutos. Por último, lavamos las células y las lisamos, colectando el lisado celular para medir la cantidad de fluorescencia presente en el interior de las células utilizando un fluorímetro.

Las cuantificaciones de fluorescencia en el lisado celular mostraron un aumento de los niveles de fluorescencia en las células pre-incubadas con vehículo e incubadas con rF-ghrelina, respecto a las incubadas con vehículo, como esperábamos debido a lo observado en los experimentos anteriores. Cuando las células fueron pre-incubadas con colchicina, Pitstop o Dyngo, y luego incubadas con rF-ghrelina, la cantidad de fluorescencia en el lisado celular fue significativamente menor que cuando las

células se pre-incubaron con vehículo, indicando que el proceso de internalización de ghrelina en las células disminuyó en presencia de estos inhibidores. En cambio, no encontramos diferencias en la cantidad de fluorescencia presente en el lisado celular luego de una pre-incubación con metil β -ciclodextrina, respecto de la condición de pre-incubación con vehículo, por lo que la presencia de un inhibidor de endocitosis mediada por caveolina no parece tener efecto en la internalización de rF-ghrelina en los tanicitos (**Figura 29C**).

Estos resultados nos permiten hipotetizar que la rF-ghrelina tanto en los plexos coroideos como en los tanicitos es internalizada mediante un proceso de endocitosis mediada por clatrina.

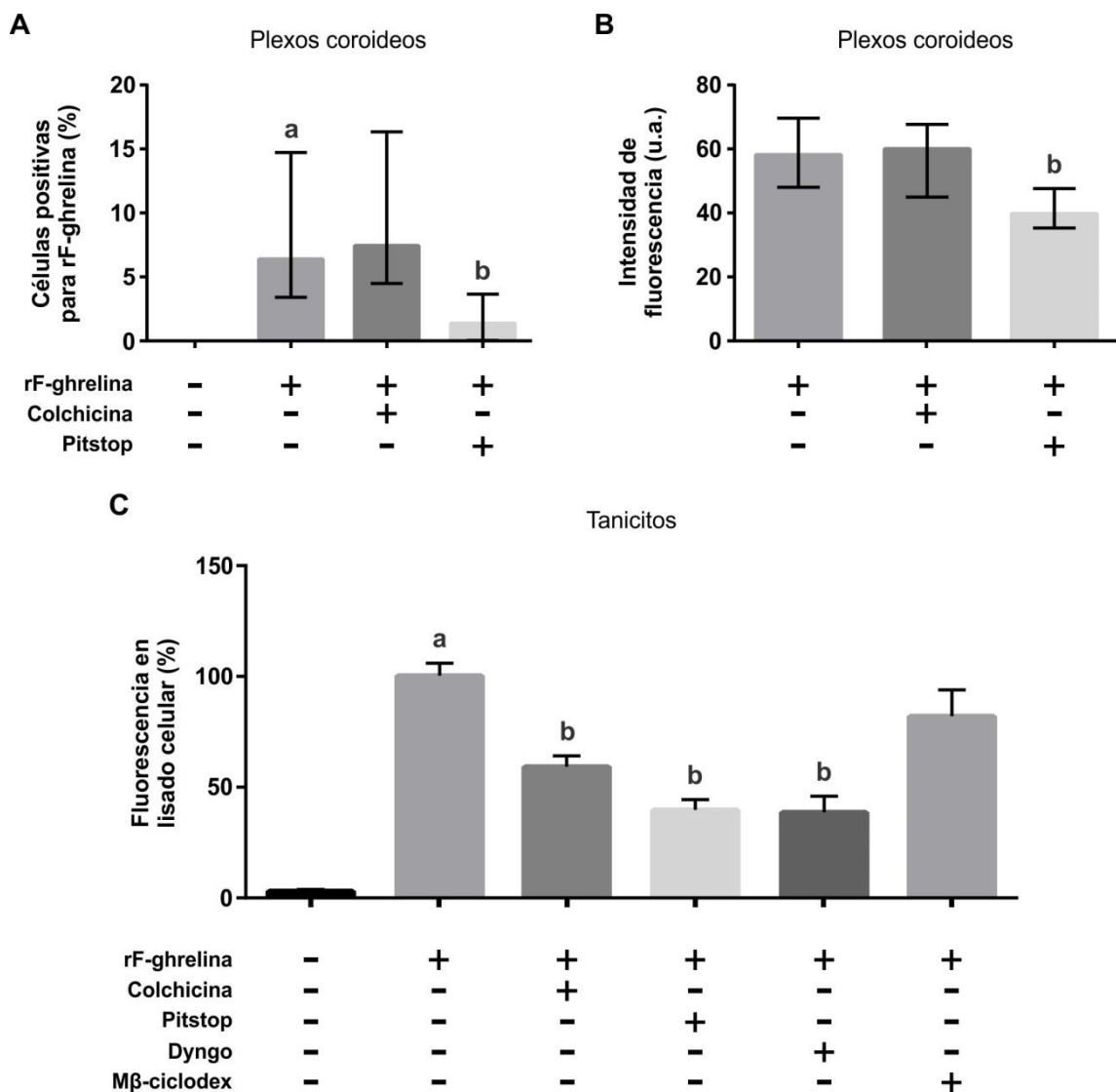


Figura 29. Efecto de inhibidores de endocitosis sobre la internalización de rF-ghrelina en las células de la barrera sangre-LCR *in vitro*. **A.** El gráfico de barras muestra el porcentaje de células que internalizan rF-ghrelina en los plexos coroideos, respecto del total de células presentes, en presencia (+) o ausencia (-) de inhibidores de endocitosis. **B.** El

gráfico de barras muestra la intensidad de fluorescencia en el interior de las células de los plexos coroideos consideradas positivas para rF-ghrelina, en presencia (+) o ausencia (-) de inhibidores de endocitosis. **C.** El gráfico de barras muestra el porcentaje de fluorescencia presente en el lisado celular respecto a la condición que contiene únicamente rF-ghrelina (*rF-ghrelina*), en presencia (+) o ausencia (-) de inhibidores de endocitosis. Los datos representan la mediana con el rango intercuartil (para A y B) o la media \pm SEM (para C) y fueron analizados mediante un test de Kruskal-Wallis, seguido del post test de Dunn o mediante ANOVA de una vía, seguido del post test de Turkey, según corresponde. a < 0,0001 respecto de la condición sin rF-ghrelina ni inhibidores; b < 0,001 respecto de la condición con rF-ghrelina sin inhibidores.

2. Estudio de los efectos de distintos inhibidores de la endocitosis en la internalización de ghrelina en las células de la barrera sangre-LCR utilizando una estrategia *in vivo*

Luego de realizar un *screening* de los efectos de los inhibidores de endocitosis mediante una estrategia *in vitro*, utilizamos una estrategia *in vivo* para estudiar el efecto tanto en los plexos coroideos como en los tanicitos de algunos de los inhibidores con los que habíamos visto efectos *in vitro*. Para ello, inyectamos ratones por vía ICV con vehículo solo o conteniendo colchicina o Pitstop y, luego de 300 o 60 minutos, respectivamente, los inyectamos también por vía ICV con F-ghrelina y los sacrificamos a los 15 minutos. Los tiempos utilizados para los inhibidores se basaron en pruebas piloto que realizamos previamente y en las cuales pudimos verificar la integridad celular a los tiempos utilizados. Cortamos los cerebros en secciones coronales, sobre las que realizamos una IHQ fluorescente contra fluoresceína y luego tomamos microfotografías de las secciones utilizando un microscopio de fluorescencia. Sobre las microfotografías realizamos cuantificaciones del porcentaje de células con señal IR para fluoresceína en los plexos coroideos y también de la intensidad de fluorescencia en dichas células y en el cuerpo celular y la prolongación de los tanicitos.

Los resultados de estos análisis mostraron una disminución del porcentaje de células IR para fluoresceína en los plexos coroideos de animales que habían sido pre-tratados con Pitstop y luego inyectados con F-ghrelina, en comparación con los animales pre-tratados con vehículo. En cambio, el porcentaje de células IR en los plexos coroideos no se modificó en los animales pre-tratados con colchicina (**Figura 30A**). Por otro lado, la intensidad de fluorescencia en las células de los plexos coroideos observada para los animales pre-tratados tanto con colchicina como con Pitstop se vio disminuida, respecto de los animales pre-tratados con vehículo (**Figura 30B**). En el cuerpo celular y en las prolongaciones de los tanicitos la intensidad de fluorescencia disminuyó en los animales pre-tratados con Pitstop. En los animales pre-tratados con colchicina, en cambio, no hubo diferencias en la intensidad de fluorescencia en el cuerpo celular de los tanicitos respecto a los animales pre-tratados con vehículo, mientras que, en las prolongaciones, la intensidad de fluorescencia fue menor aunque no estadísticamente significativo (**Figura 30 C,D**).

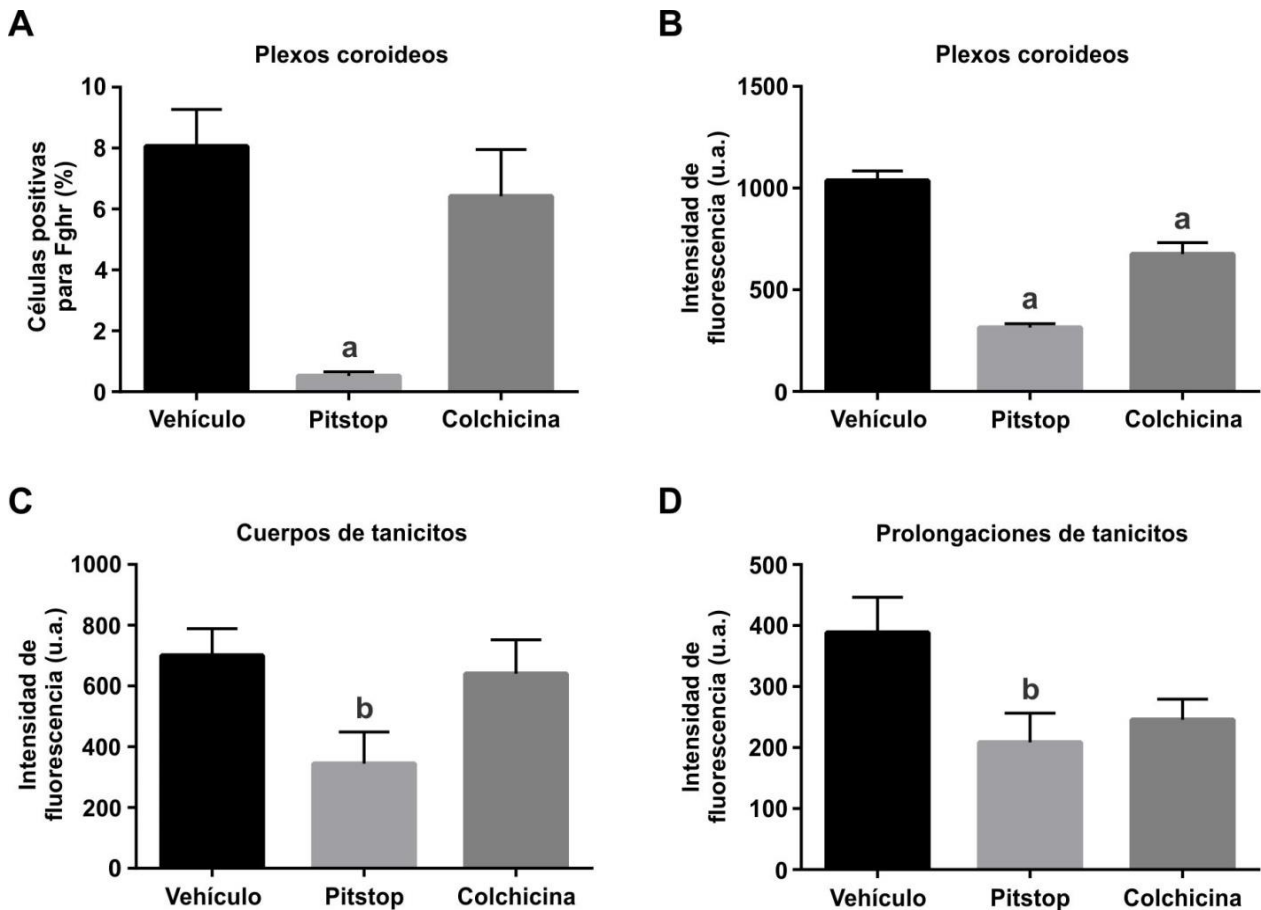


Figura 30. Efecto de inhibidores de endocitosis sobre la internalización de F-ghrelina en plexos coroideos y en tanicitos *in vivo*. Los gráficos de barras muestran las cuantificaciones del porcentaje de células IR para fluoresceína en los plexos coroideos (A) o de la intensidad de fluorescencia medida en las células de los plexos coroideos (B), en el cuerpo celular de los tanicitos β (C) o en sus prolongaciones (D). Los grupos experimentales consistieron en ratones WT inyectados con F-ghrelina por vía ICV, que previamente recibieron una inyección por vía ICV de vehículo, Pitstop o colchicina. Los datos representan la media \pm SEM y fueron analizados mediante un ANOVA de una vía, seguido del post test de Bonferroni. a < 0,001; b < 0,05 respecto de "Vehículo".

3. Análisis de la expresión de marcadores de endocitosis en los tanicitos hipotalámicos

Con el objetivo de obtener indicios adicionales de que la ghrelina puede internalizarse en los tanicitos a través de un mecanismo de endocitosis, realizamos dos experimentos diferentes basados en algunos de los resultados presentados en el capítulo 2 para el cultivo primario de tanicitos de rata.

En primer lugar, co-incubamos los cultivos de tanicitos con rF-ghrelina y fluoroesferas verdes, las cuales se internalizan por un proceso de endocitosis no selectivo. Este experimento mostró que la mayor parte de la señal roja correspondiente a la rF-ghrelina internalizada colocalizó con señal verde, tanto en el cuerpo celular como en la prolongación y el *endfeet* de los tanicitos (Figura 31A). Además, observamos presencia de señal roja sin verde y viceversa, es decir que la colocalización fue parcial.

En segundo lugar, realizamos experimentos en los cuales incubamos las células con rF-ghrelina por 15 minutos a 37°C y posteriormente realizamos una IHQ fluorescente contra Rab5A para marcar vesículas endocíticas. En este experimento pudimos observar que la mayor parte de las vesículas IR para Rab5A se localizaron principalmente en el cuerpo celular de los tanicitos. La rF-ghrelina se observó principalmente en vesículas IR para Rab5A, lo cual sugiere la presencia del análogo fluorescente en el interior de vesículas endocíticas tempranas en los tanicitos (**Figura 31B**).

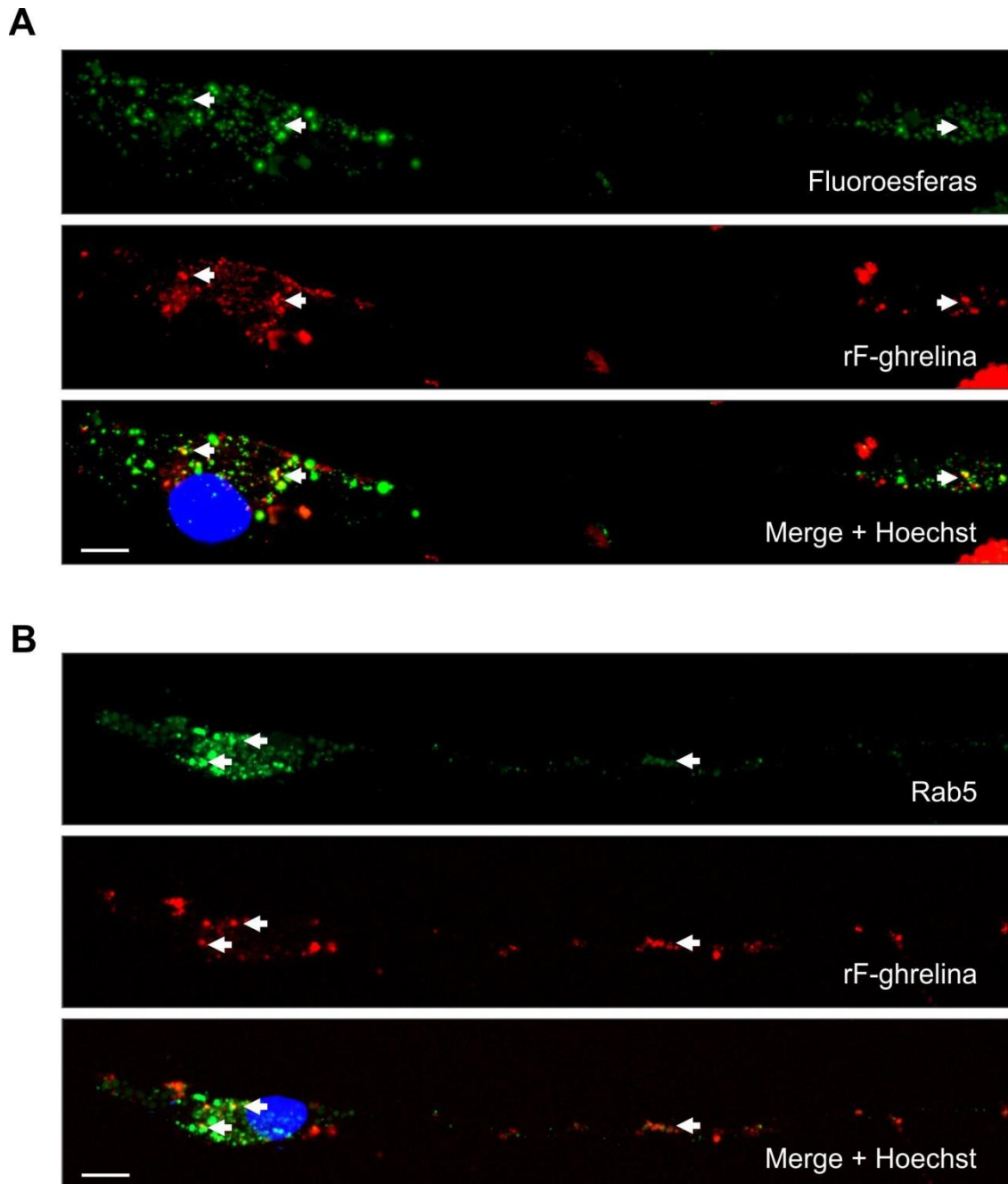


Figura 31. A. Colocalización de rF-ghrelina con fluorescentes en tanicitos en cultivo. Microfotografía fluorescente representativa de un tanicito en cultivo al día 7, co-incubado con rF-ghrelina (roja) y fluorescentes (verde) durante 15 min a 37°C. La tinción nuclear con Hoechst se observa en azul. Barra de escala: 10 μ M (63X). **B. Colocalización de**

rF-ghrelina con Rab5A en tanicitos en cultivo. Microfotografía fluorescente representativa de un tanicito en cultivo al día 7, incubado con rF-ghrelina (roja) durante 15 min a 37°C, al que se le realizó posteriormente una IHQ contra Rab5A (verde). La tinción nuclear con Hoechst se observa en azul. Barra de escala: 10 μ M (63X).

4. Estudio del proceso de liberación de la ghrelina internalizada en las células de la barrera sangre-LCR

Los estudios realizados hasta el momento no nos permiten determinar claramente si los tanicitos β internalizan la ghrelina por su lado apical o por su lado basal, correspondiente a la prolongación. Para tratar de distinguir entre estas posibilidades, utilizamos el cultivo primario de tanicitos de rata al día 7 y realizamos incubaciones con vehículo o con rF-ghrelina a dos tiempos diferentes. Luego lavamos las células, las fijamos y tomamos microfotografías con un microscopio de fluorescencia. Sobre estas microfotografías cuantificamos la intensidad de fluorescencia en tres regiones de las células: el cuerpo celular, la prolongación y la zona terminal o *endfeet*.

A los 5 minutos, la mayor parte de la fluorescencia se encontró en el cuerpo celular de los tanicitos, siendo mayor que en la condición control. En cambio, a este tiempo, las intensidades de fluorescencia en la prolongación y en el *endfeet* no fueron diferentes de la condición control. A los 15 minutos, la intensidad de fluorescencia en el cuerpo celular de los tanicitos fue mayor que en la condición control y no fue diferente de la condición de incubación durante 5 minutos. Sin embargo, a los 15 minutos, aumentó la intensidad de fluorescencia en la prolongación y en el *endfeet* de las células, siendo mayor que en la condición control y también mayor que en la condición de 5 minutos de incubación. Estos resultados sugieren que el avance de la ghrelina en el interior de los tanicitos se produce desde el cuerpo celular, en donde se estaría internalizando, hacia la prolongación y el *endfeet*. (**Figura 32**).

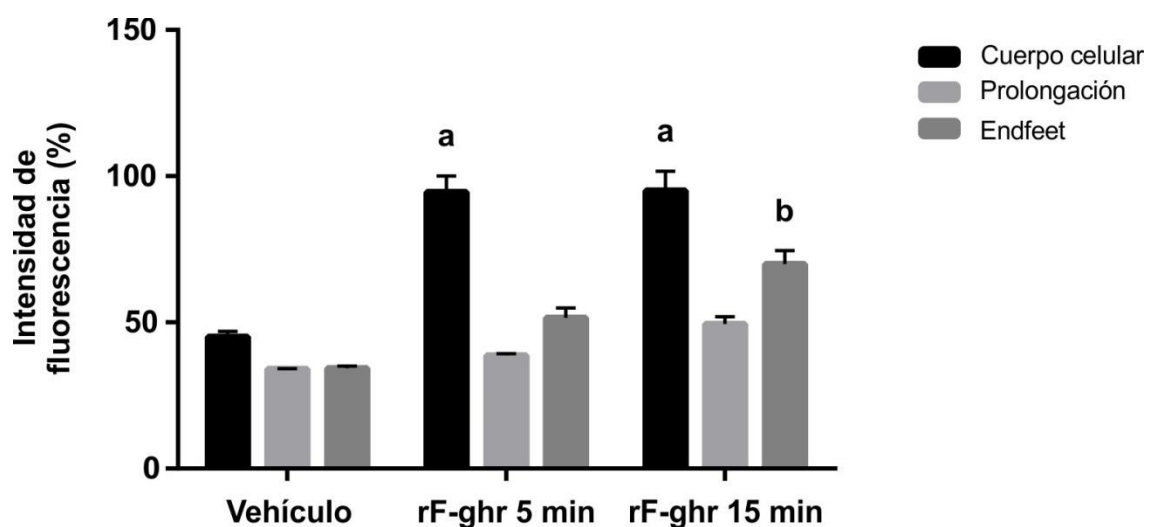


Figura 32. Avance de la señal fluorescente de rF-ghrelina en tanicitos en cultivo. El gráfico de barras muestra las cuantificaciones de la intensidad de fluorescencia en tanicitos en cultivo, incubados con vehículo solo o conteniendo rF-ghrelina durante 5 o 15 min. Se muestran las cuantificaciones para el cuerpo celular (barras negras), la prolongación (gris claro) y el endfeet (gris oscuro). Los datos representan la media \pm SEM y fueron analizados mediante un ANOVA de dos vías y un post test de Bonferroni. $a < 0,001$ y $b < 0,01$ respecto de los respectivos vehículos.

Para analizar si la ghrelina es excitada en las células de la barrera sangre-LCR realizamos experimentos de liberación de la rF-ghrelina al medio utilizando los explantes de plexos coroideos y los tanicitos en cultivo.

Para estudiar la exocitosis en los plexos coroideos, incubamos los explantes con rF-ghrelina de la misma forma explicada anteriormente durante 15 minutos (etapa de internalización) y, luego de lavar con medio, incubamos con medio fresco durante 15 minutos más (etapa de liberación). Luego, procesamos los explantes para la toma de microfotografías en un microscopio de fluorescencia y cuantificamos la intensidad de señal fluorescente en el tejido. Como control, utilizamos explantes de plexos coroideos que únicamente pasaron por la etapa de internalización, siendo fijados posteriormente. En este experimento observamos que la intensidad de fluorescencia correspondiente a la rF-ghrelina fue menor en los plexos coroideos a los que se les permitió la liberación, sugiriendo que parte de la ghrelina inicialmente internalizada fue excitada al medio (**Figura 33A**).

Para estudiar la exocitosis en los cultivos secundarios de tanicitos, incubamos las células con rF-ghrelina de la misma forma que describimos antes durante 15 minutos, lavamos las células con medio de cultivo a 37°C e incubamos con medio fresco durante otros 15 minutos. Luego, colectamos el sobrenadante, lavamos las células y las lisamos para obtener el lisado celular. Posteriormente determinamos la cantidad de fluorescencia presente en el lisado celular (lisado a los 30 min) y en el sobrenadante (sobrenadante a los 30 min) utilizando un fluorímetro como se describió antes, y las comparamos con células a las que sólo se les permitió la internalización (lisado a los 15 min). Aquí, observamos fluorescencia en el lisado a los 15 minutos, correspondiente a la cantidad de ghrelina internalizada en las células, que disminuyó en el lisado a los 30 minutos, correspondiente a la cantidad de ghrelina remanente en las células luego de su liberación. Por otro lado, en el sobrenadante de las células que pasaron por la etapa de liberación apareció señal fluorescente, debida a la rF-ghrelina liberada. Este experimento sugiere que los tanicitos pueden liberar parte de la rF-ghrelina que inicialmente internalizaron (**Figura 33B**).

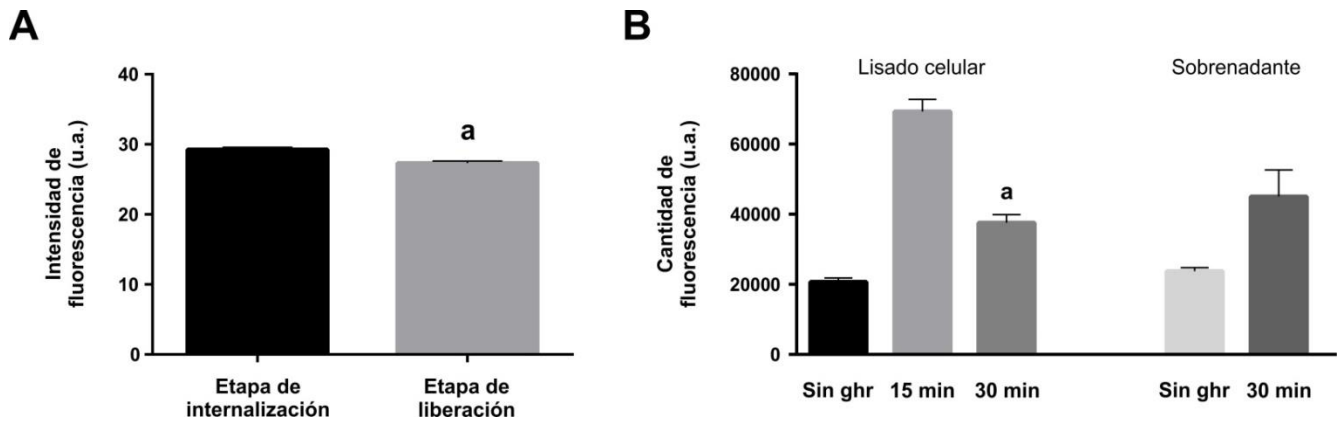


Figura 33. Liberación de rF-ghrelina al medio de cultivo. **A.** El gráfico de barras muestra las cuantificaciones de la intensidad de fluorescencia en los explantes de plexos coroideos. Los explantes fueron incubados con rF-ghrelina durante 15 min y luego fijados (etapa de internalización) o incubados con rF-ghrelina durante 15 min y luego incubados con medio fresco durante otros 15 min (etapa de liberación). **B.** El gráfico de barras muestra las cuantificaciones de la cantidad de fluorescencia en el lisado celular o en el sobrenadante de tanicitos en cultivo. Las células fueron incubadas con vehículo solo o conteniendo rF-ghrelina durante 15 min y luego se les colocó medio nuevo durante 15 min más para permitir la liberación de la rF-ghrelina al sobrenadante. Los datos representan la media \pm SEM y fueron analizados mediante t test (A) o ANOVA de una vía seguido de un post test de Bonferroni (B). $a < 0,001$ respecto de la “Etapa de internalización” (A) o de “Lisado celular 15 min” (B).

DISCUSIÓN

En este capítulo estudiamos los mecanismos por los cuales las células de la barrera sangre-LCR podrían internalizar y transportar la ghrelina. Con el objetivo de estudiar el proceso de transcitosis, analizamos en primero la etapa de endocitosis y luego la etapa de exocitosis.

Nuestros resultados sugieren que la rF-ghrelina se internaliza en las células epiteliales de los plexos coroideos a través de un proceso de endocitosis mediado por clatrina, ya que Pitstop disminuyó la internalización del análogo en estas células *in vitro* e *in vivo*. En apoyo de nuestras observaciones, está descrito que las células epiteliales de los plexos coroideos expresan una variedad de proteínas adaptadoras que intervienen en el proceso de endocitosis mediada por clatrina²⁰¹. Además, dado que en las células de los plexos coroideos la endocitosis de ghrelina parece depender del GHSR, la dependencia de clatrina se corresponde con la forma de endocitosis descrita para dicho receptor a través de β -arrestina. En los tanicitos, la internalización de rF-ghrelina también ocurriría a través de endocitosis mediada por clatrina, ya que Pitstop disminuyó la internalización del análogo en el cuerpo celular y en la prolongación de estas células, tanto en los experimentos *in vitro* como en los *in vivo*. Dyngo, que inhibe procesos de endocitosis mediados por clatrina o por caveolina, también disminuyó la internalización de rF-ghrelina en estas células *in vitro*. Por el contrario, la internalización de rF-ghrelina no parece producirse mediante endocitosis mediada por caveolina, ya que metil β -ciclodextrina no afectó la internalización del análogo en los tanicitos. En estudios anteriores, se ha descrito la presencia de vesículas IR para clatrina en cultivos de tanicitos, que colocalizan con FL-rF-ghrelina⁹⁹. Otro trabajo también mostró que los tanicitos β son IR para clatrina en el cuerpo celular, mientras que la proteína no se detecta en la prolongación ni en el *endfeet* de las células¹⁴⁰. Este mismo trabajo muestra que los tanicitos son capaces de internalizar WGA desde el LCR por su cara apical en un proceso de endocitosis mediado por clatrina. Es importante mencionar que en nuestros experimentos corroboramos la integridad celular de los plexos coroideos y de los tanicitos de los animales tratados con los inhibidores, a través de microscopía de contraste de fases y de una IHQ contra vimentina. Además, verificamos la integridad de los núcleos celulares a través de una tinción con Hoechst.

En los cultivos primarios de tanicitos detectamos vesículas endocíticas, IR para Rab5A, principalmente en el cuerpo celular. Rab5A es un marcador de vesículas endocíticas tempranas por lo que su presencia predominante en el cuerpo celular indicaría procesos de endocitosis cercanos a la cara apical de los tanicitos. Además, una subpoblación de las vesículas IR para Rab5A colocalizaron con rF-ghrelina, lo cual es un indicio de la capacidad de los tanicitos de internalizar el análogo a través de un proceso endocítico. Se ha descrito que Rab5A se asocia con vesículas recubiertas por clatrina¹²⁵, lo cual es otro

indicio de que la internalización de ghrelina en los tanicitos se produce por un mecanismo de endocitosis dependiente de clatrina. Se describió la presencia de vesículas IR para Rab4 en la prolongación y el *endfeet* de los tanicitos, las cuales corresponderían principalmente a vesículas de reciclaje, destinadas a ser exocitadas¹⁴⁰. Se ha descrito la presencia de Rab5 en las células epiteliales de los plexos coroideos^{201,202} y en los endosomas tempranos generados por la endocitosis del GHSR, lo cual apoya la hipótesis de que la ghrelina podría internalizarse en estas células a través del GHSR. También se conoce que las células de los plexos coroideos expresan Rab4¹⁴⁰, por lo que también podríamos hipotetizar que en estas células ocurren procesos de transcitosis mediados por clatrina.

La colocalización de las fluoroesferas con rF-ghrelina en los tanicitos es un indicio adicional de la capacidad de estas células de internalizar la ghrelina por endocitosis. Las fluoroesferas se internalizan en las células por un mecanismo de endocitosis no selectivo mediado por clatrina¹⁹¹. Dado que los tanicitos no expresan el GHSR, una posibilidad es que la internalización de ghrelina se produzca a través de una endocitosis de tipo adsorptiva mediada por clatrina. Como se explicó en la Introducción, en la endocitosis de tipo adsorptiva las moléculas se unen a una región de la membrana celular por interacción electrostática y es un proceso poco selectivo que frecuentemente ocurre por un mecanismo mediado por clatrina²⁰³. La membrana plasmática de las células endoteliales de la barrera hematoencefálica posee cargas negativas que permiten la unión de moléculas cargadas positivamente y también se sabe que el lado extracelular de la membrana plasmática a ser endocitada por los mecanismos dependientes de clatrina está cargado negativamente, lo cual favorece la unión de moléculas con carga positiva, como sería el caso de la ghrelina y sus análogos^{203,204}.

Es importante aclarar que en nuestros experimentos de inmuno-fluorescencia *in vitro* observamos indicios de colocalización de la rF-ghrelina con Rab5A o con las fluoroesferas, pero no podemos afirmar que efectivamente ambas moléculas estén en el mismo compartimento intracelular. Nuestros resultados se basan en imágenes de fluorescencia tomadas con un microscopio que posee un módulo de iluminación estructurada Apotome, el cual nos permite realizar reconstrucciones de microfotografías de distintos planos en el eje Z. Esto nos permite analizar las células tridimensionalmente y asegurar, por ejemplo, que las señales observadas se encuentran en el interior de las células y no en su superficie. Sin embargo, el límite de resolución de este microscopio es de ~300 nm, para el objetivo utilizado, dimensiones que son mayores que el tamaño que poseen las vesículas endocíticas (100-250 nm de diámetro¹⁴⁰). Debido a ello, no podemos asegurar la colocalización de las distintas moléculas en una misma vesícula endocítica. Para corroborar que ambas moléculas se encuentran en la misma vesícula se debería utilizar otro método, como la microscopía electrónica.

Las células de la barrera sangre-LCR serían capaces de transportar intracelularmente la rF-ghrelina. Para estudiar esto realizamos experimentos con colchicina, que inhibe la polimerización de los microtúbulos afectando los procesos de transporte intracelular. En los experimentos *in vitro* la colchicina disminuyó la cantidad de rF-ghrelina internalizada por los tanicitos, mientras que *in vivo* disminuyó la cantidad del análogo en los plexos coroideos y mostró una tendencia a disminuir la presencia del mismo en las prolongaciones de los tanicitos, sin afectar la internalización en el cuerpo celular. Además, con el cultivo primario de tanicitos observamos que cuando se incuban las células con rF-ghrelina, la marca fluorescente de la molécula se encuentra a tiempos muy cortos (5 min) únicamente en el cuerpo celular, mientras que a tiempos más largos (15 min) se la detecta también en el *endfeet*. Este experimento nos sugiere que el avance de la ghrelina en los tanicitos es del polo apical al basal y no en sentido contrario, al menos en nuestras condiciones en cultivo. Sin embargo, no podemos descartar que los tanicitos también sean capaces de internalizar la rF-ghrelina desde sus *endfeet* de manera más lenta. Previamente Peruzzo y colaboradores describieron la capacidad de los tanicitos para internalizar WGA desde el LCR del tercer ventrículo y transportarlo hacia los *endfeet*, ya que encontraban la molécula exclusivamente en el cuerpo de los tanicitos a tiempos cortos mientras que a tiempos más largos avanzaba hacia la prolongación y la zona terminal¹⁴⁰. Además, la hipótesis de que los tanicitos internalizan la ghrelina por su cara apical está de acuerdo con la presencia de Rab5A principalmente en el cuerpo celular y no en la prolongación o en el *endfeet* y con la presencia de clatrina colocalizando con FL-rF-ghrelina en la misma zona de las células. Por otro lado, la colchicina *in vivo* mostró una tendencia a disminuir la cantidad de rF-ghrelina en las prolongaciones, pero no así en el cuerpo celular, contribuyendo a la hipótesis del transporte en dirección apical-basal.

Finalmente, estudiamos el proceso de exocitosis de la ghrelina en las células de la barrera sangre-LCR. Estos experimentos sugieren que dichas células tienen la capacidad de liberar al medio de cultivo la ghrelina previamente internalizada. En estos experimentos no verificamos la integridad de la rF-ghrelina liberada, lo cual es importante para descartar que la molécula liberada sea un fragmento más corto del péptido o incluso únicamente el fluoróforo. Estos experimentos planeamos realizarlos en el futuro, a través de medidas del sobrenadante en un espectrómetro de masas para verificar que la molécula se encuentre intacta.

DISCUSIÓN GENERAL

Durante este trabajo de Tesis estudiamos los posibles mecanismos por los cuales la ghrelina podría acceder a sus blancos en el cerebro. En particular, nos centramos en el estudio del transporte de la hormona a través de la barrera sangre-LCR, formada por los plexos coroideos y los tanicitos hipotalámicos. Los resultados nos permitieron caracterizar dicho transporte y su dependencia con el GHSR, a través de la utilización de técnicas *in vivo* e *in vitro*. Dado que la ghrelina se produce principalmente a nivel del estómago, entender la forma en la que esta hormona accede al cerebro es esencial para los estudios del sistema de ghrelina y para la interpretación de sus resultados.

Existen distintas vías por las cuales la ghrelina podría acceder al cerebro y la vía predominante parece depender de los niveles alcanzados por la hormona en sangre. Se puede hipotetizar que las fluctuaciones pequeñas en los niveles de ghrelina en sangre que se dan en condiciones de alimentación normal, son detectadas principalmente por el ARC y el AP, que son los núcleos que se encuentran más expuestos a las moléculas en circulación. Los incrementos mayores en los niveles plasmáticos de ghrelina, como los que pueden darse en situaciones de restricción calórica prolongada (semanas) o en algunas patologías, generarían el transporte de ghrelina hasta el LCR, desde donde podría acceder a núcleos alejados de los CVOs. Además, es posible que los sistemas de transporte de la ghrelina al cerebro dependan del estado metabólico y sean plásticos para adaptarse a distintas condiciones fisiológicas. En apoyo de esta hipótesis, se ha mostrado que la permeabilidad de los capilares fenestrados de la región EM/ARC ventromedial aumenta durante el ayuno, provocando un aumento en la llegada de moléculas circulantes¹⁰⁰.

Aspectos técnicos y metodológicos:

Los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis deben interpretarse en función de las características del sistema biológico en estudio. Por ejemplo, la vida media de la ghrelina en sangre es de aproximadamente 10 minutos y esto tiene implicancias en los resultados experimentales. En particular, todas las inyecciones sistémicas de ghrelina fueron realizadas en un bolo único, lo cual induce un aumento transitorio brusco en los niveles plasmáticos de la hormona. La dosis de 60 pmol/g de peso corporal aumenta los niveles plasmáticos de ghrelina al doble del nivel basal, lo cual es similar a lo que se alcanza en ratones ayunados por 12-24 horas, en protocolos de restricción calórica cortos o luego de estímulos estresantes^{52,192,205}. En humanos, los niveles plasmáticos de ghrelina también aumentan al doble del nivel basal durante el ayuno nocturno y antes de las comidas¹¹. Por lo tanto, la administración de esta dosis de ghrelina simula situaciones fisiológicas que pueden producirse habitualmente en roedores o humanos. Por otro lado, las dosis de 300 pmol/g y 1200 pmol/g de peso corporal generan aumentos suprafisiológicos de ghrelina. La dosis de 300 pmol/g aumenta los niveles de ghrelina en plasma aproximadamente 17 veces respecto del valor basal. Tales niveles de ghrelina en sangre se alcanzan sólo

en condiciones de déficit energéticos extremos, como una restricción calórica prolongada, o en situaciones patológicas¹⁸. Dado que las maniobras experimentales utilizadas sólo imitan transitoriamente un aumento plasmático de ghrelina que luego disminuye bruscamente, es difícil saber si el requerimiento de altas dosis de los análogos fluorescentes para poder visualizarlos en el cerebro es debido a la naturaleza transitoria de este aumento o si es un indicativo de que su captación por las células de la barrera sangre-LCR sólo se observa a concentraciones plasmáticas muy altas. Para distinguir entre estas dos alternativas podrían usarse estrategias experimentales que logren infusiones continuas de dosis pequeñas de ghrelina durante un período de tiempo prolongado o que de algún modo imiten los perfiles endógenos de los niveles de ghrelina de forma más precisa. En nuestro conocimiento, no hay trabajos a la fecha en los que se estudie la accesibilidad de la ghrelina al cerebro utilizando niveles fisiológicos de la hormona, sino que por el contrario los estudios de otros autores, mencionados en esta Tesis, utilizaron dosis similares o mayores que las utilizadas en este trabajo^{33,99}. En dichos trabajos los análogos fluorescentes se administraron por vía IV. Las inyecciones IV de ghrelina generarían aumentos plasmáticos de ghrelina más rápidos y de mayor magnitud que las inyecciones SC, pero con un decaimiento más rápido de las concentraciones de la hormona en sangre.

En este trabajo utilizamos diferentes análogos fluorescentes de ghrelina para distinguir la ghrelina exógena de la endógena y también debido a que estas moléculas generan una señal más robusta que la IHQ contra ghrelina nativa. Los análogos F-ghrelina y rF-ghrelina consisten en una versión más corta de la ghrelina (de 19 aminoácidos en lugar de 28) a la cual se le adiciona un grupo fluorescente en el extremo C-terminal. La región N-terminal no se modifica, ya que es esencial para la unión al GHSR; de hecho los análogos fluorescentes de ghrelina muestran el mismo perfil de unión al GHSR que la ghrelina nativa y mantienen la bioactividad^{42,83,84}. Sin embargo, no podemos descartar que la modificación C-terminal con el fluoróforo afecte de algún modo la accesibilidad de los análogos marcados al cerebro. Una ventaja de estos análogos es que son más estables que la hormona nativa debido a que el grupo octanoilo en la Ser3 se encuentra unido por un enlace amida en lugar de un enlace éster, lo cual lo hace resistente a las esterazas plasmáticas. La utilización de análogos fluorescentes nos permitió realizar estudios neuroanatómicos precisos y estimar la cantidad de los mismos en ciertas regiones del cerebro por cuantificación directa de la fluorescencia. Además de nuestro grupo, otros grupos también han utilizado variantes fluorescentes de la ghrelina, demostrando su utilidad en el estudio de las vías de transporte de la hormona al cerebro^{33,99}. Sin embargo, debido a que la detección de los análogos fluorescentes de ghrelina en el cerebro del ratón requiere la administración sistémica de altas dosis de los mismos, las condiciones experimentales utilizadas podrían saturar los mecanismos de transporte estudiados y alterar la accesibilidad de la hormona en algunas regiones del cerebro. En el primer capítulo de este trabajo utilizamos la F-ghrelina, que mostró ser útil para nuestros estudios. En los capítulos siguientes utilizamos

principalmente la rF-ghrelina ya que el fluoróforo Dy647 es más estable que la fluoresceína y nos permite la detección directa por microscopía de fluorescencia sin necesidad de realizar una IHQ. Además, el tejido cerebral y las células en cultivo poseen menos autofluorescencia en la región del espectro correspondiente al rojo lejano, donde emite el Dy647, por lo que mejora sustancialmente la relación señal/ruido. Otros autores han utilizado análogos radioactivos de la ghrelina, la cual se marca con I^{131} , lo cual produce modificaciones menores en la estructura y en el tamaño de la molécula. Las técnicas radiométricas permiten la utilización de dosis de ghrelina más bajas que las utilizadas en esta Tesis debido a que la radioactividad puede detectarse a muy bajos niveles. Sin embargo, los estudios que utilizan análogos radioactivos son más costosos, conllevan mayores medidas de seguridad y carecen de la resolución espacial necesaria para los estudios neuroanatómicos realizados en este trabajo.

La utilización de los sistemas *in vitro* descritos en este trabajo de Tesis posee algunas ventajas, como por ejemplo permitir la realización de experimentos preliminares de *screening* de drogas o la realización de experimentos a temperaturas no fisiológicas como 4°C. También nos permitieron estudiar los procesos de liberación de ghrelina al medio de cultivo, lo cual no es posible de realizar *in vivo*. Por otro lado, en los experimentos con animales no conocemos las concentraciones efectivas de inhibidores o de ghrelina a las que quedan expuestas las células de la barrera, debido al rápido recambio del LCR y a otros factores que no podemos controlar, como la unión de ghrelina por otras células diferentes a las estudiadas. Los experimentos en cultivo nos permitieron también controlar los tiempos exactos de incubación con los análogos de ghrelina. Es decir que el uso de técnicas *in vitro* nos permitió controlar distintos factores experimentales de manera más estricta y caracterizar mejor el sistema en estudio.

En este trabajo de Tesis utilizamos ratones como modelo experimental. Dentro de los modelos animales, los ratones son ampliamente utilizados debido a que comparten parte de su fisiología con los humanos y en particular, el sistema de ghrelina y GHSR es similar en ambas especies. Además, los ratones se encuentran muy bien caracterizados genéticamente, son fácilmente manipulables, poseen períodos gestacionales cortos y alcanzan la adultez en pocas semanas, lo cual es ventajoso para los tiempos experimentales. Otra ventaja es la posibilidad de utilizar ratones modificados genéticamente, como es el caso del ratón deficiente del GHSR utilizado en este trabajo. Este modelo de ratón constituye una valiosa herramienta para el estudio del sistema de ghrelina/GHSR y ha sido validado en distintos trabajos^{52,206}. Sin embargo, una desventaja que presenta este modelo es que la expresión del GHSR se encuentra bloqueada por un casete de bloqueo de la transcripción, pero no es un modelo *knock-out* de GHSR, por lo que no podemos descartar que se expresen niveles bajos del ARNm, que no sean detectables con nuestros métodos de medida. Cuánto del conocimiento sobre el sistema de ghrelina generado en ratones es extensible a la fisiología en humanos es actualmente desconocido. En nuestro conocimiento, la accesibilidad de ghrelina al cerebro no fue estudiada en humanos. La ghrelina en humanos parece ser

transportada a través de la barrera sangre-LCR, ya que la hormona está presente en el LCR de humanos y su concentración varía con el estado fisiológico²⁰⁷. En los estudios realizados en humanos se utilizan dosis efectivas mucho menores que en los ratones, lo cual sugiere que podría haber diferencias en los mecanismos de accesibilidad de la hormona al cerebro entre humanos y roedores.

Aspectos conceptuales:

En nuestro conocimiento, al iniciarse este trabajo de Tesis Doctoral existía un sólo trabajo que mostraba evidencias directas de la accesibilidad de la ghrelina al cerebro a través de la barrera sangre-LCR⁹⁹.

El conjunto de resultados obtenidos en este trabajo nos permite plantear un nuevo modelo para interpretar cómo la ghrelina plasmática accede al cerebro. Dicho modelo indica que la ghrelina plasmática en condiciones basales, accedería principalmente al ARC ventromedial a través de los capilares fenestrados que se extienden desde la EM. Cuando los niveles de ghrelina en sangre se elevan, como podría ser en condiciones de balance energético negativo crónicas o condiciones patológicas, la ghrelina podría acceder al LCR de manera específica por los plexos coroideos, a través de una endocitosis dependiente del GHSR y mediada por clatrina (**Figura 34 1,2**). Una vez en el LCR, la ghrelina podría difundir hacia zonas periventriculares del parénquima cerebral debido a la presencia de las células ependimarias que forman una barrera permeable al pasaje paracelular de algunas moléculas. En cambio, la ghrelina no difundiría libremente al parénquima ventral del hipotálamo, a nivel del ARC, sino que sería transportada por los tanicitos β desde su lado apical al basal. De esta forma, la ghrelina accedería más lentamente a las regiones del ARC dorso-laterales, a las que no accede de manera rápida a través de los capilares fenestrados (**Figura 34 3**). Por otro lado, la ghrelina en el LCR sería transportada por los tanicitos β en el sentido apical-basal hacia la sangre presente en los capilares fenestrados de la EM. Estos tanicitos actuarían así como un sistema de depuramiento del LCR, realizando un transporte no selectivo, independiente del GHSR y a través de una endocitosis mediada por clatrina, que posiblemente sería de tipo adsorptiva debido a que la ghrelina presenta carga netamente positiva (**Figura 34 4**). En los animales deficientes del GHSR, la ghrelina no sería internalizada por los plexos coroideos, por lo que no estaría disponible en el LCR del tercer ventrículo para ser captada por los tanicitos.

Es interesante mencionar que el sistema de ghrelina/GHSR podría ejercer efectos en el cerebro independientes de la ghrelina circulante, debido a la alta actividad constitutiva que posee el receptor. Se ha mostrado que el GHSR puede señalizar con ~50% de su actividad máxima en ausencia de ghrelina, en condiciones *in vitro*²⁴. Observaciones realizadas en personas que poseen una mutación espontánea del GHSR que selectivamente elimina la actividad constitutiva, pero no la evocada, y en ratones con dicha mutación, sugieren que la actividad constitutiva juega un importante rol *in vivo*^{17,208,209}. Adicionalmente, el

GHSR es capaz de heterodimerizar con otros GPCRs para modular su señalización²¹⁰, lo cual también podría mediar efectos de forma independiente de ghrelina. Otra alternativa es que la ghrelina podría ejercer sus efectos a nivel central vía su acción en las fibras aferentes vagales, derivadas de neuronas en el ganglio nodoso, aunque esto es hoy en día motivo de controversias^{205,211}. Por último, la ghrelina desacilada es más estable, constituye un porcentaje mayor de ghrelina en plasma que la acilada y se ha descrito que puede ingresar al cerebro en mayores cantidades que la ghrelina acilada⁶⁹. Por ello, no podemos descartar la posibilidad de que la ghrelina ingrese al cerebro en su forma desacilada, a través de la barrera hematoencefálica o de la barrera sangre-LCR y allí se produzca la adición del grupo octanoílo. A favor de esta hipótesis, se ha encontrado el transcripto de la enzima GOAT en el cerebro y también se ha demostrado la presencia de esta enzima en circulación en roedores^{212,213}.

Es importante aclarar que en nuestros estudios no pudimos medir ghrelina en el LCR de ratones alimentados *ad libitum* o sometidos a una restricción calórica, de manera que no es evidente en qué condiciones fisiológicas o fisiopatológicas adquiere relevancia el acceso de la ghrelina al LCR. Igualmente, consideramos que es relevante conocer con precisión los mecanismos por los cuales la ghrelina es transportada al cerebro para luego facilitar su manipulación farmacológica con fines terapéuticos. Por ejemplo, facilitar el transporte de la ghrelina hacia el LCR podría ser de interés terapéutico en casos de pacientes en los que se necesite aumentar los efectos de la hormona, como es el caso de los pacientes con caquexia a causa de enfermedades crónicas. En estos pacientes se produce un importante deterioro corporal a causa de la anorexia y el descenso de peso, que aumenta la mortalidad de la enfermedad. Está descrito que en estos pacientes los niveles de ghrelina en sangre se encuentran aumentados y que se necesitan dosis mucho mayores de ghrelina exógena para observar efectos que las necesarias en personas sanas²¹⁴. En casos como este, un aumento en la accesibilidad de la ghrelina al cerebro podría ser una alternativa de tratamiento eficaz.

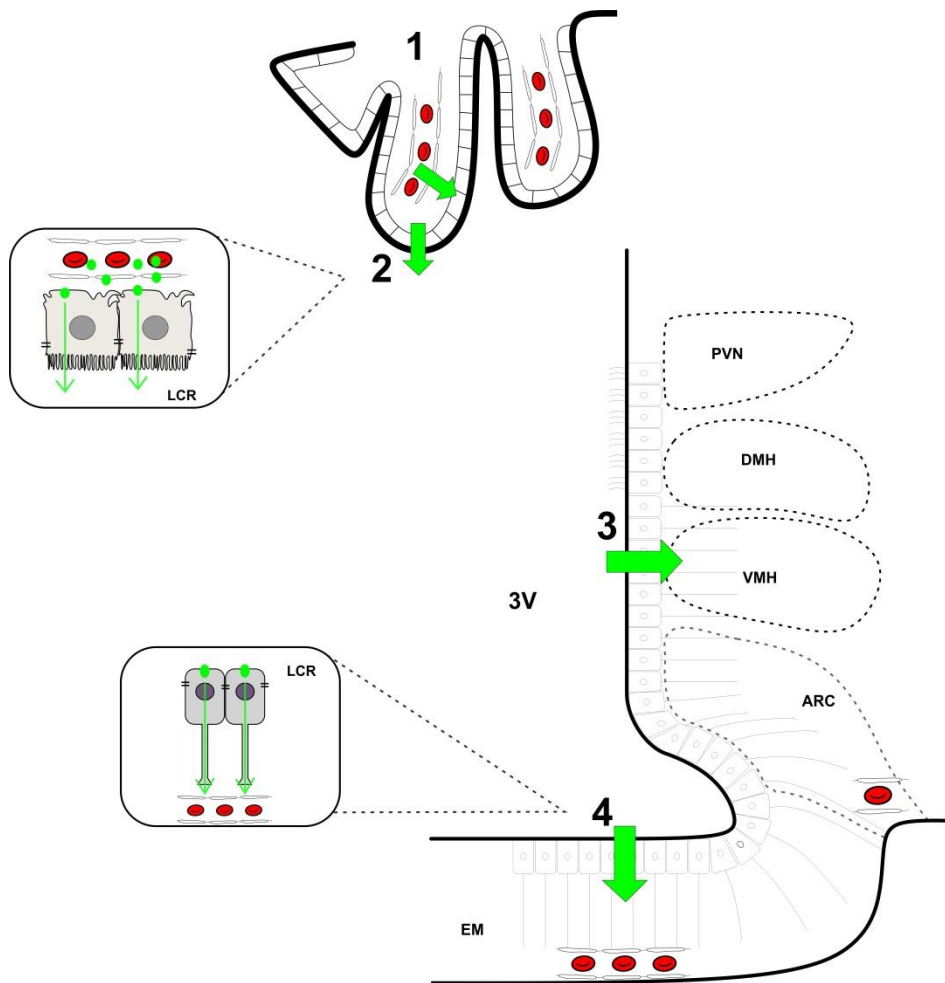


Figura 34. Modelo planteado. 1- La ghrelina plasmática atraviesa los capilares fenestrados de los plexos coroideos hacia el espacio perivascular. 2- La ghrelina es internalizada por las células epiteliales de los plexos coroideos por endocitosis mediada por clatrina, de forma dependiente del GHSR y es transportada al LCR. 3- La ghrelina accede desde el LCR al parénquima cerebral. 4- Los tanicitos internalizan la ghrelina presente en el LCR por endocitosis adsorptiva desde su cara apical, de forma dependiente de clatrina e independiente del GHSR, y la transportan hacia la sangre presente en los capilares de la EM.

CONCLUSIONES

- Las células de los plexos coroideos internalizan la ghrelina presente tanto en el LCR como en la sangre.
- Los tanicitos β probablemente internalizan únicamente la ghrelina presente en el LCR.
- La ghrelina plasmática accede al LCR en forma dependiente del GHSR.
- Los plexos coroideos internalizan la ghrelina plasmática en un proceso dependiente del GHSR.
- Los tanicitos β internalizan la ghrelina presente en el LCR en un proceso independiente del GHSR.
- Las células de la barrera sangre-LCR internalizan la ghrelina a través de un proceso de endocitosis mediada por clatrina.
- Los tanicitos en cultivo transportan la ghrelina desde su cara apical (cuerpo celular) hacia la basal (*endfeet*).
- Las células de la barrera sangre-LCR *in vitro* son capaces de liberar la ghrelina internalizada al medio.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kojima, M. *et al.* Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* **402**, 656–660 (1999).
2. Kojima, M. & Kangawa, K. Ghrelin: Structure and Function. *Physiological Reviews* **85**, 495–522 (2005).
3. Date, Y. *et al.* The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology* **123**, 1120–1128 (2002).
4. Goldstein, J. L. *et al.* Surviving starvation: essential role of the ghrelin-growth hormone axis. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **76**, 121–127 (2011).
5. Yang, J., Brown, M. S., Liang, G., Grishin, N. V. & Goldstein, J. L. Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone. *Cell* **132**, 387–396 (2008).
6. Fernandez, G. *et al.* Des-Acyl Ghrelin Directly Targets the Arcuate Nucleus in a Ghrelin-Receptor Independent Manner and Impairs the Orexigenic Effect of Ghrelin. *J. Neuroendocrinol.* **28**, 12349 (2016).
7. Hosoda, H., Kojima, M., Matsuo, H. & Kangawa, K. Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **279**, 909–913 (2000).
8. Müller, T. D. *et al.* Ghrelin. *Mol Metab* **4**, 437–460 (2015).
9. Zhang, W., Chai, B., Li, J., Wang, H. & Mulholland, M. W. Effect of des-acyl ghrelin on adiposity and glucose metabolism. *Endocrinology* **149**, 4710–4716 (2008).
10. Patterson, M., Murphy, K. G., le Roux, C. W., Ghatei, M. A. & Bloom, S. R. Characterization of ghrelin-like immunoreactivity in human plasma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **90**, 2205–2211 (2005).
11. Cummings, D. E. Ghrelin and the short- and long-term regulation of appetite and body weight. *Physiol. Behav.* **89**, 71–84 (2006).
12. 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.* **86**, 4753–4758 (2001).
13. Schalla, M. A. & Stengel, A. The Role of Ghrelin in Anorexia Nervosa. *Int J Mol Sci* **19**, (2018).
14. Shimizu, Y. *et al.* Increased plasma ghrelin level in lung cancer cachexia. *Clin. Cancer Res.* **9**, 774–778 (2003).
15. Bodosi, B. *et al.* Rhythms of ghrelin, leptin, and sleep in rats: effects of the normal diurnal cycle, restricted feeding, and sleep deprivation. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **287**, R1071-1079 (2004).
16. Murakami, N. *et al.* Role for central ghrelin in food intake and secretion profile of stomach ghrelin in rats. *J. Endocrinol.* **174**, 283–288 (2002).
17. Fernandez, G. *et al.* Evidence supporting a role for constitutive ghrelin receptor signaling in fasting-induced hyperphagia in male mice. *Endocrinology* (2017) doi:10.1210/en.2017-03101.
18. Zhao, T.-J. *et al.* Ghrelin O-acyltransferase (GOAT) is essential for growth hormone-mediated survival of calorie-restricted mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 7467–7472 (2010).
19. Akamizu, T. *et al.* Pharmacokinetics, safety, and endocrine and appetite effects of ghrelin administration in young healthy subjects. *Eur. J. Endocrinol.* **150**, 447–455 (2004).
20. De Vriese, C., Hacquebard, M., Gregoire, F., Carpentier, Y. & Delporte, C. Ghrelin interacts with human plasma lipoproteins. *Endocrinology* **148**, 2355–2362 (2007).
21. Lufitano, D. *et al.* Ghrelin binding to serum albumin and its biological impact. *Mol. Cell. Endocrinol.* **436**, 130–140 (2016).
22. Howard, A. D. *et al.* A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science* **273**, 974–977 (1996).
23. Zigman, J. M., Jones, J. E., Lee, C. E., Saper, C. B. & Elmquist, J. K. Expression of ghrelin receptor mRNA in the rat and the mouse brain. *J. Comp. Neurol.* **494**, 528–548 (2006).

24. Damian, M. *et al.* High constitutive activity is an intrinsic feature of ghrelin receptor protein: a study with a functional monomeric GHS-R1a receptor reconstituted in lipid discs. *J. Biol. Chem.* **287**, 3630–3641 (2012).
25. Camiña, J. P., Lodeiro, M., Ischenko, O., Martini, A. C. & Casanueva, F. F. Stimulation by ghrelin of p42/p44 mitogen-activated protein kinase through the GHS-R1a receptor: role of G-proteins and beta-arrestins. *J. Cell. Physiol.* **213**, 187–200 (2007).
26. Wellman, M. & Abizaid, A. Growth Hormone Secretagogue Receptor Dimers: A New Pharmacological Target. *eNeuro* **2**, (2015).
27. Cabral, A. *et al.* Circulating Ghrelin Acts on GABA Neurons of the Area Postrema and Mediates Gastric Emptying in Male Mice. *Endocrinology* **158**, 1436–1449 (2017).
28. Iwakura, H. *et al.* Effects of ghrelin administration on decreased growth hormone status in obese animals. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **293**, E819-825 (2007).
29. Takaya, K. *et al.* Ghrelin strongly stimulates growth hormone release in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **85**, 4908–4911 (2000).
30. Yanagi, S., Sato, T., Kangawa, K. & Nakazato, M. The Homeostatic Force of Ghrelin. *Cell Metab.* **27**, 786–804 (2018).
31. Kuo, Y.-T. *et al.* The Temporal Sequence of Gut Peptide–CNS Interactions Tracked In Vivo by Magnetic Resonance Imaging. *J. Neurosci.* **27**, 12341–12348 (2007).
32. Schneeberger, M., Gomis, R. & Claret, M. Hypothalamic and brainstem neuronal circuits controlling homeostatic energy balance. *J. Endocrinol.* **220**, T25-46 (2014).
33. Schaeffer, M. *et al.* Rapid sensing of circulating ghrelin by hypothalamic appetite-modifying neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, 1512–1517 (2013).
34. Chen, H. Y. *et al.* Orexigenic action of peripheral ghrelin is mediated by neuropeptide Y and agouti-related protein. *Endocrinology* **145**, 2607–2612 (2004).
35. Luquet, S., Phillips, C. T. & Palmiter, R. D. NPY/AgRP neurons are not essential for feeding responses to glucoprivation. *Peptides* **28**, 214–225 (2007).
36. Cabral, A., Portiansky, E., Sánchez-Jaramillo, E., Zigman, J. M. & Perello, M. Ghrelin activates hypophysiotropic corticotropin-releasing factor neurons independently of the arcuate nucleus. *Psychoneuroendocrinology* **67**, 27–39 (2016).
37. Cabral, A., Valdivia, S., Fernandez, G., Reynaldo, M. & Perello, M. Divergent neuronal circuitries underlying acute orexigenic effects of peripheral or central ghrelin: critical role of brain accessibility. *J. Neuroendocrinol.* **26**, 542–554 (2014).
38. 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.* **520**, 6–33 (2012).
39. Cabral, A., Suescun, O., Zigman, J. M. & Perello, M. Ghrelin indirectly activates hypophysiotropic CRF neurons in rodents. *PLoS ONE* **7**, e31462 (2012).
40. Price, C. J., Hoyda, T. D. & Ferguson, A. V. The area postrema: a brain monitor and integrator of systemic autonomic state. *Neuroscientist* **14**, 182–194 (2008).
41. King, M. S. Anatomy of the Rostral Nucleus of the Solitary Tract. in *The Role of the Nucleus of the Solitary Tract in Gustatory Processing* (ed. Bradley, R. M.) (CRC Press/Taylor & Francis, 2007).
42. Cabral, A., Fernandez, G. & Perello, M. Analysis of brain nuclei accessible to ghrelin present in the cerebrospinal fluid. *Neuroscience* **253**, 406–415 (2013).
43. Cornejo, M. P. *et al.* Ghrelin Recruits Specific Subsets of Dopamine and GABA Neurons of Different Ventral Tegmental Area Sub-nuclei. *Neuroscience* (2018) doi:10.1016/j.neuroscience.2018.09.027.

44. Mani, B. K. *et al.* Neuroanatomical characterization of a growth hormone secretagogue receptor-green fluorescent protein reporter mouse. *J. Comp. Neurol.* **522**, 3644–3666 (2014).
45. Li, Y., Wu, X., Zhao, Y., Chen, S. & Owyang, C. Ghrelin acts on the dorsal vagal complex to stimulate pancreatic protein secretion. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **290**, G1350–1358 (2006).
46. Nair-Roberts, R. G. *et al.* Stereological estimates of dopaminergic, GABAergic and glutamatergic neurons in the ventral tegmental area, substantia nigra and retrorubral field in the rat. *Neuroscience* **152**, 1024–1031 (2008).
47. Jerlhag, E. *et al.* Ghrelin stimulates locomotor activity and accumbal dopamine-overflow via central cholinergic systems in mice: implications for its involvement in brain reward. *Addict Biol* **11**, 45–54 (2006).
48. Jerlhag, E. *et al.* Requirement of central ghrelin signaling for alcohol reward. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 11318–11323 (2009).
49. Prieto-Garcia, L., Egecioglu, E., Studer, E., Westberg, L. & Jerlhag, E. Ghrelin and GHS-R1A signaling within the ventral and laterodorsal tegmental area regulate sexual behavior in sexually naïve male mice. *Psychoneuroendocrinology* **62**, 392–402 (2015).
50. Jerlhag, E. Systemic administration of ghrelin induces conditioned place preference and stimulates accumbal dopamine. *Addict Biol* **13**, 358–363 (2008).
51. Disse, E. *et al.* Peripheral ghrelin enhances sweet taste food consumption and preference, regardless of its caloric content. *Physiol. Behav.* **101**, 277–281 (2010).
52. Chuang, J.-C. *et al.* Ghrelin mediates stress-induced food-reward behavior in mice. *J. Clin. Invest.* **121**, 2684–2692 (2011).
53. Perello, M. & Dickson, S. L. Ghrelin signalling on food reward: a salient link between the gut and the mesolimbic system. *J. Neuroendocrinol.* **27**, 424–434 (2015).
54. Abizaid, A. *et al.* Ghrelin modulates the activity and synaptic input organization of midbrain dopamine neurons while promoting appetite. *J. Clin. Invest.* **116**, 3229–3239 (2006).
55. Carlini, V. P. *et al.* Ghrelin increases anxiety-like behavior and memory retention in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **299**, 739–743 (2002).
56. Chen, L. *et al.* Local infusion of ghrelin enhanced hippocampal synaptic plasticity and spatial memory through activation of phosphoinositide 3-kinase in the dentate gyrus of adult rats. *Eur. J. Neurosci.* **33**, 266–275 (2011).
57. Diano, S. *et al.* Ghrelin controls hippocampal spine synapse density and memory performance. *Nat. Neurosci.* **9**, 381–388 (2006).
58. Moon, M., Kim, S., Hwang, L. & Park, S. Ghrelin regulates hippocampal neurogenesis in adult mice. *Endocr. J.* **56**, 525–531 (2009).
59. Li, E., Kim, Y., Kim, S. & Park, S. Ghrelin-induced hippocampal neurogenesis and enhancement of cognitive function are mediated independently of GH/IGF-1 axis: lessons from the spontaneous dwarf rats. *Endocrine Journal* **60**, 1065–1075 (2013).
60. Zhao, Z. *et al.* Ghrelin administration enhances neurogenesis but impairs spatial learning and memory in adult mice. *Neuroscience* **257**, 175–185 (2014).
61. Wang, J. *et al.* Ghrelin increases hippocampal recombination activating gene 1 expression and spatial memory performance in mice. *Neuroreport* **24**, 712–717 (2013).
62. Hornsby, A. K. E. *et al.* Short-term calorie restriction enhances adult hippocampal neurogenesis and remote fear memory in a Ghnr-dependent manner. *Psychoneuroendocrinology* **63**, 198–207 (2016).
63. Grote, H. E. & Hannan, A. J. Regulators of adult neurogenesis in the healthy and diseased brain. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **34**, 533–545 (2007).

64. Cabral, A., López Soto, E. J., Epelbaum, J. & Perelló, M. Is Ghrelin Synthesized in the Central Nervous System? *Int J Mol Sci* **18**, (2017).
65. Perello, M. *et al.* Brain accessibility delineates the central effects of circulating ghrelin. *J. Neuroendocrinol.* **31**, e12677 (2019).
66. Abbott, N. J., Patabendige, A. A. K., Dolman, D. E. M., Yusof, S. R. & Begley, D. J. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol. Dis.* **37**, 13–25 (2010).
67. Daneman, R. & Prat, A. The blood-brain barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **7**, a020412 (2015).
68. Davidson, A. L., Dassa, E., Orelle, C. & Chen, J. Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **72**, 317–364, table of contents (2008).
69. Banks, W. A. Extent and Direction of Ghrelin Transport Across the Blood-Brain Barrier Is Determined by Its Unique Primary Structure. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **302**, 822–827 (2002).
70. Banks, W. A., Burney, B. O. & Robinson, S. M. Effects of triglycerides, obesity, and starvation on ghrelin transport across the blood-brain barrier. *Peptides* **29**, 2061–2065 (2008).
71. Rhea, E. M. *et al.* Ghrelin transport across the blood-brain barrier can occur independently of the growth hormone secretagogue receptor. *Mol Metab* **18**, 88–96 (2018).
72. Pan, W., Tu, H. & Kastin, A. J. Differential BBB interactions of three ingestive peptides: obestatin, ghrelin, and adiponectin. *Peptides* **27**, 911–916 (2006).
73. Miyata, S. New aspects in fenestrated capillary and tissue dynamics in the sensory circumventricular organs of adult brains. *Front Neurosci* **9**, 390 (2015).
74. Noda, M. & Hiyama, T. Y. Sodium sensing in the brain. *Pflugers Arch.* **467**, 465–474 (2015).
75. Sladek, C. D. & Johnson, A. K. Integration of thermal and osmotic regulation of water homeostasis: the role of TRPV channels. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **305**, R669-678 (2013).
76. Tiruneh, M. A., Huang, B. S. & Leenen, F. H. H. Role of angiotensin II type 1 receptors in the subfornical organ in the pressor responses to central sodium in rats. *Brain Res.* **1527**, 79–86 (2013).
77. Miyata, S. & Hatton, G. I. Activity-related, dynamic neuron-glia interactions in the hypothalamo-neurohypophysial system. *Microsc. Res. Tech.* **56**, 143–157 (2002).
78. Prevot, V. *et al.* Neuronal-glia-endothelial interactions and cell plasticity in the postnatal hypothalamus: implications for the neuroendocrine control of reproduction. *Psychoneuroendocrinology* **32 Suppl 1**, S46-51 (2007).
79. Prevot, V. *et al.* The Versatile Tanycyte: A Hypothalamic Integrator of Reproduction and Energy Metabolism. *Endocr. Rev.* **39**, 333–368 (2018).
80. Rodríguez, E. M., Blázquez, J. L. & Guerra, M. 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* **31**, 757–776 (2010).
81. Ciofi, P. *et al.* Brain-Endocrine Interactions: A Microvascular Route in the Mediobasal Hypothalamus. *Endocrinology* **150**, 5509–5519 (2009).
82. Broadwell, R. D. & Brightman, M. W. Entry of peroxidase into neurons of the central and peripheral nervous systems from extracerebral and cerebral blood. *J. Comp. Neurol.* **166**, 257–283 (1976).
83. Leyris, J.-P. *et al.* Homogeneous time-resolved fluorescence-based assay to screen for ligands targeting the growth hormone secretagogue receptor type 1a. *Anal. Biochem.* **408**, 253–262 (2011).
84. McGirr, R., McFarland, M. S., McTavish, J., Luyt, L. G. & Dhanvantari, S. Design and characterization of a fluorescent ghrelin analog for imaging the growth hormone secretagogue receptor 1a. *Regul. Pept.* **172**, 69–76 (2011).

85. Saunders, N. R., Ek, C. J., Habgood, M. D. & Dziegielewska, K. M. Barriers in the brain: a renaissance? *Trends Neurosci.* **31**, 279–286 (2008).
86. Redzic, Z. B., Preston, J. E., Duncan, J. A., Chodobski, A. & Szmydynger-Chodobska, J. The choroid plexus-cerebrospinal fluid system: from development to aging. *Curr. Top. Dev. Biol.* **71**, 1–52 (2005).
87. Smith, D. E., Johanson, C. E. & Keep, R. F. Peptide and peptide analog transport systems at the blood-CSF barrier. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **56**, 1765–1791 (2004).
88. Kusuhara, H. & Sugiyama, Y. Efflux transport systems for organic anions and cations at the blood-CSF barrier. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **56**, 1741–1763 (2004).
89. Rodríguez, E. M. *et al.* Hypothalamic tanycytes: a key component of brain-endocrine interaction. *Int. Rev. Cytol.* **247**, 89–164 (2005).
90. Mathew, T. C. Regional analysis of the ependyma of the third ventricle of rat by light and electron microscopy. *Anat Histol Embryol* **37**, 9–18 (2008).
91. Lazcano, I. *et al.* Fasting Enhances Pyroglutamyl Peptidase II Activity in Tanycytes of the Mediobasal Hypothalamus of Male Adult Rats. *Endocrinology* **156**, 2713–2723 (2015).
92. Prevot, V. *et al.* Gonadotrophin-releasing hormone nerve terminals, tanycytes and neurohaemal junction remodelling in the adult median eminence: functional consequences for reproduction and dynamic role of vascular endothelial cells. *J. Neuroendocrinol.* **22**, 639–649 (2010).
93. Balland, E. *et al.* Hypothalamic tanycytes are an ERK-gated conduit for leptin into the brain. *Cell Metab.* **19**, 293–301 (2014).
94. Elizondo-Vega, R. *et al.* The role of tanycytes in hypothalamic glucosensing. *J. Cell. Mol. Med.* **19**, 1471–1482 (2015).
95. García, M. A. *et al.* Hypothalamic ependymal-glia cells express the glucose transporter GLUT2, a protein involved in glucose sensing. *J. Neurochem.* **86**, 709–724 (2003).
96. Lee, D. A. *et al.* Tanycytes of the hypothalamic median eminence form a diet-responsive neurogenic niche. *Nat. Neurosci.* **15**, 700–702 (2012).
97. Robins, S. C. *et al.* α -Tanycytes of the adult hypothalamic third ventricle include distinct populations of FGF-responsive neural progenitors. *Nat Commun* **4**, 2049 (2013).
98. Grouselle, D. *et al.* Pulsatile cerebrospinal fluid and plasma ghrelin in relation to growth hormone secretion and food intake in the sheep. *J. Neuroendocrinol.* **20**, 1138–1146 (2008).
99. Collden, G. *et al.* Neonatal overnutrition causes early alterations in the central response to peripheral ghrelin. *Mol Metab* **4**, 15–24 (2015).
100. Langlet, F. *et al.* Tanycytic VEGF-A boosts blood-hypothalamus barrier plasticity and access of metabolic signals to the arcuate nucleus in response to fasting. *Cell Metab.* **17**, 607–617 (2013).
101. Thuenauer, R., Müller, S. K. & Römer, W. Pathways of protein and lipid receptor-mediated transcytosis in drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv* **14**, 341–351 (2017).
102. Beard, R., Gaboriau, D. C. A., Gee, A. D. & Tate, E. W. Chemical biology tools for probing transcytosis at the blood–brain barrier. *Chem. Sci.* **10**, 10772–10778 (2019).
103. Riezman, H., Woodman, P. G., van Meer, G. & Marsh, M. Molecular mechanisms of endocytosis. *Cell* **91**, 731–738 (1997).
104. Doherty, G. J. & McMahon, H. T. Mechanisms of endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* **78**, 857–902 (2009).
105. Mayor, S. & Pagano, R. E. Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 603–612 (2007).
106. Royle, S. J. The cellular functions of clathrin. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 1823–1832 (2006).

107. Schmid, E. M. *et al.* Role of the AP2 beta-appendage hub in recruiting partners for clathrin-coated vesicle assembly. *PLoS Biol.* **4**, e262 (2006).
108. Praefcke, G. J. K. & McMahon, H. T. The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 133–147 (2004).
109. Ford, M. G. J. *et al.* Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin. *Nature* **419**, 361–366 (2002).
110. Wolfe, B. L. & Trejo, J. Clathrin-dependent mechanisms of G protein-coupled receptor endocytosis. *Traffic* **8**, 462–470 (2007).
111. Ferreira, F. *et al.* Endocytosis of G protein-coupled receptors is regulated by clathrin light chain phosphorylation. *Curr. Biol.* **22**, 1361–1370 (2012).
112. Shenoy, S. K. & Lefkowitz, R. J. β -arrestin-mediated receptor trafficking and signal transduction. *Trends in Pharmacological Sciences* **32**, 521–533 (2011).
113. Simon, A. C. *et al.* Activation-dependent plasticity of polarized GPCR distribution on the neuronal surface. *J Mol Cell Biol* **5**, 250–265 (2013).
114. Camiña, J. P. *et al.* Desensitization and endocytosis mechanisms of ghrelin-activated growth hormone secretagogue receptor 1a. *Endocrinology* **145**, 930–940 (2004).
115. Holliday, N. D., Holst, B., Rodionova, E. A., Schwartz, T. W. & Cox, H. M. Importance of constitutive activity and arrestin-independent mechanisms for intracellular trafficking of the ghrelin receptor. *Mol. Endocrinol.* **21**, 3100–3112 (2007).
116. Robinson, M. S., Watts, C. & Zerial, M. Membrane dynamics in endocytosis. *Cell* **84**, 13–21 (1996).
117. Kumari, S., Mg, S. & Mayor, S. Endocytosis unplugged: multiple ways to enter the cell. *Cell Res.* **20**, 256–275 (2010).
118. Gruenberg, J. & Maxfield, F. R. Membrane transport in the endocytic pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 552–563 (1995).
119. Mukherjee, S., Ghosh, R. N. & Maxfield, F. R. Endocytosis. *Physiol. Rev.* **77**, 759–803 (1997).
120. Mostov, K. E., Verges, M. & Altschuler, Y. Membrane traffic in polarized epithelial cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**, 483–490 (2000).
121. Schmid, S. L., Fuchs, R., Male, P. & Mellman, I. Two distinct subpopulations of endosomes involved in membrane recycling and transport to lysosomes. *Cell* **52**, 73–83 (1988).
122. Beaumelle, B. D., Gibson, A. & Hopkins, C. R. Isolation and preliminary characterization of the major membrane boundaries of the endocytic pathway in lymphocytes. *J. Cell Biol.* **111**, 1811–1823 (1990).
123. Aniento, F., Emans, N., Griffiths, G. & Gruenberg, J. Cytoplasmic dynein-dependent vesicular transport from early to late endosomes. *J. Cell Biol.* **123**, 1373–1387 (1993).
124. Pierre, P., Scheel, J., Rickard, J. E. & Kreis, T. E. CLIP-170 links endocytic vesicles to microtubules. *Cell* **70**, 887–900 (1992).
125. Bucci, C. *et al.* The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell* **70**, 715–728 (1992).
126. van der Sluijs, P. *et al.* The small GTP-binding protein rab4 controls an early sorting event on the endocytic pathway. *Cell* **70**, 729–740 (1992).
127. Ullrich, O., Reinsch, S., Urbé, S., Zerial, M. & Parton, R. G. Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome. *J. Cell Biol.* **135**, 913–924 (1996).
128. Lombardi, D. *et al.* Rab9 functions in transport between late endosomes and the trans Golgi network. *EMBO J.* **12**, 677–682 (1993).
129. Riederer, M. A., Soldati, T., Shapiro, A. D., Lin, J. & Pfeffer, S. R. Lysosome biogenesis requires Rab9 function and receptor recycling from endosomes to the trans-Golgi network. *J. Cell Biol.* **125**, 573–582 (1994).

130. Rothman, J. E. Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature* **372**, 55–63 (1994).
131. Thorn, P., Zorec, R., Rettig, J. & Keating, D. J. Exocytosis in non-neuronal cells. *J. Neurochem.* **137**, 849–859 (2016).
132. Chung, I. *et al.* Expression of two membrane fusion proteins, synaptosome-associated protein of 25 kDa and vesicle-associated membrane protein, in choroid plexus epithelium. *Neuroscience* **116**, 349–357 (2003).
133. Strazielle, N. & Ghersi-Egea, J.-F. Potential Pathways for CNS Drug Delivery Across the Blood-Cerebrospinal Fluid Barrier. *Curr. Pharm. Des.* **22**, 5463–5476 (2016).
134. Harrison, L. *et al.* Fluorescent blood-brain barrier tracing shows intact leptin transport in obese mice. *Int J Obes (Lond)* **43**, 1305–1318 (2019).
135. Grapp, M. *et al.* Choroid plexus transcytosis and exosome shuttling deliver folate into brain parenchyma. *Nat Commun* **4**, 2123 (2013).
136. Habgood, M. D., Sedgwick, J. E., Dziegielewska, K. M. & Saunders, N. R. A developmentally regulated blood-cerebrospinal fluid transfer mechanism for albumin in immature rats. *J. Physiol. (Lond.)* **456**, 181–192 (1992).
137. Balin, B. J. & Broadwell, R. D. Transcytosis of protein through the mammalian cerebral epithelium and endothelium. I. Choroid plexus and the blood-cerebrospinal fluid barrier. *J. Neurocytol.* **17**, 809–826 (1988).
138. Zlokovic, B. V. *et al.* Differential regulation of leptin transport by the choroid plexus and blood-brain barrier and high affinity transport systems for entry into hypothalamus and across the blood-cerebrospinal fluid barrier. *Endocrinology* **141**, 1434–1441 (2000).
139. Thomas, S. A., Preston, J. E., Wilson, M. R., Farrell, C. L. & Segal, M. B. Leptin transport at the blood-cerebrospinal fluid barrier using the perfused sheep choroid plexus model. *Brain Res.* **895**, 283–290 (2001).
140. Peruzzo, B., Pastor, F. E., Blázquez, J. L., Amat, P. & Rodríguez, E. M. Polarized endocytosis and transcytosis in the hypothalamic tanycytes of the rat. *Cell Tissue Res.* **317**, 147–164 (2004).
141. Madisen, L. *et al.* A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nat. Neurosci.* **13**, 133–140 (2010).
142. Paxinos, G. & Franklin, K. B. J. *The mouse brain in stereotaxic coordinates.* (Academic Press, 2001).
143. Liu, L. & Duff, K. A Technique for Serial Collection of Cerebrospinal Fluid from the Cisterna Magna in Mouse. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)* e960–e960 (2008) doi:10.3791/960.
144. Nakazato, M. *et al.* A role for ghrelin in the central regulation of feeding. **409**, 5 (2001).
145. Altman, J. & Bayer, S. A. Development of the diencephalon in the rat. III. Ontogeny of the specialized ventricular linings of the hypothalamic third ventricle. *J. Comp. Neurol.* **182**, 995–1015 (1978).
146. de Seranno, S. *et al.* Role of estradiol in the dynamic control of tanycyte plasticity mediated by vascular endothelial cells in the median eminence. *Endocrinology* **151**, 1760–1772 (2010).
147. Peitz, M., Pfannkuche, K., Rajewsky, K. & Edenhofer, F. Ability of the hydrophobic FGF and basic TAT peptides to promote cellular uptake of recombinant Cre recombinase: a tool for efficient genetic engineering of mammalian genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 4489–4494 (2002).
148. von Kleist, L. *et al.* Role of the clathrin terminal domain in regulating coated pit dynamics revealed by small molecule inhibition. *Cell* **146**, 471–484 (2011).
149. Harper, C. B. *et al.* Dynamin inhibition blocks botulinum neurotoxin type A endocytosis in neurons and delays botulism. *J. Biol. Chem.* **286**, 35966–35976 (2011).

150. Asundi, J. *et al.* An Antibody-Drug Conjugate Directed against Lymphocyte Antigen 6 Complex, Locus E (LY6E) Provides Robust Tumor Killing in a Wide Range of Solid Tumor Malignancies. *Clin. Cancer Res.* **21**, 3252–3262 (2015).
151. Schindelin, J. *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **9**, 676–682 (2012).
152. McFarlane, M. R., Brown, M. S., Goldstein, J. L. & Zhao, T.-J. Induced ablation of ghrelin cells in adult mice does not decrease food intake, body weight, or response to high-fat diet. *Cell Metab.* **20**, 54–60 (2014).
153. Kovács, K. J. c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map. *Neurochem. Int.* **33**, 287–297 (1998).
154. Laeger, T. *et al.* Concentrations of hormones and metabolites in cerebrospinal fluid and plasma of dairy cows during the periparturient period. *J. Dairy Sci.* **96**, 2883–2893 (2013).
155. Popovic, V. *et al.* Circulating and cerebrospinal fluid ghrelin and leptin: potential role in altered body weight in Huntington's disease. *Eur. J. Endocrinol.* **151**, 451–455 (2004).
156. Unger, M. M., Oertel, W. H. & Tackenberg, B. Cerebrospinal fluid concentrations of ghrelin in patients with multiple sclerosis. *Neuro Endocrinol. Lett.* **34**, 14–17 (2013).
157. Uriarte, M. *et al.* Evidence Supporting a Role for the Blood-Cerebrospinal Fluid Barrier Transporting Circulating Ghrelin into the Brain. *Mol. Neurobiol.* (2018) doi:10.1007/s12035-018-1362-8.
158. Tritschler, F. *et al.* Thrombin causes the enrichment of rat brain primary cultures with ependymal cells via protease-activated receptor 1. *Neurochem. Res.* **32**, 1028–1035 (2007).
159. Flament-Durand, J. & Brion, J. P. Tanycytes: morphology and functions: a review. *Int. Rev. Cytol.* **96**, 121–155 (1985).
160. Ciesielski-Treska, J., Ulrich, G. & Aunis, D. Protein kinase C-induced redistribution of the cytoskeleton and phosphorylation of vimentin in cultured brain macrophages. *J. Neurosci. Res.* **29**, 362–378 (1991).
161. Abd-el-Basset, E. M., Ahmed, I., Kalnins, V. I. & Fedoroff, S. Immuno-electron microscopical localization of vimentin and glial fibrillary acidic protein in mouse astrocytes and their precursor cells in culture. *Glia* **6**, 149–153 (1992).
162. Chauvet, N., Privat, A. & Alonso, G. Aged median eminence glial cell cultures promote survival and neurite outgrowth of cocultured neurons. *Glia* **18**, 211–223 (1996).
163. Prevot, V., Cornea, A., Mungenast, A., Smiley, G. & Ojeda, S. R. Activation of erbB-1 signaling in tanycytes of the median eminence stimulates transforming growth factor beta1 release via prostaglandin E2 production and induces cell plasticity. *J. Neurosci.* **23**, 10622–10632 (2003).
164. Gabrion, J. *et al.* Characterization of ependymal cells in hypothalamic and choroidal primary cultures. *Neuroscience* **24**, 993–1007 (1988).
165. Gabrion, J. B. *et al.* Ependymal and choroidal cells in culture: characterization and functional differentiation. *Microsc. Res. Tech.* **41**, 124–157 (1998).
166. Jordan, F. L., Rieke, G. K., Hughes, B. W. & Thomas, W. E. Morphological diversity of ependymal cells in tissue culture. *Brain Res. Bull.* **25**, 159–163 (1990).
167. Rice, D. & Barone, S. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ. Health Perspect.* **108 Suppl 3**, 511–533 (2000).
168. Peruzzo, B. *et al.* A second look at the barriers of the medial basal hypothalamus. *Exp Brain Res* **132**, 10–26 (2000).

169. Perraud, F., Besnard, F., Sensenbrenner, M. & Labourdette, G. Thrombin is a potent mitogen for rat astroblasts but not for oligodendroblasts and neuroblasts in primary culture. *Int. J. Dev. Neurosci.* **5**, 181–188 (1987).
170. Grondona, J. M., Granados-Durán, P., Fernández-Llebrez, P. & López-Ávalos, M. D. A simple method to obtain pure cultures of multiciliated ependymal cells from adult rodents. *Histochem. Cell Biol.* **139**, 205–220 (2013).
171. Laabich, A., Sensenbrenner, M. & Delaunoy, J. P. Monolayer cultures of ependymal cells on porous bottom dishes. A tool for transport studies across the brain cerebrospinal barrier. *Neurosci. Lett.* **103**, 157–161 (1989).
172. Weibel, M., Pettmann, B., Artault, J. C., Sensenbrenner, M. & Labourdette, G. Primary culture of rat ependymal cells in serum-free defined medium. *Brain Res.* **390**, 199–209 (1986).
173. Weibel, M., Pettmann, B., Daune, G., Labourdette, G. & Sensenbrenner, M. Chemically defined medium for rat astroglial cells in primary culture. *Int. J. Dev. Neurosci.* **2**, 355–366 (1984).
174. Chiasson, B. J., Tropepe, V., Morshead, C. M. & van der Kooy, D. Adult mammalian forebrain ependymal and subependymal cells demonstrate proliferative potential, but only subependymal cells have neural stem cell characteristics. *J. Neurosci.* **19**, 4462–4471 (1999).
175. Hild, W., Takenaka, T. & Walker, F. Electrophysiological properties of ependymal cells from the mammalian brain in tissue culture. *Exp. Neurol.* **11**, 493–501 (1965).
176. Jarvis, C. R. & Andrew, R. D. Correlated electrophysiology and morphology of the ependyma in rat hypothalamus. *J. Neurosci.* **8**, 3691–3702 (1988).
177. Bennett, M. V. L., Contreras, J. E., Bukauskas, F. F. & Sáez, J. C. New roles for astrocytes: gap junction hemichannels have something to communicate. *Trends Neurosci.* **26**, 610–617 (2003).
178. Chauvet, N., Prieto, M. & Alonso, G. Tanycytes present in the adult rat mediobasal hypothalamus support the regeneration of monoaminergic axons. *Exp. Neurol.* **151**, 1–13 (1998).
179. Bascó, E., Woodhams, P. L., Hajós, F. & Balázs, R. Immunocytochemical demonstration of glial fibrillary acidic protein in mouse tanycytes. *Anat. Embryol.* **162**, 217–222 (1981).
180. de Vitry, F., Picart, R., Jacque, C. & Tixier-Vidal, A. Glial fibrillary acidic protein. A cellular marker of tanycytes in the mouse hypothalamus. *Dev. Neurosci.* **4**, 457–460 (1981).
181. Chauvet, N., Parmentier, M. L. & Alonso, G. Transected axons of adult hypothalamo-neurohypophysial neurons regenerate along tanycytic processes. *J. Neurosci. Res.* **41**, 129–144 (1995).
182. Meister, B. *et al.* DARPP-32, a dopamine- and cyclic AMP-regulated phosphoprotein in tanycytes of the mediobasal hypothalamus: distribution and relation to dopamine and luteinizing hormone-releasing hormone neurons and other glial elements. *Neuroscience* **27**, 607–622 (1988).
183. de Vries, E. M. *et al.* NFκB signaling is essential for the lipopolysaccharide-induced increase of type 2 deiodinase in tanycytes. *Endocrinology* **155**, 2000–2008 (2014).
184. Ouimet, C. C., Miller, P. E., Hemmings, H. C., Walaas, S. I. & Greengard, P. DARPP-32, a dopamine- and adenosine 3':5'-monophosphate-regulated phosphoprotein enriched in dopamine-innervated brain regions. III. Immunocytochemical localization. *J. Neurosci.* **4**, 111–124 (1984).
185. Rodríguez, E. M., González, C. B. & Delannoy, L. Cellular organization of the lateral and postinfundibular regions of the median eminence in the rat. *Cell Tissue Res.* **201**, 377–408 (1979).
186. Paull, W. K., Martin, H. & Scott, D. E. Scanning electron microscopy of the third ventricular floor of the rat. *J. Comp. Neurol.* **175**, 301–310 (1977).
187. Rinne, U. K. Ultrastructure of the median eminence of the rat. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* **74**, 98–122 (1966).

188. Wittkowski, W. Tanycytes and pituicytes: morphological and functional aspects of neuroglial interaction. *Microsc. Res. Tech.* **41**, 29–42 (1998).
189. dos Santos, T., Varela, J., Lynch, I., Salvati, A. & Dawson, K. A. Effects of transport inhibitors on the cellular uptake of carboxylated polystyrene nanoparticles in different cell lines. *PLoS ONE* **6**, e24438 (2011).
190. Rejman, J., Oberle, V., Zuhorn, I. S. & Hoekstra, D. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem. J.* **377**, 159–169 (2004).
191. Smith, P. J. *et al.* Cellular entry of nanoparticles via serum sensitive clathrin-mediated endocytosis, and plasma membrane permeabilization. *Int J Nanomedicine* **7**, 2045–2055 (2012).
192. Perello, M. *et al.* Functional implications of limited leptin receptor and ghrelin receptor coexpression in the brain. *J. Comp. Neurol.* **520**, 281–294 (2012).
193. Brightman, M. W. & Reese, T. S. Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J. Cell Biol.* **40**, 648–677 (1969).
194. Weller, R. O., Sharp, M. M., Christodoulides, M., Carare, R. O. & Møllgård, K. The meninges as barriers and facilitators for the movement of fluid, cells and pathogens related to the rodent and human CNS. *Acta Neuropathol.* **135**, 363–385 (2018).
195. Ramirez, V. T. *et al.* Differential functional selectivity and downstream signaling bias of ghrelin receptor antagonists and inverse agonists. *FASEB J.* **33**, 518–531 (2019).
196. Marques, F. *et al.* Transcriptome signature of the adult mouse choroid plexus. *Fluids Barriers CNS* **8**, 10 (2011).
197. Keep, R. F. & Jones, H. C. A morphometric study on the development of the lateral ventricle choroid plexus, choroid plexus capillaries and ventricular ependyma in the rat. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **56**, 47–53 (1990).
198. Zhang, Y. *et al.* An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *J. Neurosci.* **34**, 11929–11947 (2014).
199. Kastin, A. J., Pan, W., Maness, L. M., Koletsky, R. J. & Ernsberger, P. Decreased transport of leptin across the blood-brain barrier in rats lacking the short form of the leptin receptor. *Peptides* **20**, 1449–1453 (1999).
200. Hileman, S. M. *et al.* Characterization of short isoforms of the leptin receptor in rat cerebral microvessels and of brain uptake of leptin in mouse models of obesity. *Endocrinology* **143**, 775–783 (2002).
201. Christensen, I. B., Mogensen, E. N., Damkier, H. H. & Praetorius, J. Choroid plexus epithelial cells express the adhesion protein P-cadherin at cell-cell contacts and syntaxin-4 in the luminal membrane domain. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* **314**, C519–C533 (2018).
202. Balusu, S. *et al.* Identification of a novel mechanism of blood-brain communication during peripheral inflammation via choroid plexus-derived extracellular vesicles. *EMBO Mol Med* **8**, 1162–1183 (2016).
203. Xiao, G. & Gan, L.-S. Receptor-mediated endocytosis and brain delivery of therapeutic biologics. *Int J Cell Biol* **2013**, 703545 (2013).
204. Tuma, P. L. & Hubbard, A. L. Transcytosis: crossing cellular barriers. *Physiol. Rev.* **83**, 871–932 (2003).
205. Asakawa, A. *et al.* Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin. *Gastroenterology* **120**, 337–345 (2001).
206. Zigman, J. M. *et al.* Mice lacking ghrelin receptors resist the development of diet-induced obesity. *J. Clin. Invest.* **115**, 3564–3572 (2005).

207. Tritos, N. A. *et al.* Cerebrospinal fluid ghrelin is negatively associated with body mass index. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **88**, 2943–2946 (2003).
208. Pantel, J. *et al.* Loss of constitutive activity of the growth hormone secretagogue receptor in familial short stature. *J Clin Invest* **116**, 760–768 (2006).
209. Uchida, A., Zigman, J. M. & Perelló, M. Ghrelin and eating behavior: evidence and insights from genetically-modified mouse models. *Front Neurosci* **7**, 121 (2013).
210. Schellekens, H. *et al.* Ghrelin's Orexigenic Effect Is Modulated via a Serotonin 2C Receptor Interaction. *ACS Chem Neurosci* **6**, 1186–1197 (2015).
211. Egerod, K. L. *et al.* Profiling of G protein-coupled receptors in vagal afferents reveals novel gut-to-brain sensing mechanisms. *Mol Metab* **12**, 62–75 (2018).
212. Gahete, M. D. *et al.* Metabolic regulation of ghrelin O-acyl transferase (GOAT) expression in the mouse hypothalamus, pituitary, and stomach. *Mol. Cell. Endocrinol.* **317**, 154–160 (2010).
213. Stengel, A. *et al.* Differential distribution of ghrelin-O-acyltransferase (GOAT) immunoreactive cells in the mouse and rat gastric oxyntic mucosa. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **392**, 67–71 (2010).
214. DeBoer, M. D. Ghrelin and cachexia: Will treatment with GHSR-1a agonists make a difference for patients suffering from chronic wasting syndromes? *Mol Cell Endocrinol* **340**, 97–105 (2011).