

Tesis de grado en Licenciatura en Ciencias Biológicas

Opción Neurociencias 2018

**Identificación y localización en el sistema nervioso
central de la rata del receptor MCHR-1 para la
hormona concentradora de melanina.**

Sofía Tatiana Niño Rivero

Orientadora:

Patricia Lagos

Laboratorio de ejecución:

Laboratorio de Neurotransmisión peptídica, Departamento de
Fisiología, Facultad de Medicina.

Índice

Abreviaturas.....	4
Resumen	5
Introducción.....	6
1. Generalidades de la hormona concentradora de melanina (MCH)	6
2. Importancia del receptor MCHR-1	7
3. Cilias primarias y el MCHR-1.....	10
Antecedentes del grupo: MCH, sueño y estados depresivos	12
Hipótesis	14
Objetivo general.....	14
Objetivo específico 1: Evidenciar la presencia del MCHR-1 en el SNC, particularmente en el NDR.....	14
Objetivo específico 2: Determinar el fenotipo neuroquímico de las neuronas del NDR que presentan el receptor.....	14
Metodología.....	14
1. Animales	14
2. Obtención y procesamiento del tejido	15
3. Obtención y Procesamiento de imágenes	15
4. Ensayos de Inmunohistoquímica	16
4.1. Protocolo para detección del MCHR-1.....	16
4.2. Protocolo para la tinción de gránulos de Nissl con pironina y tionina	17
4.3. Protocolo para detección del marcador neuronal NeuN	18
4.4. Protocolo para la detección de marcadores de las cilias primarias	18
4.5. Protocolo para detección de neuronas 5-HT + MCHR-1	18
5. Ensayos de Inmunofluorescencia	19
5.1. Protocolos para la detección del MCHR-1.....	19
5.1.1. Protocolo 1 para la detección de MCHR-1: tres condiciones de incubación del anticuerpo primario	19
5.1.2. Protocolo 2 para la detección del MCHR-1: inclusión de la azida de sodio ..20	
5.1.3. Protocolo 3 para la detección de MCHR-1: amplificación de la señal.....	21
5.1.3.1. Protocolo 3.1 para la detección de MCHR-1: evaluación de los controles negativos.21	
5.2. Protocolos para la detección del marcador neuronal NeuN.....	21

5.2.1.	Protocolo 1 para la detección de NeuN y MCHR-1	21
5.2.2.	Protocolo 2 para la detección de NeuN y MCHR-1	22
5.3.	Protocolos para la detección de marcadores ciliares.....	22
5.3.1.	Protocolo para la detección de tubulina acetilada.....	22
5.3.2.	Protocolo para la detección de ARL13B y ACIII	22
5.4.	Protocolo para la detección concomitante del MCHR-1 y AC-III.....	23
5.5.	Protocolos para la detección del fenotipo serotoninérgico	23
5.5.1.	Protocolo 1 para la detección de neuronas serotoninérgicas y el MCHR-1..	23
5.5.2.	Protocolo 2 para la detección de neuronas serotoninérgicas y el MCHR-1..	23
5.5.3.	Protocolo 3 para la detección de neuronas serotoninérgicas y el MCHR-1..	24
5.6.	Protocolo para la detección de neuronas GABAérgicas y MCHR-1	24
Resultados		24
1.	Identificación del MCHR-1 por inmunohistoquímica	24
2.	El MCHR-1 en un contexto celular	26
3.	Localización sub-celular del MCHR-1 por inmunohistoquímica	28
4.	Identificación del MCHR-1 por inmunofluorescencia- Protocolo 1	30
5.	Verificación de la autofluorescencia del tejido.....	31
6.	Identificación del MCHR-1 por inmunofluorescencia- Protocolo 2	32
7.	Identificación del MCHR-1 por inmunofluorescencia- Protocolo 3	34
8.	Contextualización celular por inmunofluorescencia	38
9.	Determinación de la localización celular del MCHR-1 por inmunofluorescencia	38
10.	Ensayo de detección concomitante del MCHR-1 y ACIII	39
11.	Fenotipos neuronales donde está presente el MCHR-1- células serotoninérgicas ..	44
12.	Fenotipos neuronales donde está presente el MCHR-1- células GABAérgicas.....	48
Discusión de resultados		51
1.	Discusión de los resultados del primer objetivo: Evidenciar la presencia del MCHR-1 en el SNC, particularmente en el NDR.	51
2.	Discusión de los resultados del segundo objetivo: Determinar el fenotipo neuroquímico de las neuronas del NDR que presentan el receptor.	59
Conclusión.....		63
Perspectivas		65
Bibliografía.....		66
Anexo		78

Abreviaturas

5-HT: 5-hidroxitriptamina o serotonina
5-HT6: Receptor 6 de serotonina
ACIII: adenilato ciclasa III
BSA: Albumina de suero bovino
CRA: Con recuperación antigénica
CTRL-: Control negativo
DAB: Diaminobenzidina
DAG: *Donkey anti goat*
DAR: *Donkey anti rabbit*
DAM: *Donkey anti mouse*
GPCRs: *G-protein coupled receptors*: Receptores acoplados a proteínas G
i.c.v: intracerebroventricular
IF: Inmunofluorescencia
IHQ: Inmunohistoquímica
i.p.: Intraperitoneal
KO: *knock out*
LCR: Líquido cefalorraquídeo
LepR: Receptor de leptina
MAPK: Proteína kinasa activada por mitógeno
MCH: Hormona concentradora de melanina
MCHR-1: Receptor 1 de la hormona concentradora de melanina
MCH-ROD: MCH conjugada con rodamina
NDR: Núcleo dorsal del rafe
NDS: Suero normal de burro
NEI: Neuropeptido E-I
NGE: Neuropeptido G-E
PBS: *Buffer* fosfato salino
PFA: Paraformaldehído
PTX: Toxina pertússis
RA: Recuperación antigénica
SNC: Sistema nervioso central
SRA: Sin recuperación antigénica
Sstr3: Receptor 3 de somatostatina
wt: *Wild type*

Resumen

La hormona concentradora de melanina (MCH) es un neuropéptido hipotalámico que induce la ingesta, modula el ciclo sueño-vigilia y participa en la regulación de los estados de ánimo. En roedores se une a su receptor metabotrópico, el receptor de la hormona concentradora de melanina (MCHR-1), el cual es capaz de internalizarse. En trabajos previos, mediante la técnica de hibridación *in situ* se detectó en cortes de tejido, la presencia del ARNm del MCHR-1 en hipocampo, subiculum, amígdala, núcleo accumbens, tálamo, núcleo arcuato, núcleo pontino y núcleo dorsal del rafe (NDR), entre otros. Estas regiones también reciben una densa inervación de fibras MCHérgicas. La gran mayoría de los estudios sobre los efectos intracelulares producidos por la MCH se han realizado en sistemas heterólogos con sobre-expresión del MCHR-1.

Sin embargo, aún no ha sido evidenciada la presencia endógena del MCHR-1 en el SNC de la rata, ni sobre qué fenotipos neuronales se expresa. El objetivo del presente trabajo fue poner en evidencia la presencia del MCHR-1 mediante técnicas de inmunohistoquímica (IHQ) e inmunofluorescencia (IF) en el SNC de la rata, y determinar el fenotipo neuronal que presenta el receptor particularmente en el NDR.

Se verificó la presencia del MCHR-1 en el NDR, hipocampo, hipotálamo y corteza cerebral. Su localización a nivel celular fue en las cilias primarias, ya que por IHQ se obtuvo una marca similar del MCHR-1 a la marca observada de tubulina acetilada, un marcador específico de las mismas. Además por IF se observó la colocalización del MCHR-1 con el marcador ciliar adenilato ciclasa III (ACIII). En el NDR, el MCHR-1 estaba presente en algunas neuronas serotoninérgicas y GABAérgicas. Esto sugiere que estas neuronas son MCH-receptivas y apoya resultados previos sobre la participación de la MCH como modulador sobre los sistemas de neurotransmisión serotoninérgico y GABAérgico. Además también se observaron marcas positivas para el MCHR-1 a nivel de los vasos sanguíneos cerebrales, lo cual no había sido reportado.

La conexión anatómica entre el sistema MCHérgico y los dos sistemas de neurotransmisores clásicos anteriormente nombrados sientan bases para la conexión ya reportada a nivel funcional, que había sido puesta en evidencia al observar comportamientos pro-depresivos e inducir el sueño REM al microinyectar MCH en el NDR.

Introducción

1. Generalidades de la hormona concentradora de melanina (MCH)

La MCH es un péptido cíclico de 17 aminoácidos que fue aislado por primera vez de la hipófisis de salmón (Kawauchi et al. 1983). Su nombre deriva de la función que cumple como hormona en los peces teleósteos, donde controla la pigmentación de la piel de acuerdo al color de su entorno o como respuesta al estrés. El control de la pigmentación se da por la agregación de los gránulos de melanina en las células especializadas denominadas melanóforos, lo que da como resultado un aclaramiento en el color de la piel del pez (Saito & Nagasaki 2008).

Posteriormente se identificó la presencia de la MCH en el cerebro de mamíferos, estando formada por 19 aminoácidos en la rata (Vaughan et al. 1989).

La síntesis de la MCH se produce a partir de un precursor de 165 aminoácidos denominado prepro-MCH, que cuando es clivado en un sitio aminoacídico dibásico del extremo C terminal da lugar a otros dos neuropéptidos (además de la MCH), el neuropéptido E-I (NEI) y el neuropéptido G-E (NGE). El NEI se encuentra conjuntamente con la MCH en las neuronas hipotalámicas, mientras que del NGE aún se desconoce si se libera como péptido funcional o no (Sanchez et al. 1997).

En mamíferos, la MCH ya no funciona como una hormona, sino como un neurotransmisor/neuromodulador y se sintetiza principalmente en neuronas del área hipotalámica lateral y la zona incerta, las cuales envían sus proyecciones a través de todo el cerebro (Sanchez et al. 1997; Bittencourt et al. 1992). Específicamente las proyecciones de las neuronas MCHérgicas llegan al tálamo, varias regiones del hipotálamo, al núcleo dorsal del rafe (NDR), corteza cerebral, amígdala y núcleos motores, entre otros núcleos (Bittencourt et al. 1992; McGregor et al. 2005; Torterolo et al. 2009^b).

También en mamíferos, la MCH está implicada en diversas funciones que van desde la regulación de la ingesta de alimento y la homeostasis energética, hasta su participación en el control del ciclo sueño-vigilia y la regulación de estados de ánimo (Bernardis & Bellinger 1996; Torterolo et al. 2011). Los efectos de la MCH comienzan cuando ésta entra en contacto con el MCHR-1, además también fue identificado un segundo receptor, el MCHR-2.

Estos dos receptores son del tipo metabotrópicos, acoplados a proteína G (GPCR, de su sigla en inglés: *G protein-coupled receptors*), los cuales median sus funciones a través de la activación de sistemas de segundos mensajeros (Tan et al. 2002; Saito & Nagasaki 2008). Ambos se expresan en el cerebro humano y otros tejidos, sin embargo, el MCHR-2 en especies no humanas es un

pseudogen o un receptor sin funcionalidad (excepto carnívoros y monos) (Tan et al. 2002). Debido a que el MCHR-1 es el único receptor funcional y presente en roedores, es el que más se ha estudiado con respecto a su activación por la MCH en el SNC, debido a la importancia de su participación en las diversas funciones que cumple la MCH. El MCHR-1 es un GPCR acoplado a más de un tipo de proteína G, y la activación de cada una de estas dispara la activación de distintas vías de segundos mensajeros, cuyos mecanismos se detallarán más adelante.

En roedores, la MCH tiene un rol inhibitorio a nivel presináptico y postsináptico ya que es capaz de inhibir la actividad sináptica de neuronas hipotalámicas glutamatérgicas y GABAérgicas (Gao & van Den Pol 2001). vías de proteínas G (Gi, Go, Gq) lo saque porque se vuelve a explicar en importancia del receptor

El rol de la MCH en la regulación de la ingesta de alimento se comprobó al inyectar MCH en los ventrículos laterales de ratas, lo que provocó el aumento en la ingesta de alimento. Dicho efecto fue anulado utilizando antagonistas del MCHR-1 (Borowsky et al. 2002).

Además, en ratones knock out (KO) para MCH se observa un incremento en la tasa metabólica e hipofagia, con la consecuente disminución de peso y cantidad de grasa corporal (Shimada et al. 1998). Por otro lado, los ratones transgénicos que sobre-expresan la MCH son obesos y presentan resistencia a la insulina (Ludwig et al. 2001). Todas estas evidencias sugieren la importancia del complejo MCH-MCHR-1 en la regulación de la ingesta de alimento.

Como ya se mencionó, la MCH también está implicada en la regulación del ciclo sueño-vigilia; las neuronas MCHérgicas de roedores se activan durante el sueño, específicamente en la etapa de sueño REM. Esto se comprobó al inyectar MCH por vía intracerebroventricular (i.c.v.), ya que el sueño REM aumentó como también lo hizo el sueño lento (Verret et al. 2003). Al utilizar antagonistas del MCHR-1 se observaron los efectos contrarios, una disminución del sueño REM (Ahnaou et al. 2008).

2. Importancia del receptor MCHR-1

El MCHR-1 en un principio se lo denominó SLC-1 y fue descubierto como un receptor huérfano, posteriormente se asoció que su ligando endógeno era la MCH y se lo denominó MCHR-1 (Saito et al. 2001^a).

El receptor está formado por 360 aminoácidos en la rata y algunos de ellos son críticos para su correcto funcionamiento. Contiene 7 dominios transmembrana, siendo que la cola C terminal es intracelular y la amino terminal es extracelular.

Una región importante para la correcta funcionalidad del MCHR-1 es la comprendida entre sus residuos aminoacídicos Phe³¹⁸ y Arg³²¹, región que es la responsable de la transducción de señales intracelulares. Mutaciones en los residuos Arg³¹⁹, Arg³²⁰ producen una reducción

significativa del flujo de calcio, una de las evidencias experimentales que se han utilizado como reportero de la activación del MCHR-1 por la MCH *in vitro*. Si además se agrega una mutación en el residuo Arg³²¹, disminuye la expresión del receptor en la superficie celular (Tetsuka et al. 2004).

Existe una interacción del tipo ácido- base que permite la formación del complejo péptido-receptor, la cual involucra el residuo Arg¹¹ de la MCH y el residuo Asp¹²³ del MCHR-1 (Macdonald et al. 2000).

Además, existen proteínas de unión al MCHR-1, como por ejemplo la periplakina (descrita en ratón) y neurocondrina (descrita en humano), las cuales interactúan con la cola C-terminal del MCHR-1 reduciendo la capacidad de iniciar la movilización de Ca²⁺ (Murdoch et al. 2005; Francke et al. 2006). Por otro lado, los residuos Arg²⁵³ y Arg²⁵⁶ ubicados en el extremo distal del tercer loop citoplasmático del receptor, son estructuralmente importantes para la interacción funcional con RGS8, una GTPasa activadora de proteínas para subunidades G α (una de las proteínas G a las cuales está acoplada el receptor) (Miyamoto-Matsubara et al. 2008).

El MCHR-1 también presenta modificaciones post-traduccionales como las glicosilaciones, más precisamente, el dominio N-terminal del MCHR-1 en rata incluye tres N-glicosilaciones, en los sitios: Asn¹³, Asn¹⁴ y Asn²³, siendo que cada uno de estos sitios se encuentra conservado en *Xenopus*, ratón y humano (Lakaye et al. 1998).

En roedores, el MCHR-1, así como la gran mayoría de los GPCRs, luego de ser activado por su ligando, es capaz de internalizarse. La internalización de los receptores es un proceso que regula la capacidad de respuesta de las células y contribuye a la disminución de la respuesta frente al tratamiento con un agonista, fenómeno que se denomina desensibilización del receptor (Saito et al. 2004).

En la gran mayoría de los GPCRs, el proceso de internalización se da mediante la fosforilación de residuos de serina o treonina en el tercer loop de la cola C-terminal por kinasas asociadas a las proteínas G (Ferguson 2001). Este proceso de fosforilación aumenta la afinidad del receptor por proteínas denominadas arrestinas, las cuales funcionan como blanco para que el receptor sea secuestrado en vesículas recubiertas por clatrina; en este proceso también intervienen dinaminas (Luttrell & Lefkowitz 2002). Con respecto a la internalización del MCHR-1, se demostró en sistemas *in vitro* que es rápida y depende de la vía conformada por proteína quinasa C, β arrestina-2 y dinamina I (Saito et al. 2004). Esto se comprobó en la línea celular HEK-293T, donde las células fueron transfectadas con ADNc del gen de MCHR-1 *wild type* (wt) (secuencia génica de la rata) y también con ADNc de mutantes del MCHR-1 (Saito et al. 2004).

Por hibridación *in situ* en cortes de tejido, se detectó la presencia del ARNm del MCHR-1 en hipocampo, subiculum, amígdala, núcleo accumbens, tálamo, núcleo arcuato, núcleo pontino y NDR, entre otros (Saito et al. 2001^b). Estas regiones también reciben una densa inervación de fibras MCHérgicas provenientes del hipotálamo (Bittencourt et al. 1992). Es importante destacar que la gran mayoría de los estudios sobre los efectos intracelulares producidos por la MCH (detallados más adelante) se han realizado en sistemas heterólogos con sobre-expresión del MCHR-1 (células HEK-293 y CHO).

Por otra parte, las células SK-MEL-37, derivadas de epitelio, transfectadas con el MCHR-1 respondieron a la MCH con una inhibición de producción de AMPc y activación de proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK). Al pretratar estas células con toxina pertússis (PTX) se produce el bloqueo de las proteínas $G\alpha_i/G\alpha_o$, por lo que se revierte la inhibición de la producción del AMPc y también la activación de la MAPK. Esto indica que las proteínas $G\alpha_i/G\alpha_o$ participarían en los mecanismos de transducción celular mediados por este receptor (Saito et al. 2001^a), similar a lo que observaron Gao y van den Pol (Ver figura 1).

El MCHR-1 también fue detectado en tejidos periféricos incluido ojo, lengua y músculo esquelético (de baja a moderada expresión) (Bittencourt et al. 1992).

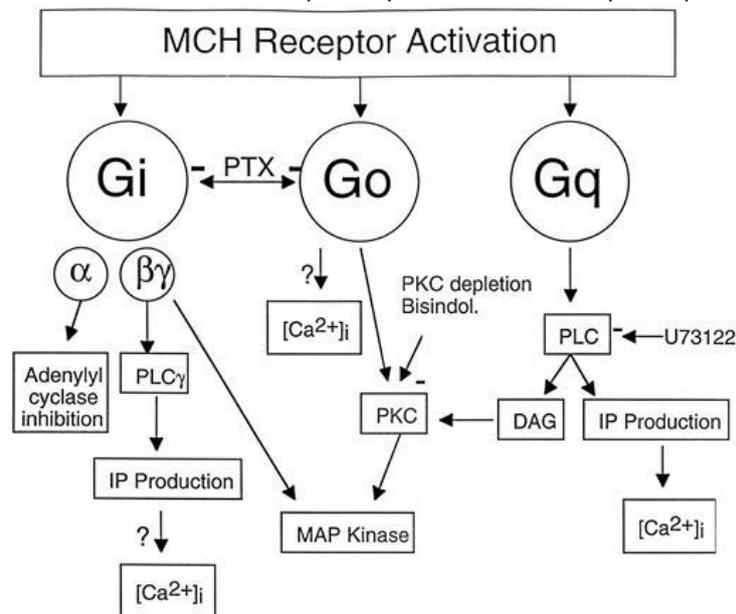


Figura 1 | Modelo de las vías de señalización intracelular acopladas a la activación del MCHR-1 en células CHO-MCHR. Tomada de Hawes et.al 2000.

Como se ha expuesto, la información existente sobre la relación MCH-MCHR-1 se ha obtenido en base a experimentos *in vitro* y en sistemas heterólogos no neuronales de sobre-expresión del receptor (Chambers et al. 1999; Lembo et al. 1999; Saito et al. 1999).

Los estudios en este tipo de sistemas evidenciaron tres características sobre la funcionalidad de la MCH a nivel celular. En primer lugar, una de las proteínas a la cual se encuentra acoplada el receptor es la $G\alpha_q/i3$, cuya activación desencadena la vía de la fosfolipasa C, la que tiene como efecto el incremento de calcio intracelular. Un segundo hallazgo reportado para células no neuronales como fueron los ovocitos de *Xenopus*, implica la co-expresión del MCHR-1 y de los

canales GIRK de potasio, estos últimos son canales de tipo rectificador interno de proteína G y pueden ser activados por la MCH (Saito et al. 2000). La tercera característica también se observa en células no neuronales, es que cuando la MCH activa la proteína G_i , se desencadena la vía de forskolin y se induce una reducción en los niveles de AMPc intracelular (Chambers et al. 1999; Saito et al. 1999). Sin embargo, en las neuronas presentes en sistemas endógenos, en el SNC de la rata (en cultivo y en rodajas de cerebro de hipotálamo), la MCH disminuye la amplitud de corrientes de calcio activadas por voltaje en la mayoría de estas células (Gao & van den Pol 2002).

Además, en un estudio *in vivo*, de resonancia magnética en ratones, se encontró que la MCH controla positivamente la frecuencia de batimiento de los cilios de las células endimarias presentes en el sector ventral del tercer ventrículo, mientras que la pérdida del MCHR-1 (ratones KO) provoca un aumento del tamaño ventricular (Conductier et al. 2013).

La información obtenida hasta ahora sobre el MCHR-1, tanto de su estructura como funcionalidad, ha sido obtenida a partir de ensayos *in vitro*. Los modelos *in vitro* brindan una gran ventaja, ya que mediante el uso de herramientas genéticas como la sobreexpresión de moléculas o la generación de animales KO es posible la comprensión de variados mecanismos. Sin embargo, es difícil saber si estos mecanismos ocurren de la misma manera en modelos *in vivo* o en sistemas endógenos.

3. Cilias primarias y el MCHR-1

Las cilias primarias son apéndices inmóviles y extracelulares que están presentes en la mayoría de los tipos celulares de los vertebrados donde cumplen funciones sensoriales y de señalización (Berbari et al. 2008^b). Estos apéndices están presentes en distintos sistemas sensoriales, ya que se encuentran en los fotorreceptores de la retina y en neuronas olfatorias. También están presentes en las células epiteliales del riñón, donde el movimiento del líquido tubular produce la flexión de las cilias primarias. Este movimiento de flexión produce la apertura de un canal iónico, lo cual conlleva a un incremento de calcio intracelular (Praetorius & Spring 2001; Nauli et al. 2003).

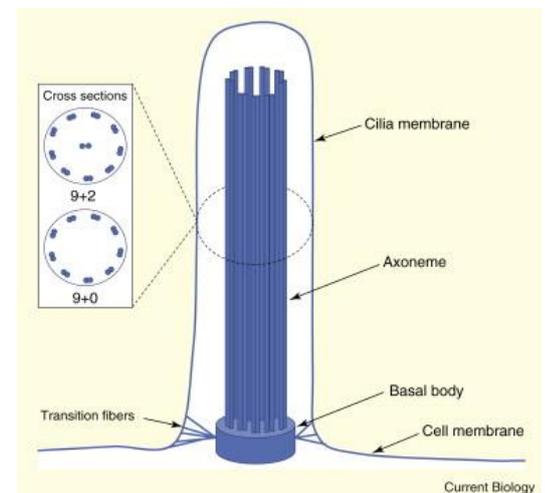


Figura 2| Estructura de la cilia primaria. Además de observarse los componentes se muestran secciones transversales de una cilia móvil (sección circular superior) y de una cilia primaria (sección circular inferior). Tomada de Berbari et.al 2009.

La estructura de dicho organelo consiste en una columna formada por microtúbulos (denominada axonema) rodeada por una membrana especializada que es continua con la membrana plasmática (Ver figura 2). El axonema se extiende desde el cuerpo basal, una estructura derivada del centriolo madre (el más antiguo de los dos centriolos), que puede formar el cilio de dos maneras diferentes. Puede formarse a partir del crecimiento del centriolo madre dentro de una vesícula proveniente del aparato de Golgi (luego se fusiona con la membrana celular y continúa creciendo hacia el espacio extracelular), o el centriolo madre por si solo puede migrar y anclarse en la membrana celular y crecer hacia el espacio extracelular (Sorokin 1962; Pedersen & Rosenbaum 2008).

Se ha reportado que gran parte de las neuronas de los roedores poseen cilias primarias (Berbari et al. 2008^b). En ratones, la ciliogénesis comienza en una etapa fetal avanzada, luego de que ocurre la migración de las células precursoras neuronales (Arellano et al. 2012).

Estos apéndices contienen proteínas que forman una maquinaria especializada en el transporte intraflagelar. Si las proteínas que forman esta maquinaria sufren mutaciones se verá comprometido no solo el correcto ensamblaje de esta estructura, sino que además se pueden desarrollar variadas ciliopatías (Lee & Gleeson 2010). Las ciliopatías son un conjunto de desórdenes causados por modificaciones en la estructura y función de las cilias (Davis & Katsanis 2012). Mutaciones en más de 100 genes ciliares distintos pueden llevar al desarrollo de estas enfermedades, que en algunos casos presentan fenotipos comunes (Pan et al. 2005).

Las diversas funciones que pueden cumplir estos organelos dependen en gran parte de las proteínas que se encuentran en sus membranas, más específicamente, las que forman los receptores transmembrana y canales que participan en vías de señalización (Nagata et al. 2012). Se ha determinado que distintos GPCRs, como el receptor 3 de somatostatina (Sstr3) (Händel et al. 1999), el receptor 6 de serotonina, 5-HT₆ (Hamon et al. 1999; Brailov et al. 2000) y el receptor de leptina (LepR) (Baly et al. 2007) poseen una localización determinada en las cilias primarias neuronales.

Así también, en secciones de cerebro de ratón que incluían a los tubérculos olfatorios, hipotálamo, hipocampo y núcleo accumbens se observó la colocalización del MCHR-1 y un marcador para las cilias primarias, lo que indica que este receptor también se encuentra presente en dicho organelo (Berbari et al. 2008^b). El efecto inmediato ante la remoción de las cilias primarias en neuronas del hipotálamo de un ratón adulto es la hiperfagia (alimentación compulsiva), lo cual conlleva a la obesidad, lo que puede llevar al desarrollo de la enfermedad denominada diabetes tipo II (Davenport et al. 2007). En ratones que poseen mutaciones en los genes BBs2 y BBs4 (genes implicados en la condición de obesidad denominada síndrome de

Bardet-Biedl) los receptores Sst3r y MCHR-1 pierden su localización ciliar en las neuronas (Berbari et al. 2008^b).

El grupo de Berbari continuó con el estudio de la caracterización y la importancia de los componentes ciliares. En el 2011 constató junto a su grupo de trabajo, que los niveles de tubulina soluble pueden estar implicados en la regulación de la longitud de las cilias primarias (en diversos tipos celulares). Utilizando fármacos como el nocodazol y taxol (los cuales afectan la polimerización de los microtúbulos) sobre cultivos celulares de células renales, observaron cambios en la longitud de las cilias y en los niveles de tubulina soluble. Por lo tanto, modificaciones en componentes del citoesqueleto afectan a las cilias, pero modificaciones en las cilias también afectan a la red formada por actina y miosina, ya que al mutar dos genes ciliares como el Ift88 y Kif3a se incrementan las modificaciones postraduccionales a nivel de los microtúbulos. (Sharma et al. 2011; Berbari et al. 2014).

Uno de los dos genes ciliares ya mencionados, el Ift88 se eliminó selectivamente (utilizando el método de la recombinasa CRE) en ratones, afectando el transporte intraflagelar en neuronas. Por lo que modificaciones en las cilias primarias de la corteza y el hipocampo se acompañaron de déficits en el aprendizaje aversivo, la memoria y en el reconocimiento de objetos nuevos (evaluado con el laberinto acuático de Morris). Otro factor vinculado al transporte intraflagelar se estudió en fibroblastos en cultivo, particularmente la localización del factor Traf3ip1. Este, al igual que el factor producido a partir del Ift88, formarían parte del complejo de transporte intraflagelar. (Berbari et al. 2014; Berbari et al. 2011)

Nuevamente Berbari y su grupo, utilizando el método de recombinación CRE, produjeron un método de visualización de las cilias primarias con GFP en distintos tejidos de ratón (cerebro, ojo, riñón) *in vivo* y *ex vivo* (O'Connor et al. 2013). Este último, parece ser uno de los únicos trabajos donde se visualizan las cilias primarias o alguno de sus componentes en un sistema endógeno, ya que como lo hemos mencionado la mayoría de los avances obtenidos sobre la estructura de estos apéndices se ha realizado en cultivos celulares. Sin embargo aún resta por saber la implicancia funcional de estos apéndices tan particulares.

Antecedentes del grupo: MCH, sueño y estados depresivos

En el año 2003 surgieron las primeras evidencias experimentales que sugerían que la MCH estaría involucrada en la regulación del sueño (Tortero et al. 2003). Utilizando el gato como animal experimental se demostró que las neuronas MCHérgicas proyectan a la zona ejecutiva para la generación del sueño, el núcleo pontis oralis (NPO). La microinyección de MCH en el NPO

indujo una disminución significativa de la latencia del sueño REM, y un aumento del tiempo en el que el animal pasa en este estado comportamental (Tortero et al. 2009^b). Por otra parte, en rata, la microinyección de MCH en el NDR (donde también llegan proyecciones MCHérgicas, como se dijo anteriormente) produjo un incremento en el sueño lento, en el sueño REM y también un incremento en el número de episodios REM (Lagos et al. 2009).

Como ya se mencionó, el NDR está densamente innervado por fibras MCHérgicas. Células denominadas tanicitos, ubicadas bordeando el IV ventrículo cercano al NDR del gato, presentaron inmunoreactividad positiva para la MCH. (Tortero et al. 2008). Los tanicitos son capaces de absorber sustancias del líquido cefalorraquídeo (LCR) y las transportan hacia el parénquima (Lagos et al. 2011). También se detectó la presencia de MCH en el LCR de ratas, ovejas y humanos, que en conjunto con las evidencias previamente descritas, permiten sugerir que el sistema MCHérgico estaría implicado en la regulación de la actividad de los núcleos del rafe mesopontinos a través de una vía neurohumoral, además de la neural directa por vía de la innervación MCHérgica (Ungerfeld et al. 2011; Dias Abdo Agamme et al. 2015; Noble et al. 2018).

El NDR contiene la gran mayoría de las neuronas serotoninérgicas del cerebro y posee una alta densidad del ARNm para el MCHR-1 (Saito et al. 2001^b). Además de la conexión anatómica que existe entre el sistema serotoninérgico y el sistema MCHérgico, también existe una conexión funcional. La MCH es capaz de inhibir a la mayoría de las neuronas serotoninérgicas del NDR y del núcleo mediano del rafe, ya que la aplicación de bajas concentraciones de MCH en el NDR disminuye los niveles extracelulares de serotonina en esta misma región (Urbanavicius et al. 2016). Además, microinyecciones de MCH en bajas dosis en el NDR producen un estado pro-depresivo, lo que fue confirmado mediante un test comportamental específico para evaluar efectos pro y anti-depresivos de drogas (Lagos et al. 2011). Estos indicios sugieren posibles tratamientos para la depresión y ansiedad focalizándose en el antagonismo de los MCHR-1 como blanco de modificaciones (Borowsky et al. 2002; Tortero et al. 2009^a). En otro trabajo, donde se microinyectó la MCH conjugada con rodamina (MCH-ROD) en el ventrículo lateral, se observó que el conjugado se internalizó en neuronas del NDR serotoninérgicas y no serotoninérgicas, en ratas y gatos (Devera et al. 2015). Estos datos sugieren fuertemente que estas neuronas estarían expresando receptores MCHérgicos, probablemente el MCHR-1 que es el único funcional en ratas. En segundo lugar, se demostró en ratas que la microinyección de MCH en el ventrículo lateral produce una disminución significativa en la frecuencia de disparo en el 59% de las neuronas registradas en el NDR. Algunas de las neuronas afectadas por MCH eran probablemente serotoninérgicas en función de sus propiedades electrofisiológicas y farmacológicas (Devera et al. 2015).

Considerando las evidencias expuestas, y a pesar de los grandes avances que se han realizado en el estudio de los efectos de la MCH y el MCHR-1, queda al descubierto la falta de evidencia de la presencia endógena del MCHR-1 en el SNC de la rata y en particular en el NDR, núcleo de nuestro particular interés. Por otra parte también se desconoce sobre qué fenotipos neuronales se expresa, y si, como fue evidenciado con otros preparados biológicos, se expresa en la cilias primarias o no de dichas células.

Hipótesis

En base a las evidencias previas presentadas, nuestra hipótesis es que el MCHR-1 se encontrará en los sitios donde se observa una gran densidad de fibras MCHérgicas, en particular en el NDR. Además, a nivel celular, es posible que se encuentre a nivel de las cilias primarias e hipotetizamos que debido a la interacción funcional entre el sistema MCHérgico y serotoninérgico, el MCHR-1 se encontrará presente en neuronas serotoninérgicas del NDR, aunque no descartamos su presencia en otros fenotipos neuronales.

Objetivo general

Evidenciar la presencia del MCHR-1 mediante técnicas de IHQ e IF en el SNC de la rata, con especial énfasis en el NDR.

Objetivo específico 1: Evidenciar la presencia del MCHR-1 en el SNC, particularmente en el NDR.

Objetivo específico 2: Determinar el fenotipo neuroquímico de las neuronas del NDR que presentan el receptor.

Metodología

1. Animales

Todos los procedimientos fueron realizados de acuerdo a las normas éticas establecidas y aprobadas por el Comité de Ética en el Uso de Animales de la Facultad de Medicina (en el protocolo N° 070153-000515-13) y de acuerdo con la Ley Nacional de Experimentación Animal N° 18.611. Se tomaron las medidas necesarias para minimizar el estrés de los animales y utilizar el número mínimo necesario para obtener resultados confiables y reproducibles.

En este trabajo se utilizaron 8 ratas albinas macho adultas de la cepa Wistar de entre 250-300 gr nacidas en la Unidad de Reactivos y Biomodelos de Experimentación (URBE) de la Facultad de

Medicina. Los animales se encontraron bajo condiciones controladas de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) y con un ciclo luz-oscuridad es de 12/12 hs y con agua y comida *ad libitum*.

2. Obtención y procesamiento del tejido

Los animales fueron anestesiados con uretano (dosis 1.2 mg/Kg) administrado por vía intraperitoneal (i.p.). Luego fueron perfundidos por vía intracardiaca con NaCl 0,9% (0.225 M) e inmediatamente con el fijador paraformaldehído (PFA) (1.332 M) 4% (flujo de perfusión 25 ml/min). Los cerebros fueron disecados y fijados por inmersión en PFA 4% por 24 hrs a 4°C . Después de la fijación y previo a ser congelados, fueron crioprottegidos en una solución de sacarosa al 30 % por 48 hrs a 4°C .

Los cerebros fueron incluidos en un medio óptimo para tejido congelado (Tissue-Plus, Fisher HealthCare) y congelados en hielo seco. Los bloques se mantuvieron a -80°C hasta ser cortados. Se utilizó un crióstato (Leica, Alemania, mantenido a -22°C) para obtener cortes coronales de $30\mu\text{m}$ de espesor, representativos de distintas regiones del SNC. Los cortes fueron almacenados en criotubos con la solución anticongelante denominada Solución de Olmos, a -20°C hasta ser utilizados en los ensayos (ver figura 3). En la figura 3, se observa un esquema obtenido del atlas de Paxinos y Watson (2005) de un corte coronal de cerebro donde se encuentra marcado el NDR, una de las regiones estudiadas (cortes obtenidos entre las coordenadas -7.3 a -8.0 mm a partir de Bregma). Los cortes de hipocampo que se utilizaron se encontraron entre -2.30 a -5.30 mm de Bregma y los de estriado estaban entre -1.80 a 1.70 mm de Bregma.

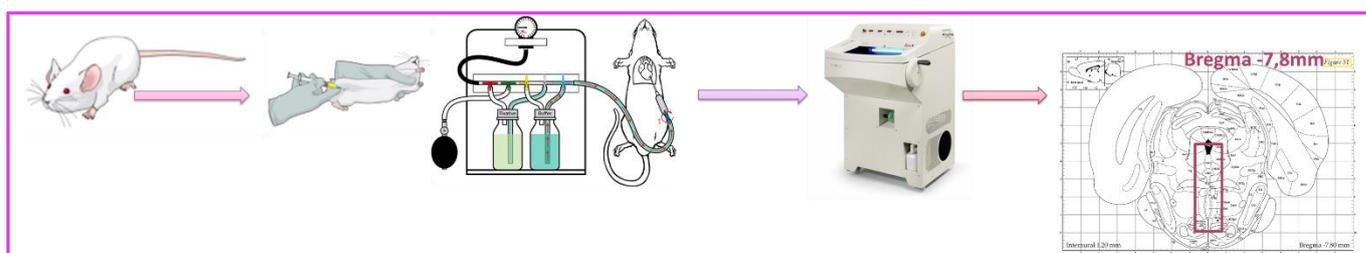


Figura 3 | Esquema de los pasos seguidos para el procesamiento del tejido previo al ensayo de las secciones por IHQ o IF. En el último cuadro se observa una imagen tomada del atlas Paxinos y Watson donde se señala el NDR, una región del SNC de gran interés para este trabajo.

3. Obtención y Procesamiento de imágenes

Las fotomicrografías se obtuvieron utilizando un microscopio de epifluorescencia (Olympus BX61-FV300) o un microscopio de escaneo láser confocal (Leica).

Las distintas secciones obtenidas con Microscopía confocal (*stacks*) se tomaron de un espesor de entre $0.5 - 1.55 \mu\text{m}$ y se tomaron entre 8-14 secciones por corte.

Las imágenes se procesaron con Photoshop (Adobe Systems, EE. UU.) Para ajustar el contraste y el brillo, y realizar las figuras se utilizó el software Adobe Illustrator.

4. Ensayos de Inmunohistoquímica

Se puede encontrar en el anexo la tabla 2 que contiene los anticuerpos tanto primarios como secundarios utilizados con sus respectivas concentraciones y compañías.

4.1. Protocolo para detección del MCHR-1

Para todos los ensayos de IHQ, los cortes conteniendo la corteza cerebral, estriado, hipotálamo, hipocampo y NDR fueron ensayados en libre flotación.

El ensayo se realizó en dos grupos de cortes que sufrieron distinto tratamiento previo al procedimiento estándar a ser descrito a continuación: **condición 1:** sin tratamiento previo y **condición 2:** tratamiento denominado recuperación antigénica (RA), que consistió en la incubación en un *buffer* de citrato de sodio (concentración: 10nM, pH=6,3) por 20 minutos a 80°C, con el objetivo de exponer sitios antigénicos que normalmente se encuentran enmascarados por la fijación del tejido.

El primer paso del procedimiento estándar de inmunodetección propiamente dicho, implicó lavar los cortes (3 sesiones de 15 minutos cada una) con *buffer* fosfato salino 0,1 M (PBS). El PBS está compuesto por NaCl, KCl, Na₂HPO₄ y KH₂PO₄. Seguidamente fueron incubados (por 30 minutos) con una solución de peróxido de hidrógeno al 1% en PBS para bloquear las peroxidasas endógenas. Las secciones se volvieron a lavar con PBS de la misma manera que el primer lavado del ensayo. Luego se realizó el bloqueo de sitios inespecíficos con una solución de suero normal de burro (NDS) al 3% diluido en PBS, por 60 minutos. Luego se incubó a los cortes con el anticuerpo primario diluido en una solución de PBS y tritón al 0,3% y NDS al 1,5%. El anticuerpo primario anti-MCHR-1 (dilución 1:1000 y hecho en cabra) se incubó por 24 hrs a temperatura ambiente en agitación constante. Luego los cortes se volvieron a lavar en PBS durante 3,5,7,7 y 10 minutos. Posteriormente, se incubó el anticuerpo secundario biotinilado anti-cabra diluido en PBS y tritón al 0,3% y NDS al 1,5% por 90 minutos. Después los tejidos se lavaron nuevamente con PBS-T durante 3,5,7,7 y 10 minutos. Los 60 minutos siguientes los cortes se incubaron con el complejo-avidina-biotina con peroxidasa de rábano (kit ABC, 1:300 Vector Laboratories) diluido en PBS. Previo al revelado, los cortes se volvieron a lavar en PBS (3,5,7,7 y 10 minutos). El revelado se realizó con diaminobenzidina (DAB) y peróxido de hidrógeno, incluidos en el Kit DAB (Vector Labs) (por 10 minutos). La reacción fue finalizada colocando los cortes en H₂O destilada y previo al montaje de los cortes en las láminas se los lavó con PBS. Luego se los montó en láminas y se deshidataron. La deshidratación consiste en sumergir las láminas por 3 minutos

en agua destilada. Luego se sumergen en alcohol 95% 2 veces por 3 minutos cada uno, y se realiza lo mismo con alcohol 100%. Enseguida se sumergen en xilol por 3 minutos, y nuevamente en otra solución de xilol por 5 minutos más. Por último se los cubrió con cubreobjetos en medio de montaje Histomount (National diagnostics).

Todos los lavados, bloqueos y la incubación con los anticuerpos fueron realizados en agitación constante en agitador orbital, a menos que se indique lo contrario.

En todos los casos se realizaron controles de la especificidad de la inmunomarcación (controles negativos) omitiendo la incubación con los anticuerpos primarios correspondientes (a menos que se indique lo contrario). Además se le denomina “controles positivos” a los tejidos ensayados para obtener las distintas marcas de interés.

4.2. Protocolo para la tinción de gránulos de Nissl con pironina y tionina

Sobre las láminas en las cuales se montaron los tejidos ya ensayados por IHQ para la detección de MCHR-1, se realizaron tinciones de pironina y tionina (colorantes clásicos que marcan los gránulos de Nissl presentes en las neuronas) con el objetivo de poner en evidencia si la marca positiva para el receptor estaba presente en células neuronales.

Para la tinción de tionina, se lavaron los tejidos con agua destilada 2 veces por 2 minutos, luego se realiza la inmersión en la solución de tionina por 30 minutos. Después de sumergirlos en la solución de tionina se vuelven a lavar los tejidos con agua destilada (2 veces por 2 minutos c/u) y se produce la deshidratación del tejido (como se explicó anteriormente). Por último los cortes se montan con Histomount.

Para la tinción de pironina se lavaron los tejidos con agua destilada 3 veces por 1 minuto, luego se realiza la inmersión en la solución de pironina (1%) por 7 minutos. Los cortes se vuelven a lavar con agua destilada en las mismas condiciones que la vez anterior. Se realiza la fijación de la pironina con una sumergida en formol acético y los cortes se lavan inmediatamente en agua destilada. Luego se sumergen en alcohol 95% 2 veces por 2 minutos cada uno, y se realiza lo mismo con alcohol 100%. Finalmente se sumergen en xilol por 5 minutos, y nuevamente en el mismo por 2 minutos. Los cortes se montaron con Histomount.

Debido a que los resultados obtenidos utilizando este protocolo fueron negativos (se detallará en sección resultados), se decidió probar el efecto de la RA sobre ambas tinciones (en cortes separados). Se comparó el efecto realizando ambas tinciones a cortes sin RA (en ninguno de los dos casos los cortes sufrieron ensayos del tipo IHQ previamente).

4.3. Protocolo para detección del marcador neuronal NeuN

Con el objetivo de evidenciar la presencia del receptor en elementos neuronales, también se realizó la doble inmunomarcación con el marcador neuronal NeuN y MCHR-1, con el procedimiento de IHQ estándar, pero secuencial. En primer lugar se realizaron los lavados y bloqueos correspondientes (Descritos en el protocolo anterior) y se incubaron los tejidos con el anticuerpo primario anti-NeuN (hecho en ratón), durante toda la noche, a temperatura constante y en agitación constante. Posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario, *donkey anti-mouse* (DAM, biotinilado) y se reveló con DAB y níquel (esta combinación produce un precipitado más oscuro que se diferencia del color obtenido del revelado solamente con DAB). Luego de revelado el NeuN, se realizó sobre los mismos cortes la detección del MCHR-1, con el procedimiento ya descrito anteriormente, el cual fue revelado con DAB.

4.4. Protocolo para la detección de marcadores de las cilia primarias

Para la detección por IHQ de dos de las proteínas utilizadas ampliamente en la bibliografía como marcadores ciliares (Ledizet et al. 1987; Arellano et al. 2012 ; Li et al. 2013; Berbari et al. 2008^a; Berbari et al. 2008^b) se llevó a cabo el protocolo estándar utilizado para la detección del MCHR-1. En una primera instancia, se realizaron los ensayos por separado. Para la detección del marcador ciliar tubulina acetilada, se utilizó un anticuerpo primario (producido en ratón) anti-tubulina acetilada en dos concentraciones: 1:500 y 1:1000. Este se incubó por 24 hrs a temperatura ambiente en agitación constante. Se incubó posteriormente con un anticuerpo secundario DAM biotinilado. Para la detección de la proteína adenilato ciclasa III (AC-III) se utilizó un anticuerpo primario (realizado en conejo) anti-AC-III en dos concentraciones: 1:500 y 1:1000. Este también se incubó por 24 hrs a temperatura ambiente y en agitación constante. Luego se incubó con el anticuerpo secundario realizado en burro contra anticuerpos realizados en conejo (*donkey anti-rabbit*, DAR) biotinilado. El revelado de ambos marcadores se realizó con DAB. La reacción fue finalizada con H₂O destilada y previo al montaje de los cortes en las láminas se los lavó con PBS. Luego de montarlos y deshidratarlos se los cubrió con cubreobjetos en medio de montaje Histomount.

4.5. Protocolo para detección de neuronas 5-HT + MCHR-1

Para estudiar la presencia del MCHR-1 en neuronas serotoninérgicas, se realizó la doble inmunomarcación de los marcadores 5-HT (5-hidroxitriptamina o serotonina) y MCHR-1, mediante el procedimiento de IHQ estándar. En primer lugar se realizaron los lavados y bloqueos correspondientes (Descritos en el protocolo básico para la detección del MCHR-1) y se incubaron los tejidos secuencialmente con los anticuerpos primarios correspondientes. En

primer lugar se incubó con los anticuerpos anti-5HT (producidos en conejo) por 48 hrs, estático por la noche (a 4°C) y en agitación (a temperatura ambiente) durante el día. Luego de incubar con el DAR biotinilado y de revelar con DAB la 5-HT, se realizó el tratamiento de RA a los tejidos. Posteriormente se incubaron los tejidos con el anticuerpo primario anti-MCHR-1 por 24 hrs a temperatura ambiente y en agitación constante. Al día siguiente se incubó el DAG biotinilado, el revelado del MCHR-1 se realizó con DAB y níquel.

5. Ensayos de Inmunofluorescencia

Se puede encontrar en el anexo la tabla 3 que contiene los anticuerpos utilizados con sus respectivas concentraciones y compañías.

5.1. Protocolos para la detección del MCHR-1

5.1.1. Protocolo 1 para la detección de MCHR-1: tres condiciones de incubación del anticuerpo primario

Para todos los ensayos de IF los cortes fueron ensayados en libre flotación.

Para la detección del MCHR-1 por IF, el primer protocolo que se puso a prueba implicó 3 condiciones diferentes de incubación del anticuerpo primario, por lo que se utilizaron tres conjuntos de cortes de tejidos.

En todas las condiciones se pre-trató a los tejidos por RA y se los incubó con el mismo anticuerpo primario utilizado para el procedimiento de detección del MCHR-1 por IHQ (en PBS-T 0,3 % y NDS 1,5 %, para las tres condiciones). Previa a la incubación del anticuerpo primario y luego de la RA, los tejidos se lavaron en PBS (en tres sesiones de 10 minutos cada una). Luego de los lavados se realizó un bloqueo con una solución de Borhidruro de sodio 0,5% diluido en PBS (se produce el bloqueo de radicales libres), por 25 minutos. Se lavaron los tejidos nuevamente con PBS 0,1 M en igual número de sesiones y tiempo, que el lavado descrito anteriormente. Se realizó otro bloqueo de los sitios inespecíficos, utilizando glicina (50mM, pH=4 inactiva los grupos aldehídos libres) y albúmina de suero bovino (BSA) 0,1 % diluidos en PBS 0,1 M por 60 minutos. Previamente a ser bloqueados con NDS 1,5% en PBS por una hora, los tejidos fueron nuevamente lavados con PBS.

En la **condición 1**, los tejidos fueron incubados con el anti-MCHR-1 durante 24 hrs a temperatura ambiente y en agitación constante.

En la **condición 2**, el anticuerpo primario fue incubado por 48 hrs a 4° C y de forma estática (heladera).

En la **condición 3**, el anticuerpo primario fue incubado por 48 hrs a 4° C en agitación constante (cámara fría).

Luego de finalizada la incubación del anticuerpo primario, los cortes se lavaron en PBS-T en cinco sesiones de 3,5,7,7 y 10 minutos. Enseguida se los incubó con el anticuerpo secundario DAG conjugado al fluoróforo alexa fluo (AF) 488 (concentrado 1:1000, lo que se repite para todas las condiciones) diluido en PBS-T 0,3 % y NDS 1,5 %. Previo al montaje en las láminas, los cortes se volvieron a lavar en PBS-T en cinco sesiones de 3,5,7,7 y 10 minutos.

Debido a los resultados obtenidos en el protocolo mencionado anteriormente para la detección del MCHR-1 por IF, se realizó una prueba para estudiar la incidencia de la RA sobre la autofluorescencia del tejido. Para dicho procedimiento, un grupo de tejidos se trató por RA y otro grupo de tejidos no sufrió ningún tratamiento. Ambos grupos fueron observados al microscopio y se analizaron ambas condiciones.

5.1.2. Protocolo 2 para la detección del MCHR-1: inclusión de la azida de sodio

Otro protocolo utilizado para la detección del MCHR-1 fue el que incluyó azida de sodio en todas las soluciones utilizadas a lo largo del ensayo, además de modificarse la concentración del anticuerpo primario. Este protocolo se basó en el de Conductier et al. (2013). La azida de sodio es una sustancia que en este caso se utiliza por su acción de impedir la internalización del complejo antígeno-receptor, cuando el antígeno se encuentra en la membrana (Yale Flow Cytometry, 2018)

Los tejidos no sufrieron ningún pretratamiento como la RA y se comenzó directamente con los lavados (3 de 10 minutos cada uno) en una solución con NDS al 2%, azida de sodio al 0,02 % y 10 mg de BSA, todo estos diluidos en PBS (solución A). Luego se incubó los tejidos en Tritón al 0,2% diluido en la solución A, lo que forma la solución B, por 60 minutos (para permeabilizar). Seguido a esto se incubó el anticuerpo primario, anti-MCHR-1 (más concentrado que el ensayo anterior) diluido en la solución B, por 24 hrs en agitación constante y a 4°C.

Al día siguiente se realizaron lavados de 3,5,7,7 y 10 minutos en la solución A. Luego de los lavados se incubó el anticuerpo secundario DAG conjugado al fluoróforo AF488, diluido en la solución B, por 60 minutos a temperatura ambiente. Previo al montaje los cortes se volvieron a lavar en la solución A.

Se realizó una variante del ensayo anterior, llevando a cabo los pasos del mismo exactamente de la misma manera que el protocolo anterior, excepto la incubación del anticuerpo secundario.

El DAG- AF488 esta vez fue incubado en dos concentraciones más diluidas que la del ensayo anterior.

5.1.3. Protocolo 3 para la detección de MCHR-1: amplificación de la señal

Para dicho protocolo se vuelven a ensayar dos grupos de tejidos, un grupo sometido a RA y otro que no es pretratado. Se realiza un procedimiento de IF indirecta, en el cual se sustituye el anticuerpo secundario conjugado con un fluoróforo por la incubación de un anticuerpo secundario biotinilado (DAG) y luego se incubó con streptavidina conjugada a un fluoróforo (en este caso el fluoróforo es 555). La dilución de la misma se realizó en PBS y se dejó incubando por 2 hrs y media a temperatura ambiente. Luego, los cortes se lavaron en PBS (3 sesiones de 15 minutos c/u) y se montaron con Vectashield (con DAPI). La streptavidina permite la formación de un complejo con la biotina del anticuerpo secundario biotinilado, lo que permite una amplificación de la señal emitida. Esta técnica permite aumentar la sensibilidad de un protocolo básico de IF y llevarlo a un nivel de sensibilidad similar al de los ensayos de IHQ que son revelados con el kit ABC.

5.1.3.1. Protocolo 3.1 para la detección de MCHR-1: evaluación de los controles negativos.

El primer control negativo de los ensayos, fue el ya realizado para todos los protocolos descritos hasta ahora, con omisión del anticuerpo primario, y con la incubación del anticuerpo secundario y de la streptavidina conjugada a fluoróforo. El segundo control se realizó incubando el anticuerpo primario, se omitió el anticuerpo secundario y se incubó con streptavidina. Finalmente en el tercer control negativo, se incubó anticuerpo primario y secundario pero se omitió la streptavidina.

5.2. Protocolos para la detección del marcador neuronal NeuN

5.2.1. Protocolo 1 para la detección de NeuN y MCHR-1

Para la detección de dos antígenos en paralelo, el marcador neuronal NeuN y los receptores MCHR-1 utilizamos como protocolo base el protocolo 3 (ítem 5.1.3) para la detección del MCHR-1. Se pretrató a los tejidos por RA y la incubación de los anticuerpos primarios fue secuencial, en primer lugar se incubó con el anticuerpo anti-NeuN por 48 hrs a 4°C y en agitación constante. A las 24 hrs de incubación del anti-NeuN se incubó con el anticuerpo anti-MCHR-1, en su concentración habitual. En el día tres se hizo el revelado de ambos antígenos con DAM AF488 (para el anti-NeuN) y el DAG biotinilado y la streptavidina 555 (para el anti-MCHR-1).

5.2.2. Protocolo 2 para la detección de NeuN y MCHR-1

Para la detección de estos dos antígenos, NeuN y MCHR-1 se utilizó el protocolo 1 de detección del MCHR-1 (ítem 5.1.1) como base para la detección del marcador NeuN por IF. En este caso, luego de los lavados y bloqueos que ya fueron detallados anteriormente en este protocolo, se incubó con el anticuerpo primario anti-NeuN (más diluido que el ensayo anterior) por 24 hrs a 4°C. Al día siguiente, se realizó el revelado con el anticuerpo secundario, DAM AF488 y posteriormente se realizó la RA en los tejidos y se inició el protocolo 3 para la detección del MCHR-1 por IF, ya mencionado en el ítem 5.1.3 (la incubación fue por 24 hrs a 4 °C).

5.3. Protocolos para la detección de marcadores ciliares

5.3.1. Protocolo para la detección de tubulina acetilada

Para poder realizar la doble inmunodetección de dos antígenos, y lograr la colocalización, en este caso el MCHR-1 y la tubulina acetilada se tomó como protocolo base el protocolo 3 para la detección del MCHR-1 (amplificación de señal, ítem 5.1.3).

En este caso, la incubación de los anticuerpos primarios fue realizada en forma simultánea. El anticuerpo anti-tubulina acetilada fue incubado en la concentración de 1:500 y el secundario que lo reconoció fue el DAM 488 (concentrado 1:1000).

Una variante del ensayo anterior que también fue realizada, fue la modificación del tiempo de incubación del anticuerpo primario anti-tubulina acetilada, el cual fue 48 hrs a temperatura ambiente. Además se probó una concentración más diluida del anticuerpo primario y para el revelado se utilizó DAM biotinilado, concentrado 1:600) y streptavidina conjugada a un fluoróforo (AF488, 2,5 hrs).

5.3.2. Protocolo para la detección de ARL13B y ACIII

Para este protocolo se utilizaron otras dos proteínas utilizadas como marcadores ciliares: ARL13B y AC-III (que había sido utilizado ya para la detección de las cilias primarias por IHQ).

Tomando como base el protocolo 3 de detección del MCHR-1 (ítem 5.1.3), ambos anticuerpos primarios se probaron en dos concentraciones y en cortes separados. La incubación de los anticuerpos primarios fue por 48 hrs a 4°C estático por la noche. El anticuerpo primario (hecho en cabra) anti-ARL13B se incubó en las concentraciones 1:500 y 1:2000, mientras que el anticuerpo primario (hecho en conejo) anti-ACIII se incubó en las concentraciones, 1:500 y

1:1000. Luego se incubaron los anticuerpos secundarios biotinilados DAG y DAR para realizar nuevamente una amplificación de señal, por lo que se reveló con streptavidina-AF555.

5.4. Protocolo para la detección concomitante del MCHR-1 y AC-III

Se realizó el pretratamiento en los tejidos por RA y se llevó a cabo el protocolo 3 para la detección del MCHR-1 (ítem 5.1.3). El revelado del antígeno se llevó a cabo con la streptavidina conjugada a FIT-C, puesta a punto anteriormente. Luego del revelado se incubó el anticuerpo primario anti-ACIII por 48 hrs a 4°C estático (y en agitación por el día). Por último se incubaron los tejidos con DAR biotinilado y se hizo el revelado con streptavidina conjugada a AF555.

Una variante del ensayo anterior, fue la modificación del revelado del MCHR-1, el cual se hizo con la streptavidina conjugada a AF488.

5.5. Protocolos para la detección del fenotipo serotoninérgico

5.5.1. Protocolo 1 para la detección de neuronas serotoninérgicas y el MCHR-1

Para poder realizar la doble inmunodetección de los antígenos, en este caso el MCHR-1 y la serotonina se tomó como protocolo base el protocolo 3 para la detección del MCHR-1 (amplificación de señal) (ítem 5.1.3).

Se realizó la incubación simultánea de ambos anticuerpos primarios ya utilizados, el anti-MCHR-1 y el anti-5HT (realizado en conejo, concentración 1:500 y 1:1000), por 24 hrs, a temperatura ambiente y en agitación constante. Al día siguiente se incubaron los anticuerpos secundarios correspondientes, DAG biotinilado para luego revelarlo con streptavidina AF555 y detectar el MCHR-1 y DAR-AF488 para detectar las neuronas 5-HT.

5.5.2. Protocolo 2 para la detección de neuronas serotoninérgicas y el MCHR-1

Esta vez para realizar la doble inmunomarcación se incubaron los anticuerpos primarios en forma secuencial. Siguiendo el protocolo 1 básico de IF (ítem 5.1.1), se incubó en primer lugar el anticuerpo primario anti-5HT (de distinto huésped, este fue realizado en cabra, concentraciones utilizadas: 1:250 y 1:500) por 48 hrs estático a 4°C. Este fue revelado con DAG conjugado a AF488. Luego se realizó la RA a los tejidos y se realizó el protocolo 3 para la detección del MCHR-1 (ítem 5.1.3).

5.5.3. Protocolo 3 para la detección de neuronas serotoninérgicas y el MCHR-1

Utilizando como base el protocolo 2 pero utilizando el anticuerpo primario anti-5HT hecho en conejo (concentrado 1:500). Luego de revelar el anti-5HT con DAR AF488 se realizó la RA a los tejidos y se ensayó el protocolo 3 para la detección del MCHR-1 (ítem 5.1.3). En el momento de incubación del MCHR-1, se volvió a re incubar con el anti-5HT (concentrado 1:250) y se hizo el revelado simultáneo de ambos antígenos.

5.6. Protocolo para la detección de neuronas GABAérgicas y MCHR-1

Se realizó el ensayo sobre dos grupos de tejidos, el grupo 1 fueron cortes sin ningún tratamiento previo, mientras que el grupo 2 fueron cortes de ratas pre-tratadas con inyecciones de colchicina en el ventrículo lateral (cedidos gentilmente por la Dra. Jessika Urbanavicius del IIBCE). La colchicina es un inhibidor del transporte anterógrado, que actúa desestabilizando los microtúbulos del citoesqueleto celular y permite la acumulación de sustancias en el soma, por ejemplo permite concentrar la enzima de síntesis del aminoácido GABA, la GAD-67 y así facilitar la detección de las neuronas con este fenotipo neuroquímico.

Para la detección de las neuronas GABAérgicas se utilizó como base el protocolo 1 de IF (ítem 5.1.1), se incubó el anti-GAD67 (realizado en ratón) por 48 hrs a 4°C y en agitación constante. Este se reveló con el DAM conjugado a AF488. Luego de verificar que existían marcas positivas, se realizó RA en los tejidos y se incubó el anti-MCHR-1 (en su concentración ya conocida) y se re-incubó el anti-GAD 67 por 24 hrs a temperatura ambiente y agitación constante. Para el revelado del MCHR-1 se siguió el protocolo base número 3, el revelado del GAD-67 se realizó en las mismas condiciones que la primera incubación.

Resultados

1. Identificación del MCHR-1 por inmunohistoquímica

Para la detección del MCHR-1 por IHQ se utilizó el protocolo 1 (ver materiales y métodos, ítem 4.1). Para este ensayo se utilizaron cortes coronales de cerebro de rata donde estaban representadas varias estructuras del SNC, como la corteza cerebral, el hipotálamo y el NDR. Los cortes se dividieron en dos grupos que representaron dos condiciones: **condición 1**: no sufrieron ningún tratamiento previo, por lo que se realizó el ensayo tal como fue descrito anteriormente en los métodos; **condición 2**: los cortes se sometieron al tratamiento de RA.

En la figura 4 se observan imágenes representativas de cortes de corteza cerebral que se sometieron a la **condición 1**. En dicho ensayo no se obtuvieron las marcas positivas esperadas (como las observadas en los trabajos previos de Berbari y su grupo, por la técnica de IF), sino que se observó un suave *background* amarronado (producto del depósito inespecífico de la DAB) (ver figura 4A). El tejido utilizado como control negativo no mostró *background* ni ningún tipo de marca positiva que se haya podido evidenciar (ver figura 4B).

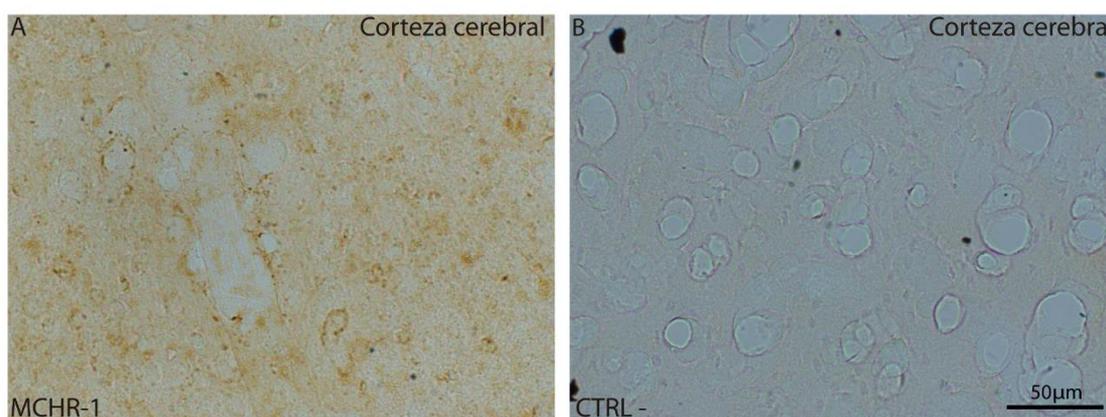


Figura 4| Fotos representativas de el ensayo de Inmunohistoquímica para detectar el MCHR-1 en cortes coronales de corteza cerebral (SRA). A- Control positivo a 20x, B-Control negativo (CTRL -) a 20x.

El grupo de tejidos que fue sometido a la **condición 2** presentó la reacción positiva esperada en distintas regiones del SNC, como por ejemplo en la corteza cerebral (figura 5A), estriado (5B), hipotálamo (5C) y NDR (5D). La marca positiva correspondiente al MCHR-1 se observó como una marca alargada, fina y pequeña (de aprox. 10 µm de largo), que en ocasiones se encontraba más bien rectilínea y en otras estaba más curvada (señalada con puntas de flecha). Por su tamaño y disposición, se podría decir que no se encontró en el soma, sino que estaba presente en un apéndice celular. También se observó la presencia del receptor a nivel de los vasos sanguíneos (figura 5A, delineado con líneas punteadas), sin embargo en estos casos, la marca observada fue similar a un “puntilleo”. En los controles negativos (inset en figura 5D) no se observaron marcas positivas, lo cual nos asegura que la marcación en los controles positivos fue realmente específica. De acuerdo a los resultados obtenidos para ambas condiciones, determinamos como protocolo válido para la detección del MCHR-1 por IHQ la **condición 2**, en donde se realizó el pretratamiento por RA, pues fue con el cual se logró poner en evidencia el receptor de forma específica.

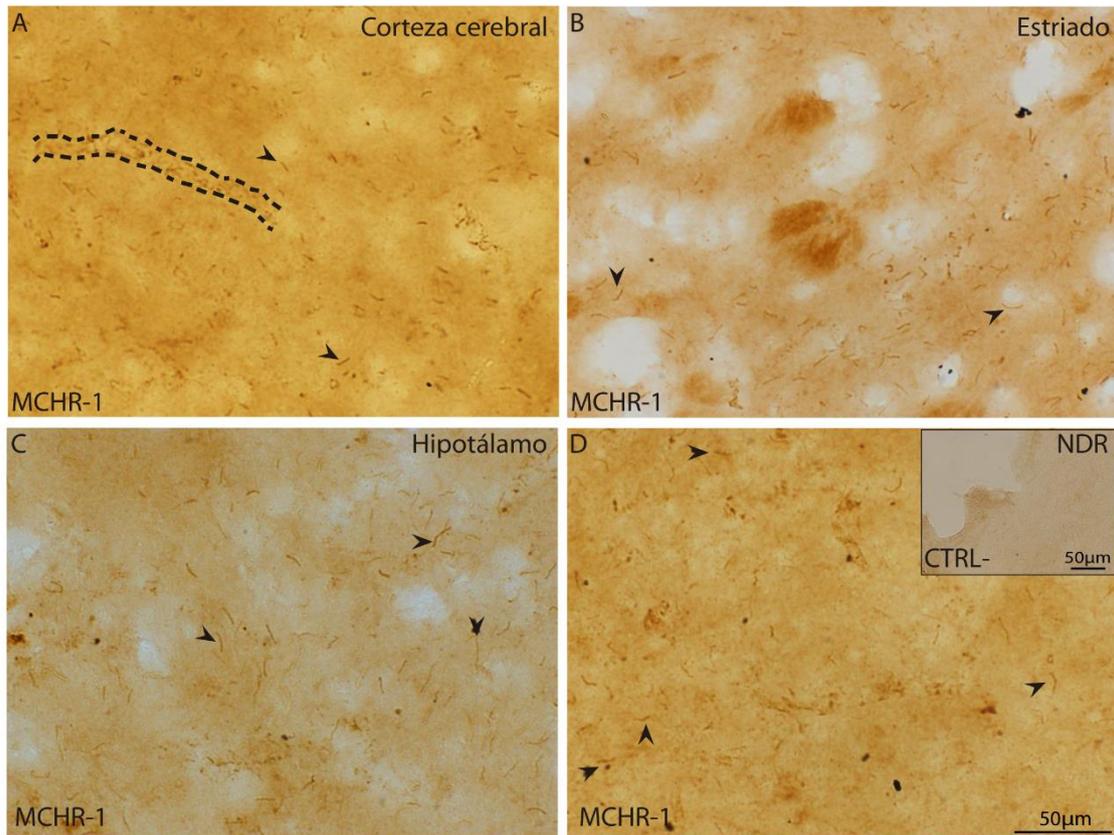


Figura 5| Fotos representativas del ensayo de Inmunohistoquímica para detectar el MCHR-1 en cortes coronales de distintas regiones del SNC (en tejidos CRA). Las marcas positivas para el MCHR-1 se encuentran señaladas con las cabezas de flechas negras. A- Corte de corteza cerebral a 20x, además de las marcas positivas para el MCHR-1 ubicadas en un apéndice extracelular, también se observan marcas positivas en un vaso sanguíneo (delineado con negro). B- Corte de estriado a 20x. C-Corte de hipotálamo a 20 x. D-Corte de NDR a 20x, con inset que representa el control negativo.

2. El MCHR-1 en un contexto celular

Los resultados obtenidos que fueron mostrados en la figura 5, sugieren que el MCHR-1 se encontraba a nivel de un apéndice celular. Como no se detectó la presencia del receptor a nivel del soma, se decidió ensayar cortes (previamente habiéndoles realizado una IHQ para la detección del MCHR-1) con tinciones histológicas comunes que marcaran los gránulos de Nissl. Estas estructuras están presentes en el citoplasma del soma de neuronas, y las utilizamos para evidenciar la presencia del receptor en neuronas y no en otros tipos celulares.

Sobre cortes donde ya se había realizado una IHQ para la detección del MCHR-1, se dividieron en dos grupos y se realizaron tinciones con pironina o tionina (colorantes que evidencian los gránulos de Nissl). Sin embargo, ninguna de las dos tinciones funcionaron en los cortes ya ensayados por IHQ, por lo cual no fue posible contextualizar la marca del MCHR-1 (resultados no mostrados).

Como ya se mencionó, el protocolo de detección del MCHR-1 por IHQ requirió el pretratamiento de los tejidos por RA. Debido a los resultados negativos con las tinciones de Nissl, se decidió

probar solamente el efecto de este pretratamiento sobre los tejidos y sobre dichas tinciones. Se tomaron dos grupos de cortes, al primero se les realizó las tinciones de pironina y tionina (sin ningún pre-tratamiento ni ensayo previo), y al segundo grupo se les realizó el pre-tratamiento por RA y luego fueron sometidos a las tinciones ya nombradas. Los resultados obtenidos muestran que en dos regiones del SNC como el hipocampo y NDR, en los cortes sin ningún pre-tratamiento, ambas tinciones se fijaron correctamente, observándose las neuronas marcadas en rosado para pironina y en celeste-azulado para tionina (figura 6, A1,A2,B1,B2).

Sin embargo, sobre cortes con el pretratamiento RA, ambas tinciones se visualizaron de manera muy ténue tanto en el hipocampo (resultados no mostrados) como en el NDR (figura 6, A3 y B3).

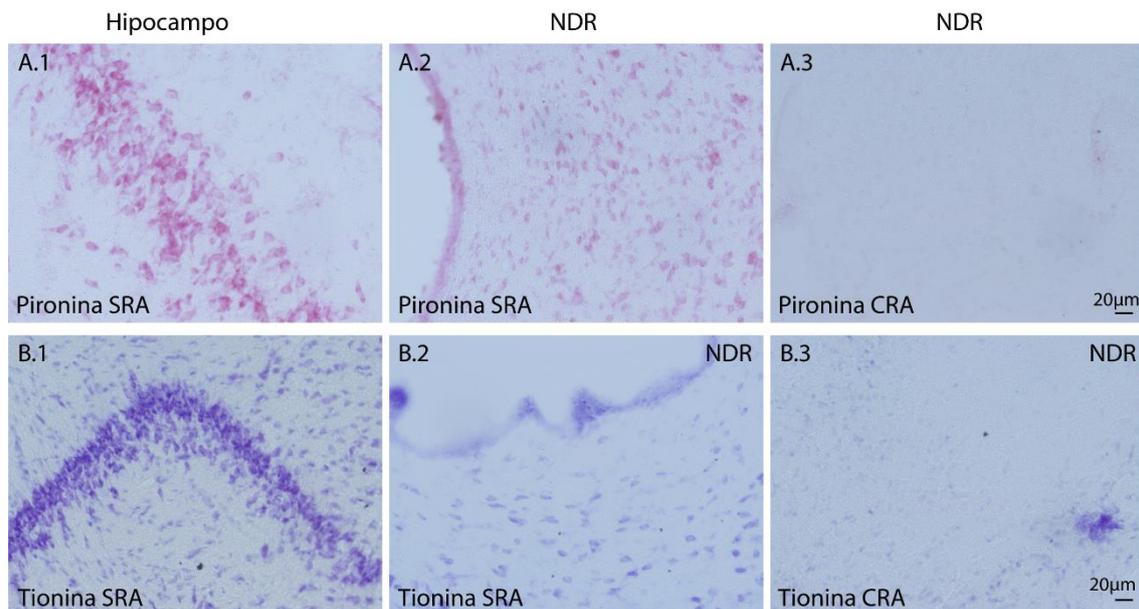


Figura 6| Fotos representativas del protocolo de las tinciones de pironina y tionina en cortes CRA y SRA.. A.1- Corte coronal de Hipocampo, como control positivo de la tinción pironina, SRA. A.2- Corte coronal de NDR, como control positivo de la tinción pironina, SRA. A.3- Corte coronal de NDR, como control positivo de la tinción pironina, CRA. Fotos tomadas a 40x. B.1- Corte coronal de Hipocampo, como control positivo de la tinción tionina, SRA. B.2- Corte coronal de NDR, como control positivo de la tinción tionina, SRA. B.3- Corte coronal de NDR, como control positivo de la tinción tionina, CRA. Fotos tomadas a 40x.

Debido a que evidenciamos que efectivamente la RA afectó la fijación de los colorantes pironina y tionina en los tejidos, se decidió realizar una IHQ para detectar un marcador neuronal y poder cumplir el objetivo de contextualizar la localización celular del MCHR-1. Para esto llevamos a cabo una IHQ para la detección del marcador neuronal NeuN y a la vez la detección del MCHR-1 (para esto fue necesario nuevamente pretratar a los tejidos por RA). Para la visualización del marcador NeuN se reveló la reacción con DAB y se la intensificó con el agregado de Níquel, para observar las neuronas (a través del marcador ya nombrado) en un color azul oscuro. Sin embargo, luego de estos ensayos, obtuvimos la marca azulada correspondiente al NeuN, pero no se obtuvieron marcas positivas para el MCHR-1 (ver figura 7). En las dos estructuras elegidas para llevar a cabo el ensayo, nuevamente el hipocampo y el NDR, las marcas del NeuN delimitaron claramente los somas neuronales, y como ya se mencionó, la marca del MCHR-1 no se observó, pero si se obtuvo un background ligeramente amarronado. Además, en los cortes de NDR, se observó también a nivel del borde del acueducto de Silvio un puntillado (figura 7, A2) similar al observado en los vasos sanguíneos del primer ensayo (ver figura 5A).

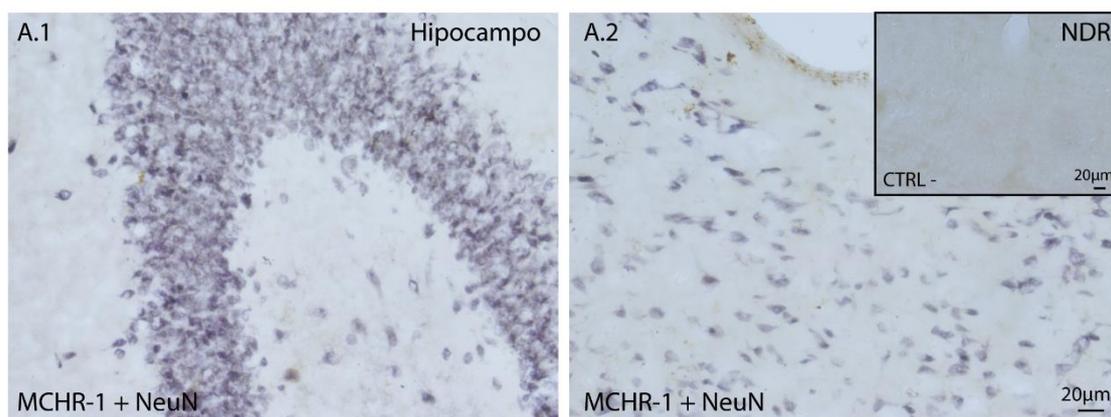


Figura 7| Fotos representativas del protocolo de Inmunohistoquímica para la doble detección del MCHR-1 y NeuN en cortes coronales de Hipocampo y NDR. A.1- Control positivo de MCHR-1 + NeuN, en un corte de Hipocampo. A.2- Control positivo de MCHR-1 + NeuN en un corte de NDR. Posee un inset con el control negativo. Las fotos fueron tomadas a 40x.

3. Localización sub-celular del MCHR-1 por inmunohistoquímica

En los resultados obtenidos, se observó que el MCHR-1 se localizó en un apéndice celular. Está descrita la presencia de apéndices en neuronas denominados cilias primarias, ya mencionadas anteriormente. También se encuentra reportado que varios GPCRs, incluido el MCHR-1 se localizan allí.

Teniendo en cuenta lo dicho anteriormente, el siguiente paso del análisis fue identificar marcadores ciliares por IHQ con el objetivo de poder realizar una futura co-localización con el MCHR-1 por IF. Se utilizaron dos marcadores ciliares en dos concentraciones distintas, las proteínas tubulina acetilada y adenilato ciclase III (ACIII). Para ambos marcadores se realizó el

procedimiento de IHQ estándar (ver métodos), similar al que se utilizó para la detección del receptor.

Para la tubulina acetilada, se obtuvo una reacción positiva para ambas concentraciones de anticuerpo primario utilizadas, donde tomamos como región representativa el NDR por la gran concentración del MCHR-1 que ya fue observada (ver figura 8). Nuevamente el control negativo no presentó reacción positiva, por lo que nos indicó que la reacción fue específica. No se observaron diferencias de nitidez ni de morfología entre las marcas obtenidas para ambas concentraciones. De aquí en más seleccionamos el protocolo con la concentración de anticuerpo primario más diluida, con el fin de efectivizar el uso de las sustancias.

La morfología de las marcas fue muy similar a las observadas para el MCHR-1. Las cilias primarias se observaron de forma muy clara, eran de tamaño pequeño y alargadas, se observaron en el NDR, y además en la corteza cerebral, en el hipotálamo y el hipocampo, donde estaban en gran densidad (ver figura 9).

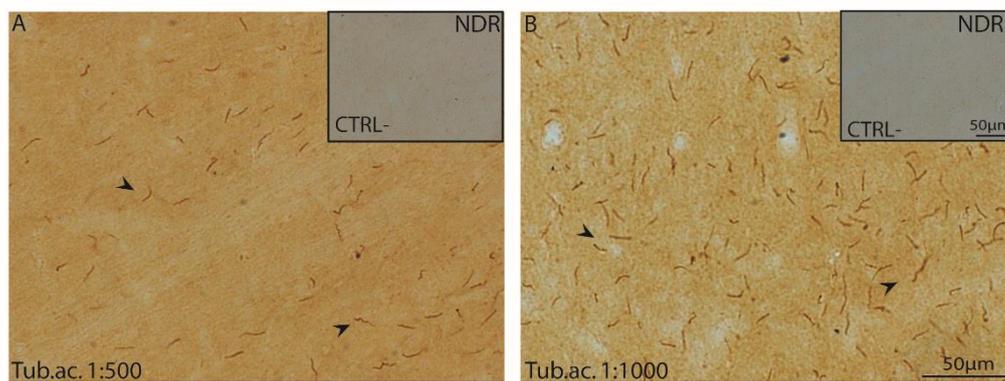


Figura 8| Fotos representativas del ensayo de Inmunohistoquímica para detectar tubulina acetilada en cortes coronales de NDR. Las cabezas de flecha señalan marcas positivas para la tubulina acetilada. A- Control positivo de tubulina acetilada, donde el anticuerpo primario está concentrado 1:500. B- Control positivo de tubulina acetilada, donde el anticuerpo primario está concentrado 1:1000. Ambas imágenes fueron tomadas a 20x y poseen un inset que corresponde a los controles negativos.

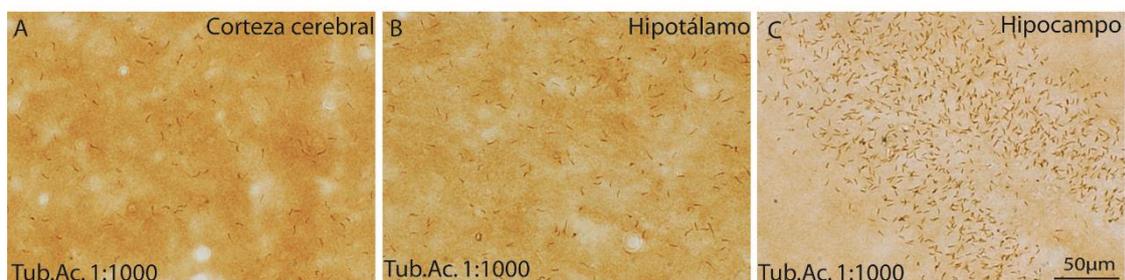


Figura 9|Fotos representativas del ensayo de Inmunohistoquímica para detectar tubulina acetilada en cortes coronales de distintas regiones del SNC. A- Control positivo de tubulina acetilada en la Corteza cerebral. B- Control positivo de tubulina acetilada en el Hipotálamo. C- Control positivo de tubulina acetilada en el Hipocampo. Todos los cortes fueron ensayados con la misma concentración del anticuerpo primario, 1:1000. Las fotos fueron tomadas con el objetivo de 20x.

En los cortes ensayados para la detección del otro marcador, ACIII, no se observaron marcas que delimitaran ningún tipo de estructura conocida, para ninguna de las dos concentraciones utilizadas del anticuerpo primario. No fueron probadas otras condiciones de ensayo por IHQ con este marcador. Se observó un intenso background amarronado producto del revelado con DAB (ver figura 10).

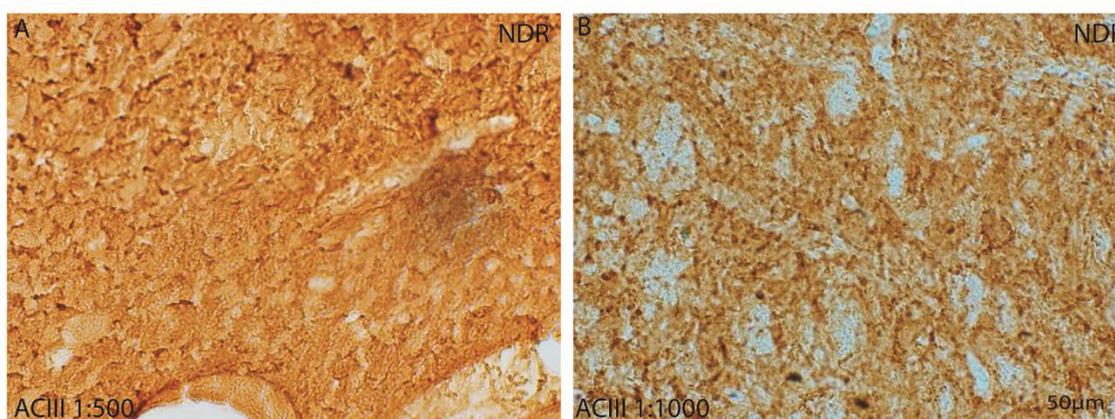


Figura 10| Fotos representativas del ensayo de Inmunohistoquímica para detectar adenilil ciclasa III (ACIII) en cortes coronales de NDR. A-Control positivo de ACIII, donde el anticuerpo primario está concentrado 1:500. B- Control positivo de ACIII, donde el anticuerpo primario está concentrado 1:1000. Las fotos fueron tomadas con el objetivo de 20x.

4. Identificación del MCHR-1 por inmunofluorescencia- Protocolo 1

Debido a que logramos identificar el MCHR-1 por IHQ e identificar las cilias primarias utilizando uno de los marcadores ciliares por la misma técnica, fue posible comenzar los ensayos de identificación del MCHR-1 por IF (con el objetivo de realizar futuros ensayos de colocalización). Para la detección del MCHR-1 por IF, se probó en primer lugar, el protocolo 1 de IF básico con 3 condiciones (ítem 5.1.1). Las 3 condiciones son variantes a nivel de la incubación del anticuerpo primario. En la **variante 1** se incubó el anti-MCHR1 por 24 hrs a temperatura ambiente y en agitación constante (resultados no mostrados). En la **variante 2** se incubó el anti-MCHR-1 por 48 hrs en agitación constante y a 4 °C. En la **variante 3** se incubó el anti-MCHR-1 por 48 hrs estático y a 4 °C.

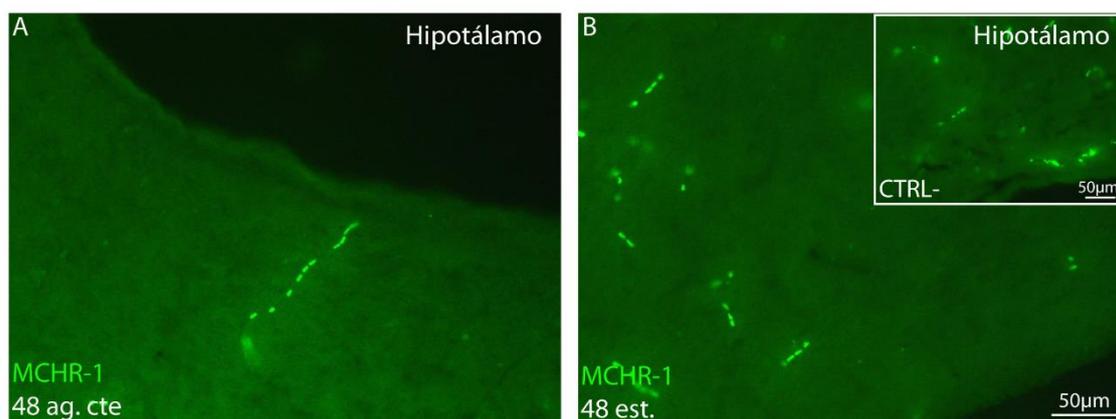


Figura 11| Fotos representativas del protocolo 1 de Inmunofluorescencia para la detección del MCHR-1 en cortes coronales de hipotálamo. A- Control positivo de MCHR-1 para la condición 2 de incubación del anticuerpo primario (48 hrs en agitación constante a 4°C). B- Control positivo de MCHR-1 para la condición 3 de incubación del anticuerpo primario (48 hrs estático a 4°C), con inset de control negativo. Las fotografías fueron obtenidas con Microscopía de Epifluorescencia utilizando el objetivo de 20x.

En ninguna de las tres condiciones de incubación se observó la marca esperada (marca similar a la obtenida en los ensayos de IHQ) y en ninguna de las estructuras presentes en los cortes (como NDR, tronco encefálico, hipotálamo, hipocampo y corteza). Se eligieron fotos representativas de hipotálamo de las **variantes 2 y 3** donde se observan marcas intensas y nítidas, con una morfología similar a eritrocitos. Estas marcas se observaron tanto en los controles positivos como en los negativos, por lo cual sospechamos que no tiene relación con el anticuerpo primario y fue inespecífica (ver figura 11).

5. Verificación de la autofluorescencia del tejido

En el ensayo anterior, además de que la marca no fuera la esperada, también se observaron marcas en el control negativo, donde no debería haber ocurrido la reacción (ya que el anticuerpo primario no está presente). Para verificar la especificidad de nuestro ensayo, nos planteamos la hipótesis de que las marcas fluorescentes observadas en el tejido eran debidas a autofluorescencia, y de que la misma se incrementó con el pre-tratamiento (RA) que los tejidos sufrieron.

Para poner a prueba nuestra hipótesis, seleccionamos tejidos de dos animales diferentes que se dividieron en dos grupos. Al primer grupo se lo sometió a RA y al otro no se le realizó ningún tratamiento. Ambos grupos de cortes fueron observados al microscopio de epifluorescencia sin realizarles ninguna tinción, esto permitió observar el efecto producido como consecuencia de la RA. Así fue que, en los cortes que no sufrieron ningún tratamiento no se observa ningún tipo de marca fluorescente (ver figura 12 C1 y C2), mientras que los que sí fueron sometidos a RA, se

observa una marca muy similar a la observada en el ensayo anterior. La marca obtenida se observa tanto con el filtro 555 (Figura 12 A1 y A2), como en el filtro 488 (ver figura 12 B1 y B2). Se puede concluir al comparar ambos tipos de cortes, los tratados y los no tratados, que la RA acentúa la autofluorescencia que el tejido posee intrínsecamente.

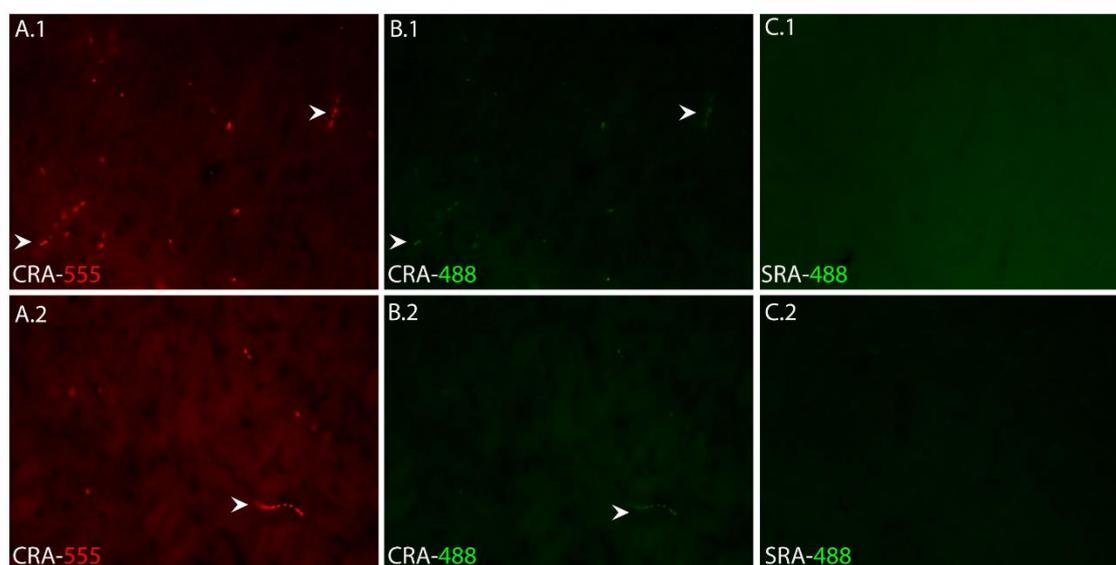


Figura 12| Fotos representativas de la prueba de autofluorescencia de tejido. A.1- Tejido CRA observado con el filtro rojo (rata 1). B.1- Tejido CRA observado con el filtro verde (rata 1, mismo corte que en A.1). C.1- Tejido SRA observado con el filtro verde (rata 1). A.2- Tejido CRA observado con el filtro rojo (rata 2). B.2- Tejido CRA observado con el filtro verde (rata 2, mismo corte que en A.2). C.1- Tejido SRA observado con el filtro verde (rata 2). Las fotografías fueron obtenidas con Microscopía de Epifluorescencia utilizando el objetivo de 20x.

6. Identificación del MCHR-1 por inmunofluorescencia- Protocolo 2

Teniendo en cuenta el resultado obtenido con la prueba de la autofluorescencia y la RA, nos planteamos el protocolo 2. En dicho protocolo los tejidos no sufrieron ningún tratamiento previo, pero la modificación que introdujimos fue la utilización de la azida de sodio (ver métodos, ítem 5.1.2) en varias de las etapas del protocolo de IF estándar: lavados, bloqueos e incubaciones de anticuerpos. Los resultados de dicho ensayo, se muestran en la figura 13. En todas las estructuras representadas en los cortes elegidos para ensayar, (corteza, colículos, tronco encefálico y el NDR) las marcas positivas no delimitaron estructuras. Las imágenes elegidas como representativas del ensayo corresponden al NDR y en el control positivo se observaron marcas en forma de puntos que no siguen ningún patrón de distribución, pero presentaron una gran intensidad de fluorescencia (ver figura 13 A). Los controles negativos no presentaron marcas, por lo que pudimos confirmar la especificidad de la reacción del anticuerpo primario (Ver figura 13 B).

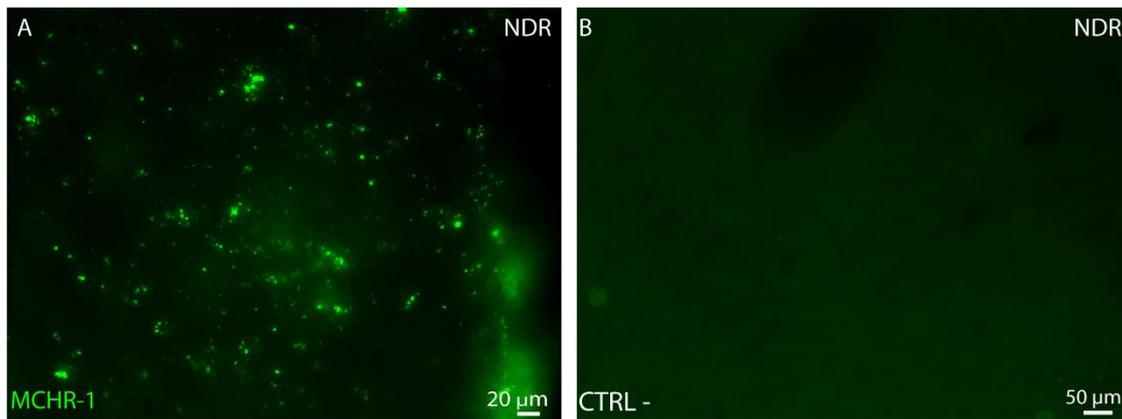


Figura 13| Fotos representativas del protocolo 2 para detectar el MCHR-1 en cortes coronales de NDR. A- Control positivo para el MCHR-1 a 40x. B- Control negativo a 20x. Fotografías obtenidas con Microscopía de Epifluorescencia.

En base a la marca que se observó en los resultados del ensayo anterior, nos planteamos una variante del protocolo 2. En esta variante se decidió probar dos concentraciones más diluidas de los anticuerpos secundarios, debido a la intensidad de la marca que presentaban los resultados del protocolo 2.

Los resultados se observan en la figura 14. En los tejidos incubados con el anticuerpo secundario conjugado al fluoróforo AF488 y concentrado 1:500, se observó una mayor cantidad de marcas y una mayor intensidad de las mismas en todas las estructuras representadas: hipotálamo e hipocampo (no mostrados), NDR (ver figura 14 A1, con inset a mayor aumento), corteza (ver figura 14 A2, con inset a mayor aumento). En las regiones seleccionadas y fotografiadas, las marcas observadas tampoco se asemejaron a estructuras conocidas o definidas y son similares al “punteo” fluorescente que ya fue observado en el ensayo 2 (figura 13).

En los tejidos incubados con el anticuerpo secundario conjugado al fluoróforo AF488 y concentrado 1:1000 se observó el mismo tipo de marca (ver figura 14 C1 y D1, ambas con inset a mayor aumento). Sin embargo los puntos se observaron en menor número y con menor intensidad que en los tejidos incubados con 1:500. Los controles negativos no presentaron marcas (no mostrado).

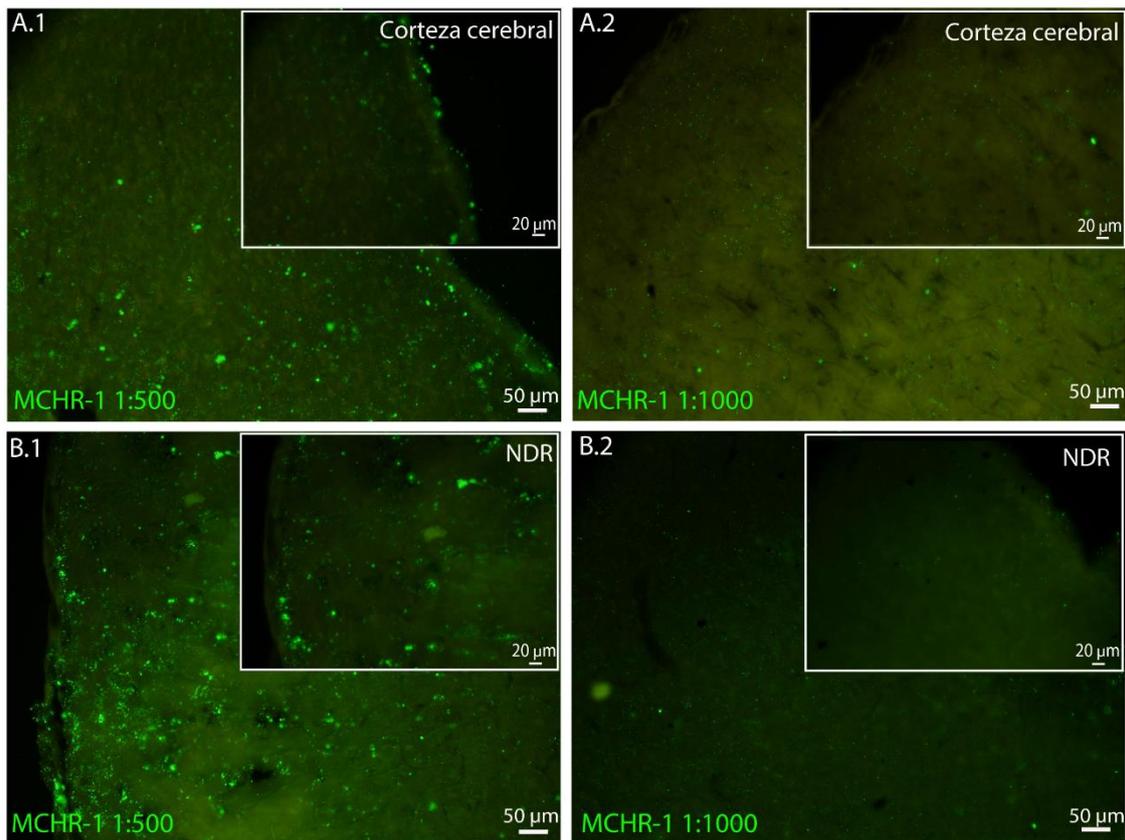


Figura 14| Fotos representativas del protocolo 2.1 para detectar el MCHR-1 en cortes coronales de dos regiones del SNC. A.1- Control positivo para el MCHR-1 en la corteza cerebral a 20x con el anticuerpo primario concentrado 1:500 (con inset de región aumentada a 40x). A.2- Control positivo para el MCHR-1 en la corteza cerebral a 20 x con el anticuerpo primario concentrado 1:1000 (con inset de región aumentada a 40x). B.1- Control positivo para el MCHR-1 en NDR a 20x con el anticuerpo primario concentrado 1:500 (con inset de región aumentada a 40x). B.2- Control positivo para el MCHR-1 en NDR a 20 x con el anticuerpo primario concentrado 1:1000 (con inset de región aumentada a 40x). Fotografías obtenidas con Microscopía de Epifluorescencia.

7. Identificación del MCHR-1 por inmunofluorescencia- Protocolo 3

El protocolo 3 (ítem 5.1.3), al que denominamos “IF con amplificación de señal”, utilizamos dos grupos de tejidos. El primer grupo lo formaron tejidos sin ningún tratamiento previo, el otro lo formaron tejidos que fueron sometidos a RA. En los tejidos sin tratar no se observaron marcas positivas para estructuras conocidas. Lo que si se observó es el “puntillado”, similar al del ensayo anterior (ver protocolo 2 para la identificación del MCHR-1, ítem 5.1.2). Elegimos como región representativa para las figuras el NDR (ver figura 15A)

En la figura 15B se puede observar que en los tejidos que fueron sometidos a RA, luego ensayados y observados en el microscopio confocal, finalmente se obtuvo una marca similar a la observada en la detección del MCHR-1 por IHQ (comparar con figura 5). Al utilizar DAPI como marcador de núcleos celulares, pudimos observar la presencia del MCHR-1 con su típica morfología alargada presente en las cilias primarias y que se encuentra contorneando los somas. Con este protocolo y la RA, el MCHR-1 se observó además en el estriado e hipocampo con características similares y en una mayor densidad que en el NDR (ver figura 16 A y B).

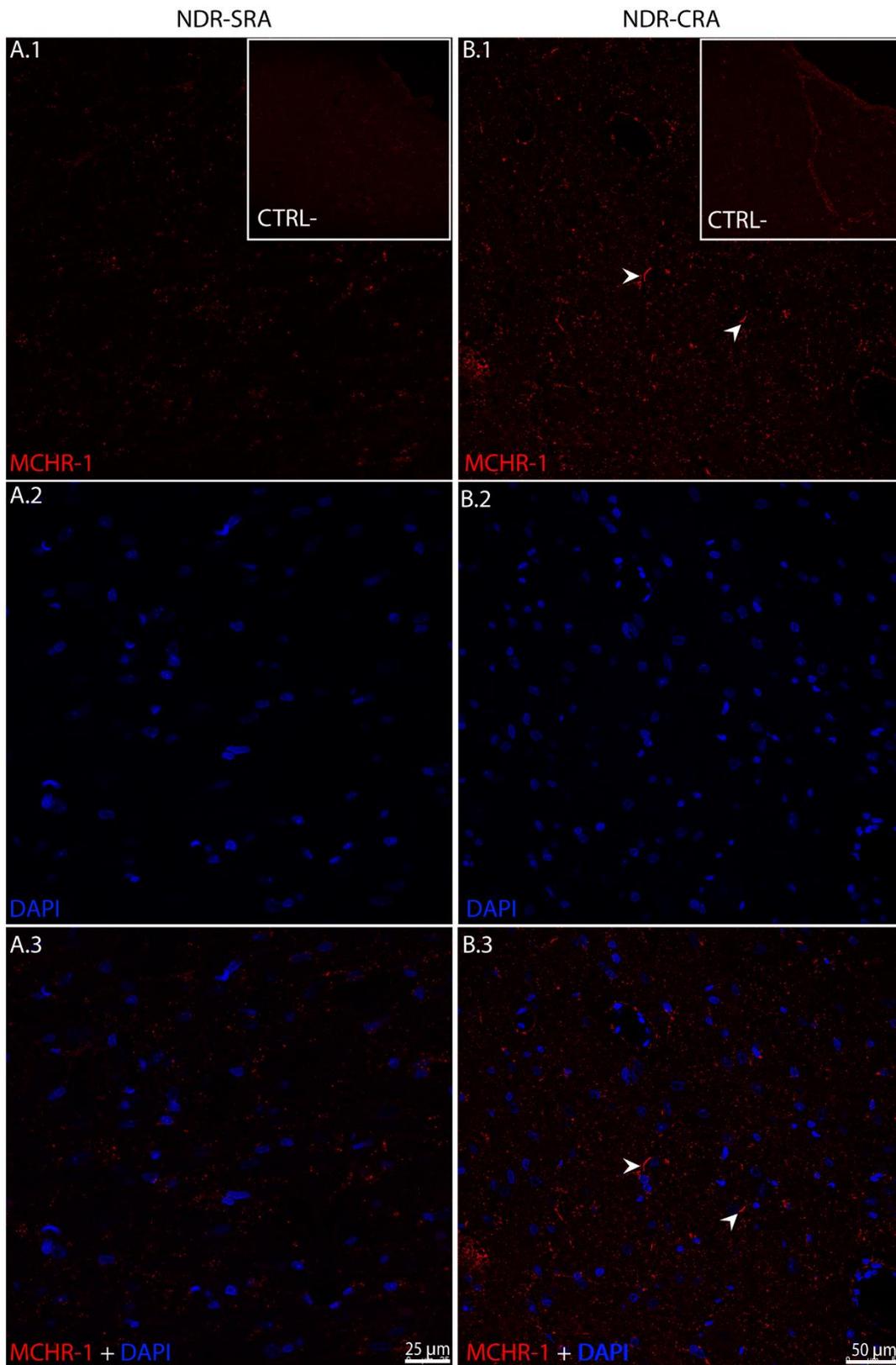


Figura 15] Fotos representativas del protocolo 3 de Inmunofluorescencia para la detección del MCHR-1 en cortes coronales de NDR. Las cabezas de flechas blancas señalan marcas positivas para el MCHR-1. A.1- Tejido SRA observado bajo el filtro 555, las marcas positivas (en rojo) corresponden al MCHR-1, el inset representa el control negativo. A.2- Tejido SRA observado bajo el filtro UV, las marcas positivas (en azul) corresponden a DAPI. A.3- Tejido SRA donde se observa la combinación de ambas marcas positivas (MCHR-1 + DAPI). Fotos tomadas a 63 x (excepto el CTRL- tomado a 20x).

B.1- Tejido CRA observado bajo el filtro 555, las marcas positivas (en rojo) corresponden al MCHR-1, el inset representa el control negativo. B.2- Tejido CRA observado bajo el filtro UV, las marcas positivas (en azul) corresponden a DAPI. B.3- Tejido CRA donde se observa la combinación de ambas marcas positivas (MCHR-1 + DAPI). Fotos tomadas a 40x y obtenidas con Microscopía Confocal.

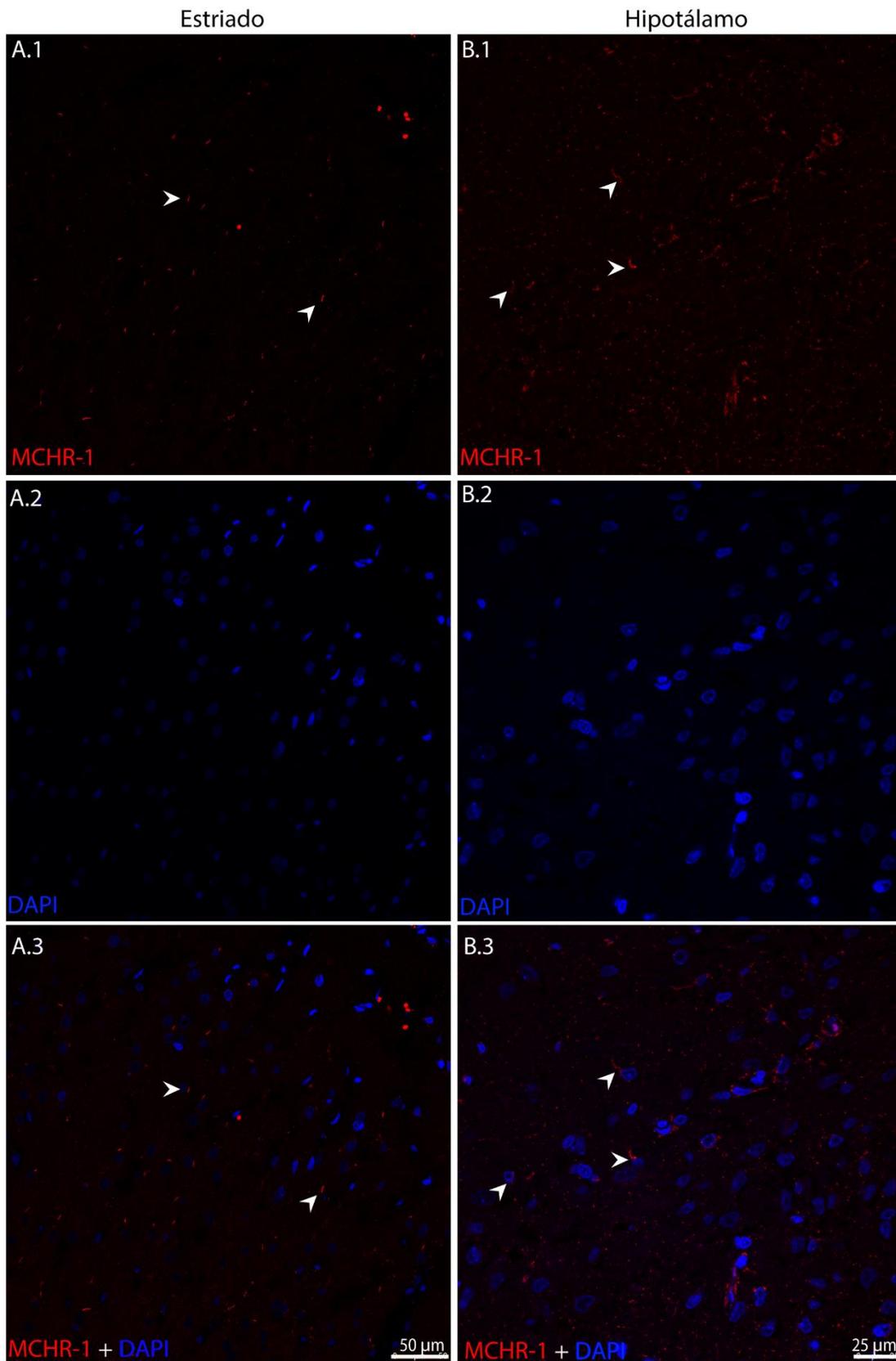


Figura 16| Fotos representativas del protocolo 3 de Inmunofluorescencia para la detección del MCHR-1 en cortes coronales de Estriado (A) e Hipotálamo (B). Las cabezas de flechas blancas señalan marcas positivas para el MCHR-1. A.1-Tejido CRA observado bajo el filtro 555, las marcas positivas (en rojo) corresponden al MCHR-1. A.2- Tejido CRA observado bajo el filtro UV, las marcas positivas (en azul) corresponden a DAPI. A.3- Tejido CRA donde se observa la combinación de ambas marcas positivas (MCHR-1 + DAPI). Fotos tomadas a 40x. B.1- Tejido CRA observado bajo el filtro 555, las marcas positivas (en rojo) corresponden al MCHR-1. B.2- Tejido CRA observado bajo el filtro UV, las marcas positivas (en azul) corresponden a DAPI. B.3- Tejido CRA donde se observa la combinación de ambas marcas positivas (MCHR-1 + DAPI). Fotos tomadas a 63x y obtenidas con Microscopía Confocal.

Sin embargo, a pesar de estos resultados positivos, también se observaron marcas en los tejidos ensayados como controles negativos, que aunque no delimitan estructuras conocidas, son similares a las observadas en los resultados del protocolo 2 y su variante (ítem 5.1.2) (ver insets en figura 15 A1 y B1).

Para constatar que el ensayo realizado fue realmente específico (a pesar de haber observado marcas en el control negativo), nos planteamos el protocolo 3.1 (ítem 5.1.3.1) donde probamos tres tipos de controles negativos, para así detectar a qué se debía la señal observada.

El primer control fue el ya realizado para todos los ensayos descritos hasta ahora, es decir la omisión del anticuerpo primario, la incubación del anticuerpo secundario y por ser un protocolo de amplificación de señal, la incubación también con la streptavidina conjugada a fluoróforo. El segundo control se realizó incubando el anticuerpo primario, se omitió el anticuerpo secundario y se incubó con streptavidina. Finalmente en el tercer control se incubó con el anticuerpo primario y el secundario pero se omitió la streptavidina.

Debido a que el control negativo que se realizó en ausencia de streptavidina no presentó marcas y si se observó señal en el segundo control (al igual que en el primero), la señal observada se debe a la unión de la streptavidina a biotina que no solamente estaba presente únicamente en el anticuerpo secundario (ver figura 17).

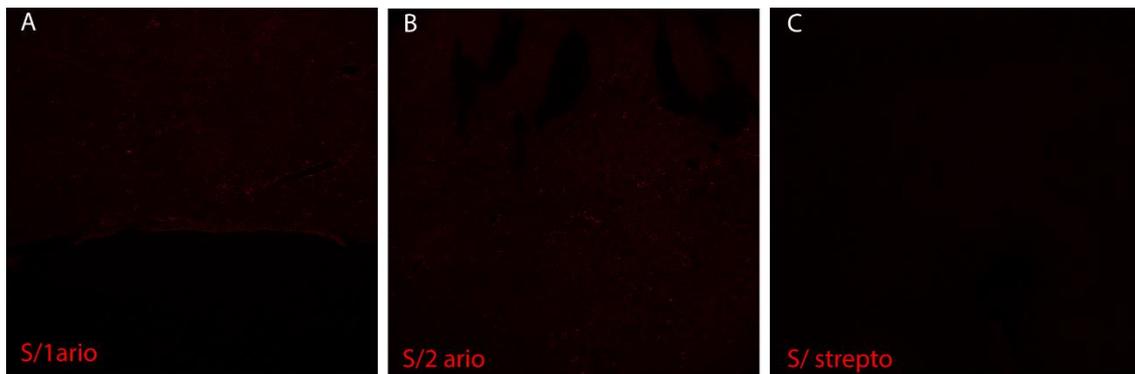


Figura 17| Fotos representativas del ensayo de controles negativos para el MCHR-1 en cortes coronales de NDR. Las cabezas de flecha blancas señalan marcas positivas para la streptoavidina A- Control negativo por omisión del anticuerpo primario. B- Control negativo por omisión de secundario. C- Control negativo por omisión de streptoavidina-555. Fotografías tomadas con el objetivo de 20x y obtenidas con Microscopía Confocal.

8. Contextualización celular por inmunofluorescencia

Se realizaron ensayos de IF para la detección del marcador neuronal NeuN y así poder contextualizar la marca del MCHR-1, esta vez por IF. En el protocolo 1 para la detección de este marcador (ítem 5.2.1) los tejidos fueron sometidos a RA previo a la incubación de ambos anticuerpos primarios (anti-MCHR-1 y anti-NeuN). Los resultados de dicho ensayo, mostraron una marca de NeuN tenue. Sin embargo en el protocolo 2 (ítem 5.2.2) se realizó la RA luego de la incubación del anti-NeuN pero previo a la incubación del anti-MCHR-1. En tejidos que solo fueron ensayados para la detección del NeuN y que por lo tanto no pasaron por el tratamiento de RA, la marca de NeuN fue más nítida en comparación a la observada en el protocolo anterior (protocolo 1, ítem 5.2.1) (resultados no mostrados).

9. Determinación de la localización celular del MCHR-1 por inmunofluorescencia

El segundo paso para poder realizar el ensayo de co-localización del MCHR-1 y uno de los marcadores ciliares y efectivamente comprobar que el receptor estaba presente en las cilias primarias, fue poder obtener marcas positivas de un marcador ciliar por IF. Dados los resultados satisfactorios obtenidos para la detección del marcador tubulina acetilada por IHQ, decidimos utilizarlo también para la detección de las cilias primarias por IF.

Los resultados obtenidos tanto para el protocolo de detección de la tubulina acetilada y la variante que se realizó del mismo utilizando streptavidina en lugar de un anticuerpo secundario conjugado a fluoróforo (ver ítem 5.3.1), mostraron una marca que no se corresponde con la observada en los resultados obtenidos por IHQ (resultados no mostrados).

Como no se obtuvieron los resultados esperados con la tubulina acetilada, se decidió incorporar otro marcador ciliar denominado ARL13B y además utilizamos el marcador ACIII (que ya había sido utilizado para la detección de las cilias por IHQ, para el cual obtuvimos resultados negativos). Para ambos marcadores se llevó a cabo el protocolo de IF con amplificación de señal (ítem 5.3.2).

Para el marcador ACIII se obtuvo una marca idéntica a las cilias primarias observadas por IHQ con la tubulina acetilada (ver figura 18 A1 y A2), y no se observaron diferencias apreciables en la marca entre las dos concentraciones utilizadas (ni en intensidad, ni en nitidez), por lo que se decidió utilizar la concentración más diluida de aquí en más. Se eligieron cortes de hipocampo por la gran abundancia de cilias primarias observadas en el ensayo de IHQ, donde se habían detectado a través de la tubulina acetilada.

Sin embargo, en estos ensayos, con el marcador ARL13B no se obtuvo ningún tipo de marca positiva, (ver figura 18 B1 y B2). En los controles negativos tampoco se observó ningún tipo de reacción (no mostrado).

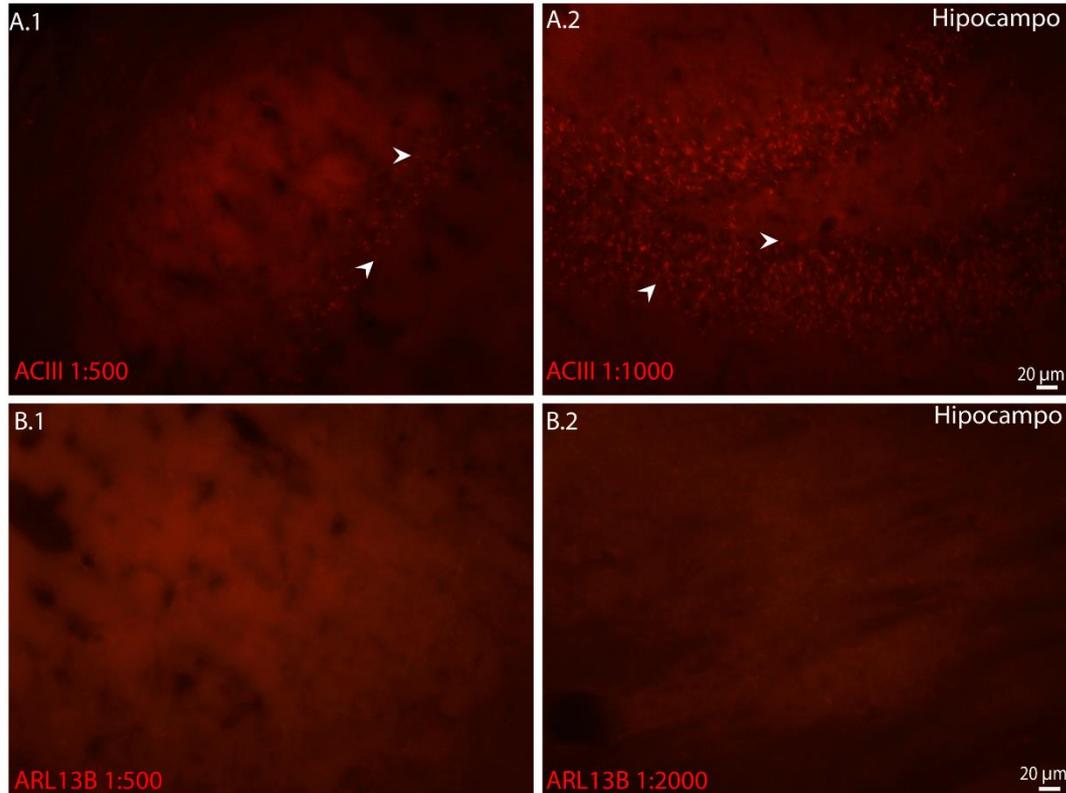


Figura 18| Fotos representativas del protocolo 2 para la detección de los marcadores ciliares: ACIII y ARL13B en cortes coronales de Hipocampo. Las cabezas de flechas blancas señalan marcas positivas para las cilias primarias. A.1- Control positivo para ACIII a 40x con el anticuerpo primario concentrado 1:500. A.2- Control positivo para ACIII a 40x con el anticuerpo primario concentrado 1:1000. B.1- Control positivo para ARL13B a 40x con el anticuerpo primario concentrado 1:500. B.2- Control positivo para ARL13B a 40x con el anticuerpo primario concentrado 1:2000. Fotografías obtenidas con Microscopía de Epifluorescencia.

10. Ensayo de detección concomitante del MCHR-1 y ACIII

De acuerdo a los resultados obtenidos hasta el momento, se logró poner a punto, por un lado, la marca del MCHR-1 y por otro, de un marcador de las cilias primarias (ACIII) por IF con amplificación de señal. En ambos casos, este tipo de procedimiento implicó la utilización de la streptavidina conjugada al fluoróforo 555 (ya mencionado). Por tal razón, para realizar un ensayo de co-localización del MCHR-1 con un marcador de cilias primarias, se debió poner a punto una streptavidina adicional, conjugada a un fluoróforo distinto.

Para realizar este protocolo, la incubación de los anticuerpos primarios fue secuencial, con la idea de disminuir el posible efecto de la RA sobre la inmunomarcación de la ACIII. Los resultados obtenidos fueron positivos para la ACIII pero no para la marca del MCHR-1 (no mostrado).

Sin embargo se volvió a realizar el mismo protocolo incluyendo una variante, con una streptavidina conjugada a otro fluoróforo para la detección del MCHR-1 (en el anterior se había utilizado streptavidina conjugada a FIT-C, y en este ensayo streptavidina conjugada a AF488). En este caso sí se observaron resultados positivos para ambos antígenos (ítem 5.4).

Algunas de las marcas del MCHR-1 co-localizaron con las marcas positivas para la ACIII (ver figura 19A) a nivel de la corteza cerebral. Además también se observó la superposición de las marcas en los vasos sanguíneos en el NDR (ver figura 19 B).

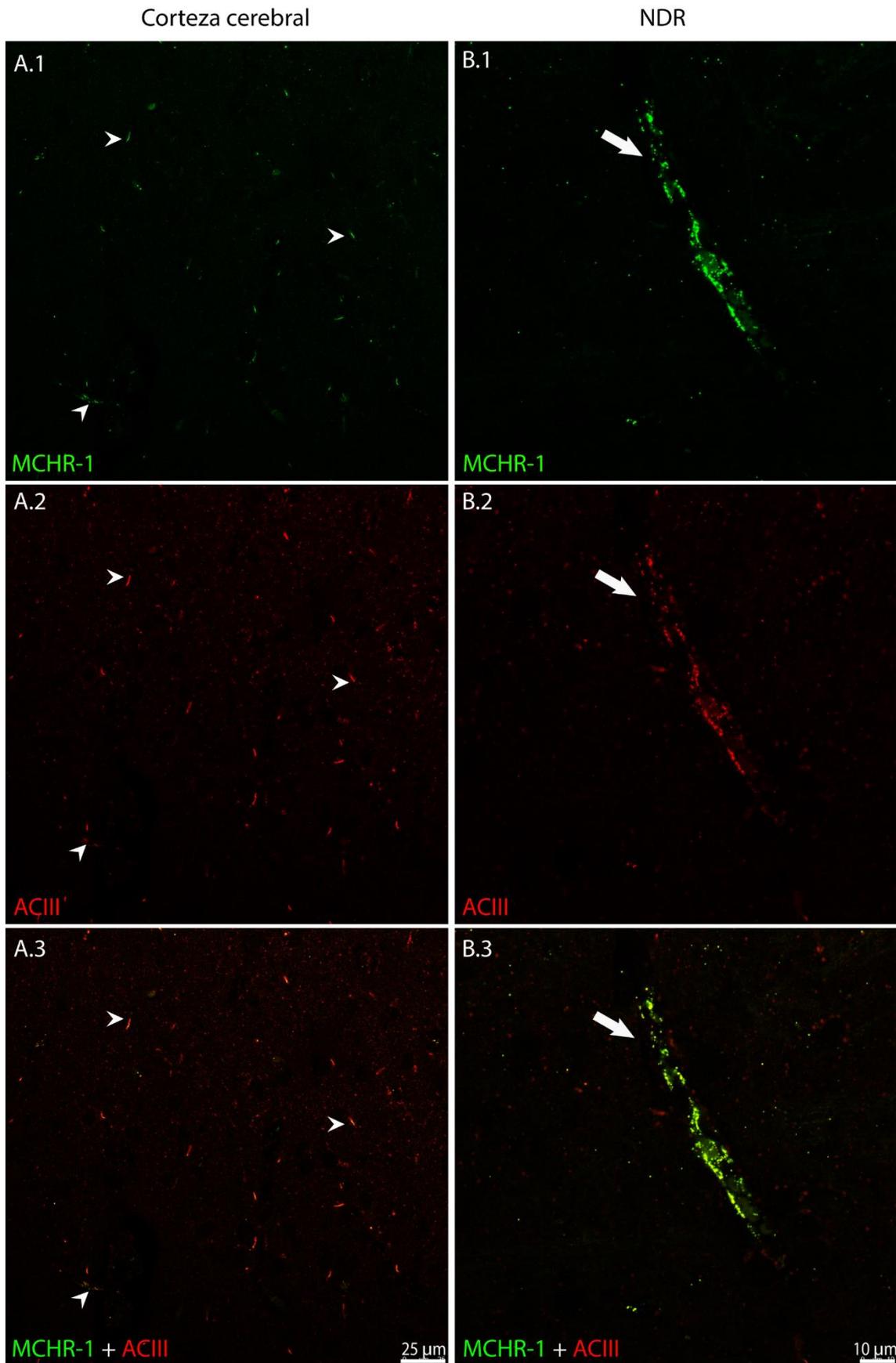


Figura 19| Fotos representativas del protocolo 3 de Inmunofluorescencia para la doble detección del MCHR-1 y ACIII en cortes coronales de Corteza (A) y NDR (B). Las cabezas de flechas blancas señalan marcas positivas para el MCHR-1 y ACIII (según corresponda). A.1- Tejido CRA observado bajo el filtro 488, las marcas positivas (verde) corresponden al MCHR-1. A.2- Tejido CRA observado bajo el filtro 555, las marcas positivas (en rojo) corresponden a ACIII. A.3- Tejido CRA donde se observa la combinación de ambas marcas positivas (MCHR-1 + ACIII). Fotos tomadas a 63x. B.1- Tejido CRA observado bajo el filtro 488, las marcas positivas (verde) corresponden al MCHR-1. B.2- Tejido CRA observado bajo el filtro 555, las marcas positivas (en rojo) corresponden a ACIII. B.3- Tejido CRA donde se observa la combinación de ambas marcas positivas (MCHR-1 + ACIII) La flecha blanca señala un vaso sanguíneo longitudinal. Fotos tomadas a 63x (zoom x2) y obtenidas con Microscopía Confocal

Observando otra región del NDR donde también están presentes ambos antígenos (ya que en el mismo corte se observan marcas positivas para el MCHR-1 en el filtro verde y marcas positivas para la ACIII en el filtro rojo del microscopio confocal) (ver figura 20A), se puede observar a mayor aumento, como la marca central señalada con una cabeza de flecha blanca muestra la superposición de las imágenes, pero en la misma fotografía también se observaron marcas de ACIII que no poseen el MCHR-1 (ver figura 20B). Es decir se observó una mayor cantidad de cilias primarias que de marcas positivas para el MCHR-1.

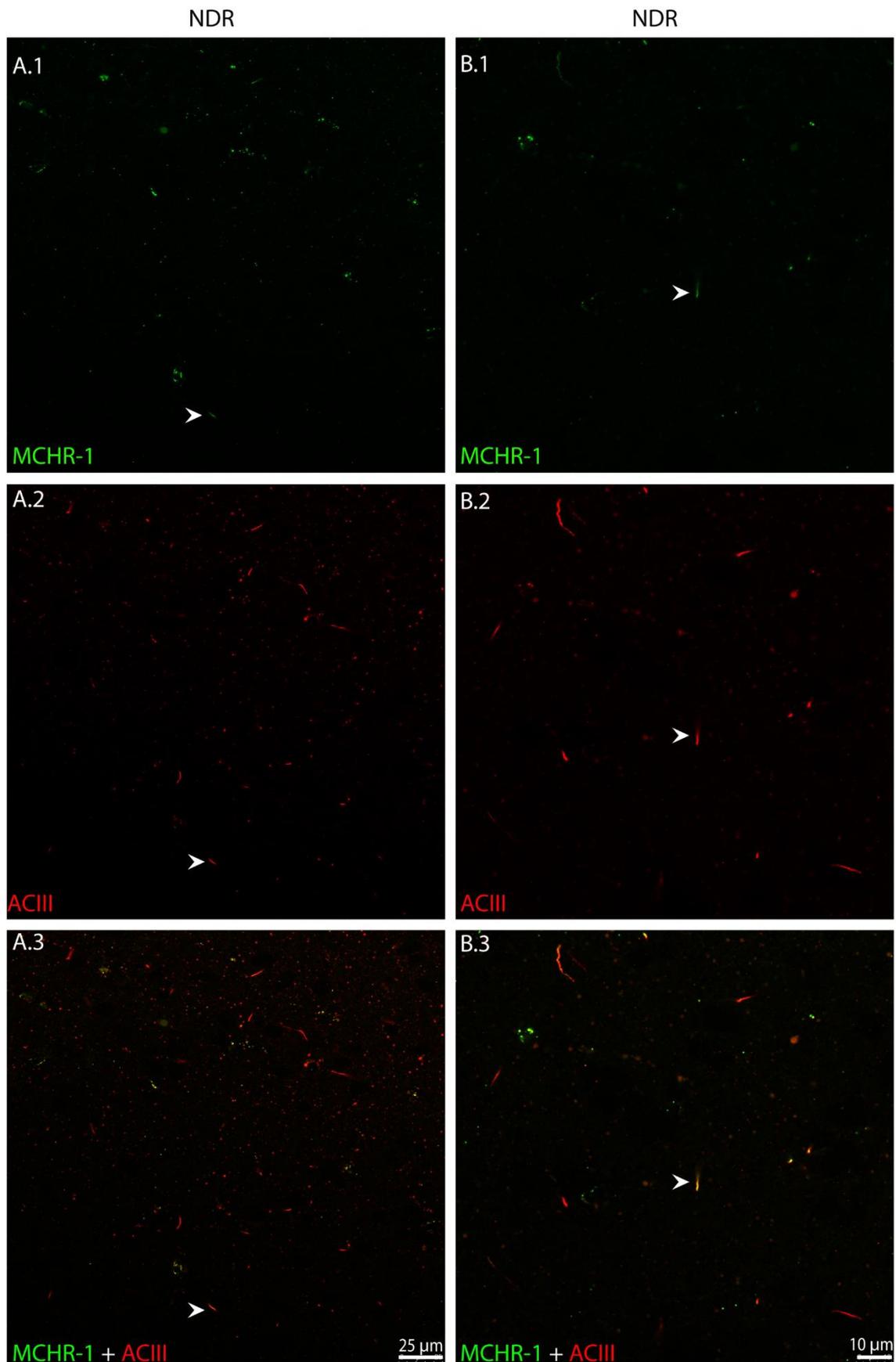


Figura 20| Fotos representativas del protocolo 3 de Inmunofluorescencia para la doble detección del MCHR-1 y ACIII en 2 cortes coronales de NDR. Las cabezas de flechas blancas señalan marcas positivas para el MCHR-1 y ACIII (según corresponda). A.1- Tejido CRA observado bajo el filtro 488, las marcas positivas (verde) corresponden al MCHR-1. A.2- Tejido CRA observado bajo el filtro 555, las marcas positivas (en rojo) corresponden a ACIII. A.3- Tejido CRA donde se observa la combinación de ambas marcas positivas (MCHR-1 + ACIII). Fotos tomadas a 63x. B.1- Tejido CRA observado bajo el filtro 488, las marcas positivas (verde) corresponden al MCHR-1. B.2- Tejido CRA observado bajo el filtro 555, las marcas positivas (en rojo) corresponden a ACIII. B.3- Tejido CRA donde se observa la combinación de ambas marcas positivas (MCHR-1 + ACIII). Fotos tomadas a 63x (zoom x2) y obtenidas con Microscopía Confocal.

11. Fenotipos neuronales donde está presente el MCHR-1- células serotoninérgicas

Como se expuso en los antecedentes, el NDR es un núcleo serotoninérgico de gran interés para nuestro grupo, y en el que evidenciamos la presencia de una gran concentración del MCHR-1 en dicha estructura. Por dicho motivo se decidió realizar una IHQ para la detección de neuronas serotoninérgicas y verificar la presencia del MCHR-1 en las mismas.

Así nos planteamos el protocolo 4.5 dentro de los ensayos de IHQ, donde al encontrarse ambos antígenos en distintos compartimientos celulares se pudo realizar la doble inmunomarcación (utilizando nuevamente DAB y DAB-níquel para el revelado).

Se obtuvieron resultados positivos para la detección de ambos antígenos de forma concomitante (ver figura 21).

Las neuronas serotoninérgicas se marcaron con una coloración amarronada, que resalta sobre el *background*. Algunas de estas neuronas poseen una marca más oscura y de forma alargada, que parecería protruir desde el soma (correspondiente al depósito del revelado de DAB-níquel) y de morfología ya conocida, que señala la presencia del MCHR-1 (señaladas con cabezas de flecha en la figura 21 A1).

Con estos resultados, podemos concluir que parte de la población de neuronas serotoninérgicas del NDR poseían el MCHR-1, mientras que otra población no lo presentaron. Se realizó nuevamente el ensayo con el objetivo de mejorar la nitidez de la marca de serotonina (disminuyendo el tiempo del revelado), para observar una diferencia más notoria entre las neuronas serotoninérgicas y el *background* pero no logramos este objetivo.

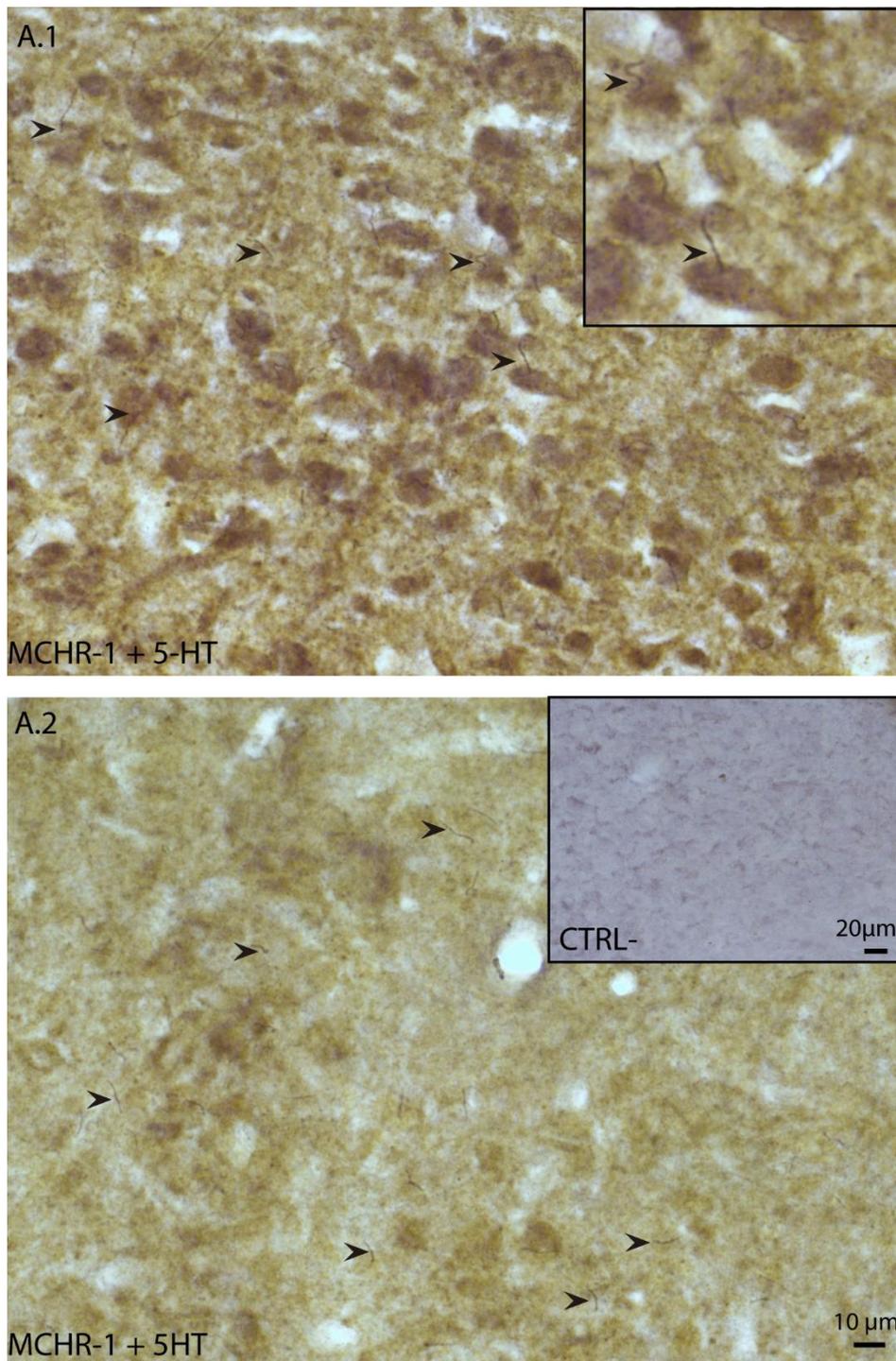


Figura 21|Fotos representativas del protocolo de Inmunohistoquímica para la doble detección del MCHR-1 y 5-HT en cortes coronales de NDR. Las cabezas de flechas negras señalan marcas positivas para el MCHR-1. A.1- Control positivo de MCHR-1 + 5-HT. Además posee un inset de una región aumentada con neuronas 5-HT positivas y MCHR-1 positivas. A.2- Control positivo de MCHR-1 + 5-HT (otra región, donde no se visualizan neuronas 5-HT positivas). Posee un inset con el control negativo (tomado a 40x) . Las demás fotos fueron tomadas a 63x.

Con la técnica de IF fue posible confirmar nuevamente la presencia del MCHR-1 en algunas de las neuronas serotoninérgicas del NDR (ítem 5.5.1). Se obtuvieron marcas positivas para ambos antígenos. Las neuronas serotoninérgicas se visualizaron de forma tenue, y algunas de ellas presentaron el MCHR-1, siendo que éste protruía desde el soma de las neuronas (ver figura 22 A y B). Además, también se lograron visualizar fibras serotoninérgicas (ver figura 22 B2, señalada con flecha entera).

Se probaron distintos protocolos con el objetivo de obtener la marca de las neuronas serotoninérgicas más nítida, pero ninguna de estas variantes tuvo el efecto esperado (ítem 5.5.2 e ítem 5.5.3, resultados no mostrados). Una variante del protocolo ya mencionado fue aumentar la concentración del anticuerpo primario (anti-5-HT producido en conejo).

En el protocolo 2 (ítem 5.5.2) se incubaron los anticuerpos en forma secuencial, en primer lugar se incubó con el anti-5HT (hecho en cabra) y luego de que se revelara la reacción, se pre-trató a los tejidos por RA y se incubó luego con el primario anti-MCHR-1. También se realizó la variante de concentrar aún más el anticuerpo primario anti-5HT (hecho en cabra) (resultados no mostrados)

Para el protocolo 3 ítem (5.5.3) se re-incubó los tejidos con el anticuerpo primario (hecho en conejo) más concentrado (1:250) luego de haberlo revelado (concentración inicial del anti-5HT fue de 1:500) (resultados no mostrados).

Luego de todas estas pruebas se decidió elegir al protocolo 1 (ítem 5.5.1) como el más representativo, en el cual los controles negativos no mostraron reacción positiva.

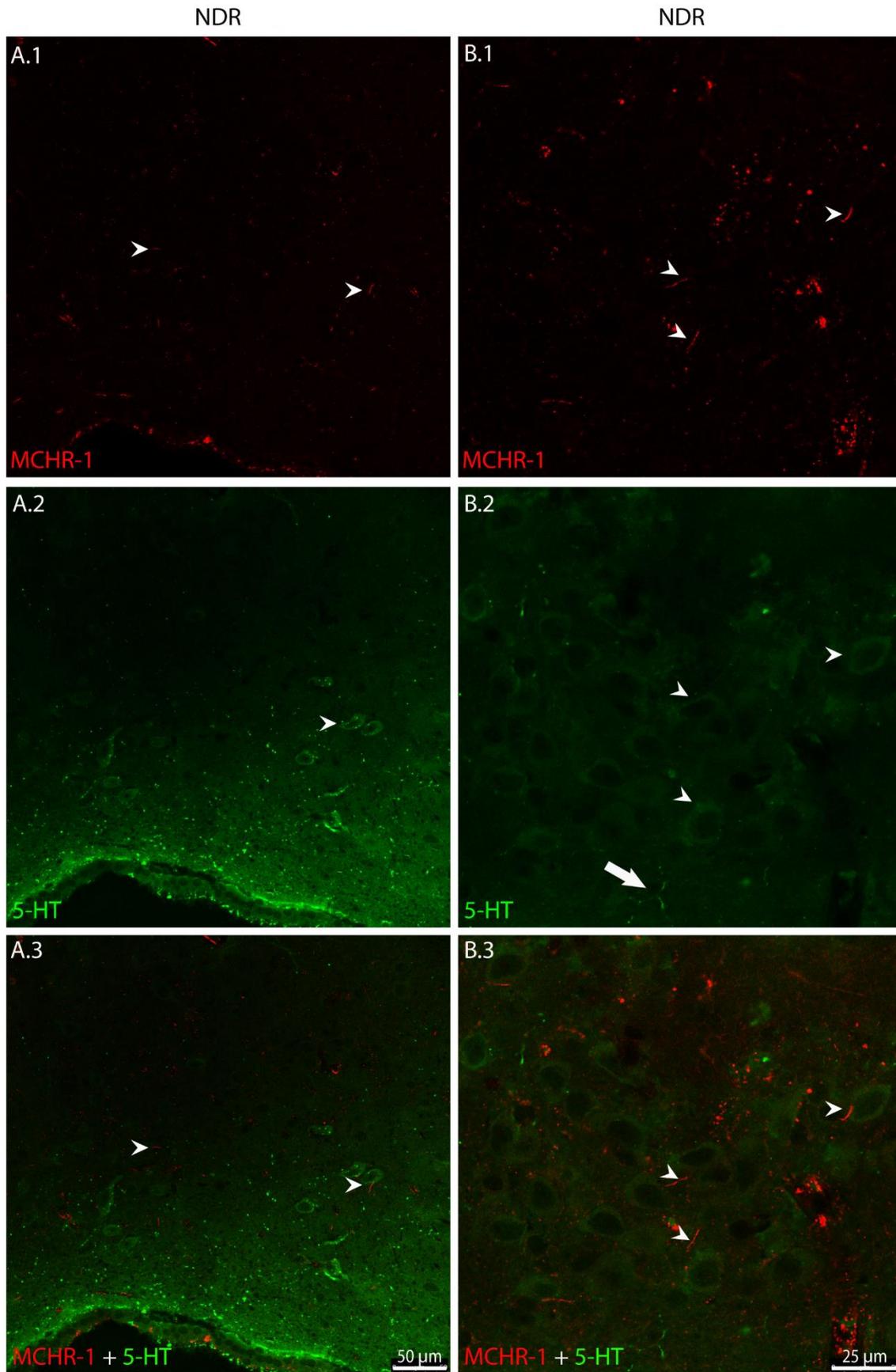


Figura 22| Fotos representativas del protocolo de Inmunofluorescencia para la doble detección del MCHR-1 y 5-HT en 2 cortes coronales de NDR. Las cabezas de flechas blancas señalan marcas positivas para el MCHR-1 y 5-HT (según corresponda). A.1- Tejido CRA observado bajo el filtro 555, las marcas positivas (en rojo) corresponden al MCHR-1. A.2- Tejido CRA observado bajo el filtro 488, las marcas positivas (en verde) corresponden a neuronas-5-HT. A.3-Tejido CRA donde se observa la combinación de ambas marcas positivas (MCHR-1 + 5-HT). Fotos tomadas a 40x. B.1- Tejido CRA observado bajo el filtro 555, las marcas positivas (en rojo) corresponden al MCHR-1. B.2- Tejido CRA observado bajo el filtro 488, las marcas positivas (en verde) corresponden a neuronas-5-HT. B.3-Tejido CRA donde se observa la combinación de ambas marcas positivas (MCHR-1 + 5-HT). Fotos tomadas a 40x (zoom de 2.44) y obtenidas con Microscopía Confocal.

12. Fenotipos neuronales donde está presente el MCHR-1- células GABAérgicas.

Cómo ya se mencionó, se observaron otras células con marca positiva para MCHR-1 pero negativa para 5-HT, por lo que el receptor estaba presente en otro fenotipo neuronal del NDR. Por estos motivos decidimos realizar una IF para la detección de la enzima GAD-67 y así detectar neuronas GABAérgicas.

Realizamos el ensayo sobre dos grupos de tejidos, el grupo 1 fueron cortes sin ningún tratamiento previo, mientras que el grupo 2 fueron cortes de ratas pre-tratadas con inyecciones de colchicina en el ventrículo lateral.

En los cortes sin colchicina, se observa la marca del receptor, tal cual como fue descrita en el protocolo de amplificación de señal. La región que se observa es el NDR y el MCHR-1 está presente en algunas neuronas GABAérgicas, observándose que éste protruía desde el soma neuronal (como también se observó en la neuronas serotoninérgicas) (ver figura 23A).

En el grupo pre-tratado con colchicina, las estructuras representadas, fueron la corteza cerebral (ver figura 23B), NDR (ver figura 23C), hipocampo (no mostrado). En estos casos, la marca del MCHR-1 similar a la observada en los cortes sin colchicina solo se logró visualizar en regiones de la corteza cerebral, donde no se observaban somas de neuronas GABAérgicas, sino que parecían visualizarse botones sinápticos que contenían GABA. A nivel del NDR no se observaron marcas positivas para el MCHR-1, pero sí se observaron neuronas GABAérgicas nítidamente marcadas. A nivel del Acueducto de Silvio sí se observó una marca del tipo “puntillado” correspondiente a la presencia del MCHR-1.

En la tabla 1 se muestra un resumen de los antígenos que pudieron ser detectados por las dos técnicas utilizadas de inmunomarcación, es decir los resultados positivos de este trabajo.

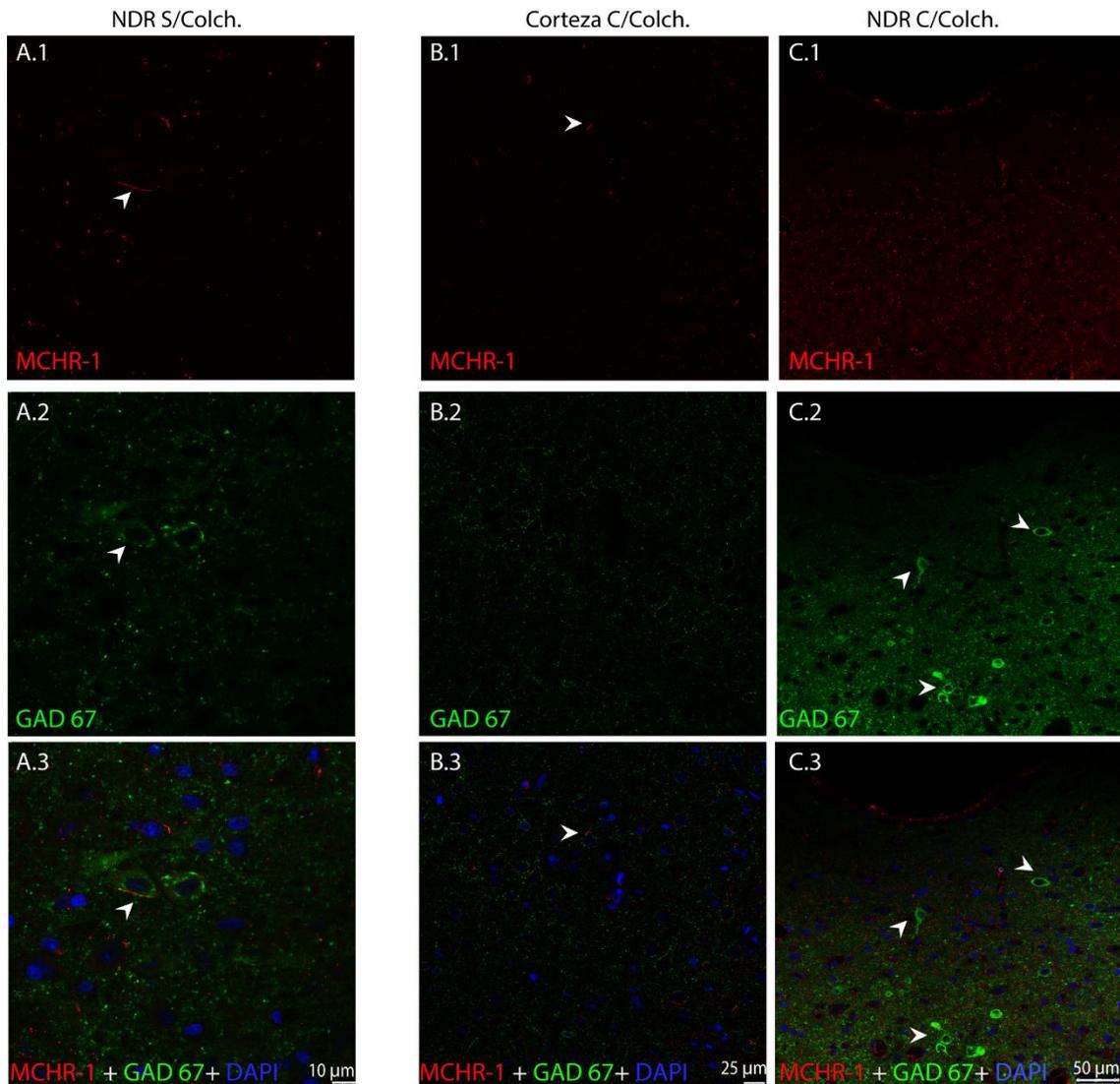


Figura 23| Fotos representativas del protocolo de Inmunofluorescencia para la doble detección del MCHR-1 y GAD-67 en 3 cortes coronales, dos de NDR (A y C) y uno de Corteza (B). Las cabezas de flechas blancas señalan marcas positivas para el MCHR-1 y GAD-67 (según corresponda). A.1- Tejido CRA observado bajo el filtro 555, las marcas positivas (en rojo) corresponden al MCHR-1. A.2- Tejido CRA observado bajo el filtro 488, las marcas positivas (en verde) corresponden a neuronas GABAérgicas. A.3- Tejido CRA donde se observa la combinación de todas las marcas positivas (MCHR-1 + GAD-67 + DAPI). Fotos tomadas a 40x (zoom de 4). B.1- Tejido CRA observado bajo el filtro 555, las marcas positivas (en rojo) corresponden al MCHR-1. B.2- Tejido CRA observado bajo el filtro 488, las marcas positivas (en verde) corresponden a neuronas GABAérgicas. B.3- Tejido CRA donde se observa la combinación de todas las marcas positivas (MCHR-1 + GAD-67 + DAPI). Fotos tomadas a 40x (zoom de 2.44). C.1- Tejido CRA observado bajo el filtro 555, las marcas positivas (en rojo) corresponden al MCHR-1. C.2- Tejido CRA observado bajo el filtro 488, las marcas positivas (en verde) corresponden a neuronas GABAérgicas. C.3- Tejido CRA donde se observa la combinación de todas las marcas positivas (MCHR-1 + GAD-67 + DAPI). Fotos tomadas a 40x. Todas las fotografías fueron obtenidas con Microscopía Confocal.

Tabla 1 | Resultados de detección de antígenos por las técnicas de IHQ e IF. En los casos donde se realizó un ensayo de colocalización se colocaron ambos antígenos en una misma celda de la tabla. Los tics verdes señalan ensayos donde se obtuvieron resultados positivos, mientras que las cruces rojas indican resultados negativos.

Inmunohistoquímica	Resultado	Inmunofluorescencia	Resultado
MCHR-1	✓	MCHR-1	✓
NeuN MCHR-1	✓ ✗	NeuN y MCHR-1	✗ ✓
Tubulina acetilada	✓	Tubulina acetilada y MCHR-1	✗ ✓
ACIII	✗	ACIII y MCHR-1	✓ ✓
		ARL13B	✗
5-HT MCHR-1	✓ ✓	5-HT y MCHR-1	✓ ✓
		GAD-67 y MCHR-1	✓ ✓

Discusión de resultados

1. Discusión de los resultados del primer objetivo: Evidenciar la presencia del MCHR-1 en el SNC, particularmente en el NDR.

Además de evidenciar la presencia del MCHR-1 en el NDR (por IHQ e IF), también se constató su localización en otras regiones del SNC de la rata, como en la corteza cerebral, estriado, hipotálamo e hipocampo, lo cual se corresponde a lo observado por Hervieu y colaboradores en el 2000 en ratas *Wistar*, al detectar el ARNm del MCHR-1 por hibridación *in situ* en las dichas regiones. Al año siguiente Saito y su grupo realizó un exhaustivo estudio para determinar la presencia del ARNm del MCHR-1 en todas las regiones del cerebro de la rata, de cepa *Sprague-Dawley*. Estos dos hallazgos nos llevaron a pensar que la proteína receptora y no solo el transcripto, también se encontraba en esas regiones del SNC de la rata. Además también fue detectada la proteína por western blot, en núcleos del cuerpo estriado en ratón y en neuronas hipotalámicas de rata (Miyoshi et al. 2009; Santollo & Eckel 2013)

De acuerdo a los resultados obtenidos, se determinó que es una condición indispensable para visualizar el MCHR-1 (por ambas técnicas) realizar el pretratamiento por RA a los tejidos utilizados (previo a comenzar los ensayos de identificación). Este tratamiento permite la ruptura de las uniones entre aldehídos y antígenos generadas en el proceso de fijación, produciéndose así el desenmascaramiento de los antígenos que estaban inaccesibles. Dicho pre-tratamiento ha sido ampliamente utilizado en cortes de ojo y de cerebro de variadas especies: palomas, cerdos, el ave “diamante cebrá”, ratones, ratas y humanos. En dichos tejidos se pudo poner en evidencia la presencia de encefalina, GluR1, GFAP, ubiquitina, sustancia P y la proteína “Huntingtin”, las cuales no se observaban sin ese pre-tratamiento (Jiao et al. 1999).

Además de los estudios de hibridación *in situ*, también existían evidencias previas de que en las zonas donde determinamos la presencia del MCHR-1 poseían una densa inervación de fibras MCHérgicas, lo cual fue constatado por el grupo de trabajo de Bittencourt en 1992 que describió la inervación MCHérgica proveniente en mayor medida del hipotálamo lateral y la zona incerta, y también en otras regiones del SNC de la rata. Una de dichas regiones fue el NDR, donde las fibras MCHérgicas también fueron observadas por Lagos y colaboradores en el 2011, y Yoon & Lee en el 2013.

La presencia de fibras MCHérgicas en estas zonas estaría indicando que la MCH tiene un rol funcional allí, por lo que era de esperarse que el MCHR-1 también estuviera presente para mediar sus funciones.

Además fue constatado por el grupo de Berbari este mismo año, mediante el diseño de un ratón transgénico para que exprese constitutivamente el MCHR-1, su localización a nivel del SNC. En dicho estudio se observó una expresión aumentada en zonas del hipotálamo implicadas en la regulación de la ingesta (núcleo arcuato y paraventricular), mientras que su concentración se vio disminuida en zonas vinculadas a la recompensa (núcleo accumbens). También se observó la expresión del MCHR-1 en la zona incerta, el hipocampo, bulbo raquídeo y cerebelo (Engle et al. 2018).

No solamente observamos marcas positivas para el MCHR-1 en células nerviosas sino que también fueron observadas a nivel de los vasos sanguíneos, tanto por IHQ como por IF, lo cual no había sido reportado anteriormente. Aughton y colaboradores en el 2008 estudiaron el efecto de distintos neuropéptidos sobre las arterias vaginales de la rata, entre ellos la MCH, la cual producía un efecto vasoconstrictor sobre las mismas. Además Orihara y su grupo en el 2009 constataron la producción de MCH por parte de células endoteliales humanas, estimuladas por dos tipos de citoquinas: IL4 y IL13. Ellos utilizaron la línea celular HMVEC-LB1 (células del endotelio microvascular del pulmón humano) donde realizaron la técnica de microarrays para constatar la expresión del gen de la MCH, la que también fue comprobada a través de la realización de una RT-PCR con los transcriptos del gen. También fue demostrado por Sandig y su grupo en el 2007 que los linfocitos TH2 son capaces de producir selectivamente MCH. La metodología utilizada fue la toma de sangre venosa de voluntarios sanos, a partir de la cual se aislaron los linfocitos TH2 para aumentar su población en cultivo. A estos cultivos se le realizaron RT-PCR para cuantificar los transcriptos de MCH y western blot para cuantificar niveles de MCH, además se detectó la presencia de MCH por un ensayo enzimático. Estos tres estudios dejan entrever un posible rol de la MCH en un estado inflamatorio (más precisamente en inflamación producida por alérgenos) quizás mediados por el MCHR-1, presente en las células endoteliales de los vasos sanguíneos.

Como ya se mencionó en los resultados, la morfología de la marca positiva obtenida de los ensayos para detectar el MCHR-1 indica que no se encuentra presente en el soma celular, sino en un apéndice de las neuronas, denominado cilia primaria. Esta marca es muy similar a la que obtuvo Berbari y su grupo en el 2008 en un ensayo por IF en tejidos de ratón (donde la estructura

analizada fue el núcleo accumbens) y también en células IMCD3 en cultivo, transfectadas para que expresaran el MCHR-1.

A diferencia de la identificación del MCHR-1 por IHQ, con la cual se obtuvieron resultados confiables realizando pequeñas variantes en base a un protocolo de IHQ estándar, fueron necesarios varios protocolos y variantes para llegar a identificar el MCHR-1 por IF.

En el primer ensayo de IF realizado para detectar el MCHR-1, como ya se mencionó en los resultados, no se obtuvo la marca esperada (en base a los antecedentes y la morfología del MCHR-1 observada por IHQ) en ninguna de las 3 condiciones de incubación para el anticuerpo primario. Sin embargo, sí se observaron otro tipo de marcas, tanto en los controles positivos como negativos, lo cual nos sugirió que dicha marca positiva observada era una marca inespecífica. Quizás estas marcas correspondieron a eritrocitos (debido a su morfología) que se mantuvieron en los vasos y capilares luego de la perfusión.

La presencia de esta marca “tipo eritrocito”, de gran intensidad y nitidez podría estar dada por la autofluorescencia que presentan ciertas moléculas en los tejidos. La autofluorescencia puede verse acentuada por los procesos de fijación de los tejidos. Por ejemplo, los grupos formaldehído, presentes en la solución fijadora utilizada, forma enlaces covalentes al unirse a grupos amino cercanos, que se encuentran en moléculas endógenas, generando reacciones ácido-base de Schiff (Beisker et al. 1987).

Además, se constató que el proceso de RA (el cual ya se dijo que fue necesario para la visualización de la marca esperada) también acentúa la autofluorescencia de los tejidos. Marcas inespecíficas y un aumento del *background* durante procesos de RA con citrato de sodio también fueron observados por Jiao en 1999. Este investigador y su grupo plantean que las altas temperaturas que se utilizan en estos tratamientos (80 °C), sean las causantes del aumento del marcado inespecífico. Para contrarrestar esto, incubaron las secciones de tejido en soluciones que contenían leche descremada, previo a la incubación del anticuerpo primario, lo que produjo una disminución del marcado inespecífico.

En el segundo ensayo de IF para detectar el MCHR-1 se decidió no pre-tratar a los tejidos, en base a los resultados obtenidos en el ensayo descrito anteriormente, donde se evidenció que el tratamiento por RA aumenta el marcado inespecífico.

Como variante, se introdujo a la azida de sodio en lavados, bloqueos y soluciones de incubación, en base al protocolo utilizado por Conductier y su grupo en el 2013 para localizar el MCHR-1 en las células ependimarias del tercer ventrículo de ratones por IF. Sin embargo, por más de haber realizado esta variante no obtuvimos los resultados esperados.

La detección de los receptores de neurotransmisores o neuromoduladores en animales wt y en tejidos nativos se hace difícil debido a la baja concentración de los mismos, lo cual fue reportado por McGrath & Daly en el 2006, debido a esto observamos igualmente, marcas que siguen una distribución en forma de puntos que no están concentrados en un lugar determinado.

Quizás puedan existir otros factores que estén influyendo en la distribución y localización del MCHR-1 a nivel celular. Por ejemplo, la familia de receptores PAR, específicamente el PAR1 y PAR2 (poseen como ligando la trombina, enzima que participa en el proceso de coagulación de la sangre), se encuentran en el aparato de Golgi mientras no haya niveles suficientes de trombina para que se de la unión ligando-receptor. Sin embargo, cuando los niveles de trombina aumentan, estos se movilizan desde el aparato de Golgi hacia la superficie de la membrana celular donde se da su activación (Heinis et al. 1994).

Otros GPCRs que se encuentran en muy baja densidad a nivel de la membrana plasmática son algunos de los receptores opioides, además su distribución *in vivo* cambia de acuerdo a la estimulación que estos reciben con morfina (Cahill et al. 2001; Morinville et al. 2003).

Estos estudios no nos dejan dudas de que la distribución de los GPCRs es dinámica y puede ser modificada *in vivo*. Además sabemos que el sistema MCHérgico posee un rol en la regulación del ciclo sueño vigilia, participa en el control energético y en la regulación de los estados de ánimo. Ya que el sistema MCHérgico participa en todas estas funciones, fluctuaciones en dichas funciones como pueden ser modificaciones en la duración de etapas del ciclo sueño – vigilia, variaciones propias del metabolismo de un organismo determinado, podrían afectar este sistema. Por ejemplo podría modificarse la intensidad de liberación de la MCH, así como la distribución o concentración del receptor en sus blancos celulares. Sin embargo los mecanismos que vincularían la implicancia de dichos procesos sobre el sistema MCHérgico están aún sin explorar.

Finalmente, en el tercer ensayo (denominado amplificación de señal) para la detección del MCHR-1 por IF obtuvimos la marca esperada (ya observada por IHQ), en el grupo de tejidos tratados con RA. En el grupo de tejidos sin tratar volvimos a observar el puntillado característico del ensayo anterior.

Este ensayo fue de detección de la señal por IF indirecta, al igual que los anteriores, pero en este caso el anticuerpo secundario que reconocía el anticuerpo primario, era biotinilado (como los utilizados en los ensayos de IHQ).

Al utilizar un anticuerpo secundario biotinilado (y no conjugado a un fluoróforo como en una IF directa estándar) estamos posibilitando la unión entre la biotina presente en el mismo y otra

molécula, la streptavidina, que se encuentra conjugada a un fluoróforo. Esta última permite que se forme un complejo alrededor del anticuerpo secundario, primario y el antígeno, que facilita su visualización, pues amplifica la señal.

El complejo biotina-avidina, streptavidina (en un principio se utilizaba la avidina, proteína extraída de los huevos y luego se empezó a utilizar la streptavidina extraída de bacterias) posee una gran afinidad, por lo que forma una estructura muy estable. Además, si la avidina o streptavidina está conjugada a un fluoróforo o enzima es capaz de reportar la presencia de antígenos de interés (Wilchek & Bayer 1990)

Luego de haber probado distintas variantes en los ensayos, concluimos que la correcta visualización del MCHR-1 por IF requiere el pre-tratamiento de los tejidos con RA para desenmascarar el antígeno presente en el tejido, la utilización de un anticuerpo secundario biotilado y de la streptavidina conjugada a un fluoróforo, lo cual nos permitió lograr la visualización del receptor en los cortes de cerebro de rata *Wistar*.

Debemos destacar que en el ensayo anterior, los controles negativos (realizados por omisión del anticuerpo primario, como se hizo anteriormente) presentaban un *background* intenso. Poniendo a prueba distintos controles negativos, se encontró que el más adecuado era el control sin streptavidina. La causa de la disminución del *background* es que la presencia de streptavidina, (omitiendo el anticuerpo primario y el secundario) sobre el tejido, igualmente emitía señal debido a la biotina endógena la cual servía como blanco de unión de la streptavidina conjugada a un fluoróforo. La biotina o también llamada vitamina H participa como cofactor de muchas carboxilasas que participan en el metabolismo de aminoácidos, ácidos grasos y carbohidratos de las células del organismo (Wakil et al. 1983; Cronan & Waldrop 2002; Tong 2014; Jitrapakdee & Wallace 1999).

Como también se mencionó en los resultados, también fue parte de este objetivo contextualizar la marca del MCHR-1 en la célula. Es decir, se realizaron tinciones de Nissl, específicamente con pironina y tionina para visualizar los somas neuronales, sobre cortes ensayados por IHQ para la detección del MCHR-1. Observamos que estas tinciones no se fijaron en los tejidos pre-tratados por RA por lo que no se lograron visualizar los gránulos de Nissl. Comprobamos efectivamente que el pretratamiento por RA afecta la fijación de dichas tinciones, ya que en los cortes sin pre-tratamiento se pueden observar resultados positivos para ambas tinciones, pero no fue posible detectar al MCHR-1, por lo que el empleo de dichas tinciones no permitieron contextualizar la marca.

Debido al poco éxito obtenido con las tinciones de Nissl, decidimos utilizar un marcador neuronal denominado NeuN (antígeno presente en el núcleo celular) con el objetivo de resolver y contextualizar la marca obtenida por el MCHR-1 en las células. Se obtuvieron resultados positivos por IHQ para NeuN, pero negativos para el MCHR-1, ya que quisimos detectar ambos antígenos en simultáneo, lo cual no fue posible. Debemos resaltar de que por más que el NeuN esté reportado en la literatura como un antígeno nuclear, las marcas obtenidas son a nivel del núcleo y del soma neuronal, como también observó Arellano y colaboradores en el 2012.

Por IF, la marca de NeuN se vio atenuada en los tejidos pre-tratados con RA, afectando la unión de anticuerpos anti-NeuN al antígeno. Mason y O'Leary en 1991 describieron que los procesos de fijación del tejido no afectarían la estructura secundaria de las proteínas, pero nosotros pensamos que esta afirmación es muy general y que los fijadores podrían limitar el acceso a ciertos antígenos, tal como opinaron McGrath y Daly en el 2006).

Otro factor que podría ser determinante en la fijación de los anticuerpos a los antígenos podría ser el pH de la solución desenmascarante utilizada para la RA.

En otro estudio también se utilizó la técnica de RA para visualizar distintos antígenos en tejidos de distintas especies, utilizaron distintos *buffers* de citrato de sodio con distintos pH. Ellos observaron que a pH por debajo de 6 la fijación de las inmunotinciones fue muy pobre y las marcas eran bastante tenues, mientras que al utilizar *buffer* citrato con pH entre 8,5 y 9 la inmunomarcación se visualizaba con mayor nitidez (Jiao et al. 1999). Esto podría explicar la debilidad de la marca en algunos de los antígenos que quisimos detectar, ya que el pH del *buffer* citrato utilizado fue de 6,3. Por lo tanto, no pudimos determinar que el MCHR-1 estaba presente en neuronas.

Otras pruebas deberán ser realizadas, con otras condiciones de ensayo y otros anticuerpos, para poder cumplir con este objetivo. A pesar de ello, se determinó la presencia del MCHR-1 en cultivos enriquecidos en neuronas de dos regiones del SNC como son el núcleo accumbens y el tubérculo olfatorio. El MCHR-1 colocalizaba con el marcador ciliar específico de neuronas denominado B tubulina III (Berbari et al. 2008).

Los últimos ensayos que se realizaron para cumplir con la totalidad del primer objetivo consistieron en la detección de marcadores ciliares que permitieran confirmar la localización del MCHR-1 a nivel de este apéndice.

En primer lugar se utilizaron dos marcadores para la detección por IHQ: tubulina acetilada (ya utilizada por Ledizet en 1987 y Li con colab. en 2013) y ACIII (utilizada también por Li con colab. en 2013; Arellano y su grupo en el 2012 y Berbari y Lewis en el 2008). Sin embargo en nuestro

caso solo obtuvimos resultados positivos para la tubulina acetilada, lo cual marca la α tubulina acetilada que forma los microtúbulos más antiguos en las células de mamíferos, los cuales se encuentran en las cilias primarias. Los cortes tratados con anticuerpos anti-ACIII presentaron un intenso *background* y ninguna marca positiva específica similar a la morfología de las cilias primarias.

Debido al éxito del ensayo obtenido con el marcador tubulina acetilada, éste fue el elegido para realizar ensayos de colocalización con el MCHR-1 por IF. Sin embargo, no observamos resultados positivos como si se habían observado por IHQ. Se utilizó también otro marcador ciliar, denominado ARL13B utilizado por Caspary, Larkins y Anderson en el 2007 pero no obtuvimos ningún tipo de marca al tratar los tejidos con anticuerpos anti-ARL13B. La proteína ARL13B es una pequeña GTPasa que podría estar involucrada en diversas funciones celulares, como por ejemplo el ensamblaje de microtúbulos en la cilia primaria y el transporte de otras proteínas de su misma familia (Cantagrel et al. 2008).

Igualmente fue posible realizar el ensayo de co-localización con los anticuerpos anti-MCHR-1 y otro marcador ciliar. El marcador utilizado por IF para la detección de las cilias primarias y que permitió observar la colocalización con el MCHR-1 fue la ACIII, con la cual habíamos obtenido resultados negativos por IHQ.

Observamos que gran parte de las marcas positivas para el receptor co-localizaban con marcas de la ACIII, pero no todas lo hacían. Entonces podemos agrupar a las neuronas presentes en las regiones analizadas en dos grupos, células que denominamos MCHR-1 (+) (con cilias primarias y el MCHR-1 presente en ellas) y células MCHR-1 (-) (con cilias primarias pero sin la presencia del MCHR-1).

Debemos agregar que la ACIII es activada por las proteínas G, G_s y G_i y tiene como función convertir el ATP en AMPc en respuesta a la activación por diversas hormonas o neurotransmisores (Defer et al. 2000). Esto podría sugerir que la ACIII podría actuar como molécula señalizadora en las situaciones donde la MCH activa la proteína G_i. Pero se debe tener en cuenta que esta proteína también está acoplada al receptor de somatostatina Sstr3 (Domire et al. 2011).

Por más que nuestra población de interés sean las posibles neuronas que poseen el MCHR-1 en sus cilias primarias, no debemos ignorar que quizás las células que poseen cilias primarias pero no presentan el MCHR-1 no sean únicamente neuronas. Está reportado que células gliales también pueden presentar cilias primarias, lo cual fue constatado en un cultivo de células hipocampales de ratón (Berbari et al. 2007).

Debemos destacar la particularidad de la localización del MCHR-1 en la célula, es decir su localización a nivel de las cilias primarias y no en la membrana plasmática de las células. Como nombramos anteriormente, no es el único GPCRs que posee una localización distinta a la clásica, es decir un compartimiento distinto a la membrana celular. Sin embargo en un estudio realizado en células en cultivo (HEK293) transfectadas con el receptor acoplado a GFP para su visualización, la marca observada a través de microscopia de fluorescencia se encuentra en la membrana celular de las células (Lembo et al. 1999).

Las proteínas ciliares, como las que forman los GPCRs, se producen en el retículo endoplásmico, sufren modificaciones en el aparato de Golgi y luego son transportadas a la base de la cilia mediante vesículas (Bloodgood 2000). Lo que hace que estos componentes, incluido el MCHR-1, se transporten hacia la membrana de la cilia y no hacia la membrana plasmática (por más que sean contiguas), es la existencia de ciertas secuencias consenso que determinan la localización a nivel ciliar y no en otro compartimiento (Berbari et al. 2008).

También se ha analizado la incidencia de mutaciones en distintas regiones del MCHR-1, sobre su localización. Sin embargo, solo ciertas mutaciones a nivel del tercer loop de la estructura del receptor (secuencia consenso conservada reportada por Berbari), hacen que este pierda la localización ciliar, por lo que su localización parece estar estrictamente regulada, en células hrpe1 en cultivo (Nagata et al. 2012).

Previo a la determinación del MCHR-1 a nivel de la cilia primaria, sugerimos que podían existir otros factores que regularan su localización, ya que esto sucedía con distintos GPCRs; uno de estos factores pueden ser las modificaciones sobre las cilias primarias propiamente dichas.

Un estudio de este mismo año muestra que la actividad del MCHR-1 está regulada en forma negativa por la proteína RGS8 (cómo se mencionó anteriormente, es una GTPasa); esto se verificó en un ratón modificado genéticamente para que sobre-expresara dicha proteína. En estas condiciones se observó un aumento en la longitud de las cilias primarias que contenían el receptor MCHR-1. Este resultado muestra que al impedir la activación del MCHR-1, es decir la acción de la MCH sobre su receptor, posibilita un mayor desarrollo de las cilias primarias. Lo cual también fue evidenciado a nivel comportamental y funcional, ya que en comparación a los ratones controles (sin sobre-expresión de RGS8) disminuirían los comportamientos pro-depresivos que pueden ser generados por la MCH (Kobayashi et al. 2018).

También es posible modificar la longitud de las cilias primarias en rodajas de cerebro de ratón y células en cultivo al tratarlas con litio, donde se observó un crecimiento en la longitud de las cilias primarias de las neuronas. (Miyoshi et al. 2009).

Utilizando diversas aproximaciones farmacológicas se constató que la despolimerización o estabilización de filamentos de actina, la activación de la proteína kinasa A y tratamientos con nocodazol (que cómo ya se mencionó afecta la estructura de los microtúbulos) también pueden producir un aumento de longitud en las cilias, en distintos tipos celulares en cultivo. (Sharma et al. 2011)

Dichos estudios nos llevan a sugerir que las modificaciones a nivel de las cilias podrían también ejercer modificaciones a nivel de los GPCRs presentes en ellas, en cuanto a su concentración y distribución.

Luego de haber constatado la presencia del MCHR-1 en el SNC de la rata y de confirmar su localización a nivel de las cilias primarias de las neuronas, se discutirán los resultados obtenidos sobre el fenotipo neuroquímico de las neuronas que presentaban el receptor.

2. Discusión de los resultados del segundo objetivo: Determinar el fenotipo neuroquímico de las neuronas del NDR que presentan el receptor.

Para la determinación de los fenotipos neuroquímicos de las neuronas que presentan el MCHR-1 también utilizamos las técnicas de IHQ e IF. Como ya fue mencionado en los antecedentes, el NDR es el principal núcleo serotoninérgico del SNC de la rata. De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, existe en dicho núcleo una población de neuronas que posee el MCHR-1 a nivel de las cilias primarias. Además como ya fue mencionado en la introducción, las neuronas MCHérgicas hipotalámicas envían sus proyecciones al NDR (Bittencourt et al. 1992; McGregor et al. 2005; Torterolo et al. 2009^b). Estas proyecciones se aproximan a somas y dendritas de neuronas serotoninérgicas, lo cual fue observado en ensayos de IF realizados sobre cortes de NDR en ratas (Urbanavicius et al. 2016)

Por lo cual es posible que las fibras MCHérgicas que contactan con neuronas serotoninérgicas liberen MCH, la cual lleve a cabo efectos mediante el MCHR-1 que fue identificado en dichas células.

Devera y colaboradores en el 2015 demostraron en ratas y gatos que MCH-ROD inyectada en los ventrículos laterales era internalizada en células del NDR, entre las cuales había células serotoninérgicas y no serotoninérgicas. En nuestro laboratorio, se utilizó un antagonista del MCHR-1 denominado ATC-175, previo a la administración de MCH-ROD i.c.v., lo que produjo el bloqueo de la internalización de la MCH-ROD en distintos núcleos del SNC incluido el NDR, esto confirmó que la internalización de la MCH es dependiente del MCHR-1 (Ruiz-Viroga 2017). En

dicho trabajo también se constató la internalización del conjugado en el NDR por parte de células serotoninérgicas y de otros fenotipos neuroquímicos.

La identificación de las neuronas serotoninérgicas junto con la identificación del MCHR-1 se hizo en primer lugar por IHQ. Esto fue posible ya que los antígenos a detectar se encuentran en compartimentos celulares diferentes y fue posible diferenciar ambas marcas. Como mencionamos en los resultados, las neuronas serotoninérgicas están suavemente marcadas en una coloración marrón (debido al DAB), pero que se logra diferenciar en gran medida del ruido de fondo. Pensamos que el intenso background observado está dado por el doble revelado realizado en el mismo tejido, ya que fue revelado en primer lugar la IHQ para detectar las neuronas serotoninérgicas con DAB, lo que de por sí generó cierto background y que se acentúa en el posterior revelado de la IHQ para detectar el MCHR-1 en los mismos tejidos con DAB e intensificación con níquel.

Posteriormente, también realizamos una doble IF para la detección del MCHR-1 y de las neuronas serotoninérgicas, con el objetivo de obtener resultados más claros. Se observaron marcas específicas que evidencian la presencia de neuronas serotoninérgicas en el NDR, pero las neuronas no se marcaron tan nítidamente como se hubiera esperado. Considerando el pre-tratamiento con RA, suponemos que la serotonina es otro de los antígenos afectado por los procesos de fijación y RA del tejido tal como sucedió con el NeuN.

Fue posible identificar dos poblaciones de neuronas serotoninérgicas, unas que poseen el receptor y otras que no, mientras que aparecen otras células que no son serotoninérgicas pero que poseen el MCHR-1. Estas dos poblaciones de neuronas serotoninérgicas también fueron observadas por Devera y colaboradores en el 2015 al realizar ensayos de IF y detectar neuronas serotoninérgicas que sí internalizaron el conjugado de MCH-ROD mientras otras no lo habían hecho, por lo que nuestros resultados avalan que el MCHR-1 se encuentra en parte de la población de neuronas serotoninérgicas.

La importancia biológica que puede tener la conexión entre el sistema serotoninérgico y el sistema MCHérgico se desprende de los antecedentes mencionados al comienzo de este trabajo. Como ya se mencionó la MCH participa en la regulación del ciclo sueño vigilia y en los estados de ánimo, ya que al microinyectarse MCH en el NDR se promueve el sueño REM y genera comportamientos pro-depresivos en las ratas (Lagos et al. 2009, 2011).

Particularmente a nivel celular, la MCH tiene un carácter inhibitorio a nivel presináptico, lo cual fue constatado en neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas del hipotálamo (Gao & van den Pol 2001). Pero, ¿qué efecto ejerce la MCH sobre las neuronas serotoninérgicas del NDR?

Debido a que en el estudio de Devera se constató que la actividad de descarga de las neuronas serotoninérgicas se encuentra disminuida durante el sueño, y están mayormente inactivas durante el sueño REM, sugieren que las neuronas MCHérgicas, que están activas durante el sueño REM inhiben a las neuronas serotoninérgicas del NDR provocando la disminución de su actividad durante esta etapa. De las evidencias morfológicas observadas en este trabajo, nosotros podemos agregar que la acción de la MCH sobre las neuronas serotoninérgicas está posiblemente mediada por el MCHR-1 presente en las cilias primarias de dichas neuronas.

Debido a que diversos estudios muestran la importante presencia de neuronas GABAérgicas en el NDR y que en los ensayos de detección de serotonina y MCHR-1, observamos marcas positivas para MCHR-1 en neuronas no-serotoninérgicas, decidimos estudiar si las neuronas GABAérgicas del NDR formaban parte de este grupo de neuronas que poseen el MCHR-1 pero que no presentan el fenotipo serotoninérgico. En un estudio donde se analizó las diferencias entre la población de células en el núcleo del Rafe de la rata, obtuvieron evidencias electrofisiológicas, morfológicas y neuroquímicas de las células del NDR, observaron que además de células serotoninérgicas también existen células GABAérgicas, entre otros fenotipos neuroquímicos en dicho núcleo (Calizo et al. 2011).

La detección de las neuronas GABAérgicas se realizó por IF, sobre dos grupos de tejidos. Se utilizó un grupo de tejidos de ratas que fueron tratadas con colchicina i.c.v. La colchicina es una sustancia que actúa como desestabilizador de microtúbulos y que al afectar el citoesqueleto permite la acumulación de las vesículas cargadas con neurotransmisores y sus enzimas de síntesis a nivel del soma. De esta forma se aumenta la concentración de GABA y de su enzima GAD, en un único sitio y la nitidez de la marca mejora, tal como fue observado por Stamp y Semba en 1995; y Bombardi en 2012.

Observamos diferencias cualitativas tanto en las marcas de las neuronas GABAérgicas como en las del MCHR-1 entre ambos grupos de tejidos. En los tejidos sin tratar con colchicina, se observó la marca del MCHR-1 en su típica conformación ya observada, desde el soma de algunas neuronas GABAérgicas en el NDR.

En el grupo pre-tratado con colchicina, la marca del MCHR-1 similar a la observada en los cortes sin colchicina solo se logra visualizar en regiones de la corteza cerebral, donde no se observan

somas de neuronas GABAérgicas, sino que parecerían visualizarse botones sinápticos que contienen GABA, como ya se mencionó en los resultados.

En el NDR de tejidos pre-tratados con colchicina no se observaron marcas positivas para el MCHR-1, pero sí se observaron neuronas GABAérgicas nítidamente marcadas. En otro estudio donde también pre trataron las ratas con colchicina para observar las neuronas GABAérgicas con mayor nitidez notaron una disminución de la densidad de fibras MCHérgicas (Urbanavicius et al. 2016).

Quizás esa observación del estudio anterior también se dio en los tejidos que se utilizaron en este trabajo (por más de que las fibras MCHérgicas no fueron identificadas) y esto afectó la distribución del MCHR-1. También puede haber sucedido que la colchicina ejerció mayor efecto en las zonas donde no se logra visualizar el MCHR-1 de su forma habitual, sino que se observa como un puntillado (ya observado en los protocolos previos al de amplificación de señal del MCHR-1). Se podría sugerir que la colchicina penetró en mayor medida en las profundidades del cerebro de la rata, afectando la estructura de las cilia primarias a nivel del NDR y del hipocampo, lo que hizo que el MCHR-1 dejara de detectarse en ellas.

En conclusión, fue posible detectar por IF la presencia del MCHR-1 en neuronas GABAérgicas. En el mismo estudio donde se comprobó que el MCH-ROD era internalizado por neuronas serotoninérgicas, también se comprobó que este conjugado era internalizado por neuronas GABAérgicas (Devera et al. 2015). Además también se constató el contacto de fibras MCHérgicas con neuronas GABAérgicas del NDR en ratas, por lo que la MCH estaría ejerciendo también un efecto modulador sobre el sistema GABAérgico (Urbanavicius et al. 2016).

Como ya se mencionó la MCH ejerce un efecto inhibitorio sobre las neuronas serotoninérgicas, pero debemos agregar que las neuronas GABAérgicas también ejercerían un efecto inhibitorio sobre ellas (Portas et al. 1996; Nitz and Siegel, 1997; Maloney et al. 1999; Torterolo et al. 2000). Sin embargo, Urbanavicius en el 2016 observó, por experimentos de microdialisis intracerebral, que este efecto inhibitorio de la MCH sobre la liberación de serotonina en el NDR se da a bajas concentraciones de la misma, mientras que a altas concentraciones no ocurre lo mismo. A altas concentraciones de MCH las neuronas inhibidas probablemente serían las GABAérgicas, por lo que la MCH al inhibir a las GABAérgicas, removería el tono GABAérgico inhibitorio sobre las neuronas serotoninérgicas, y de esa forma, estas últimas serían activadas (Adell 2002 et al.; Gervasoni et al. 2000). La inhibición de neuronas GABAérgicas producida por la MCH también fue observada en neuronas del hipotálamo (Gao & van den Pol 2001).

De acuerdo a lo planteado en el segundo objetivo, fue posible determinar el fenotipo neuroquímico de las neuronas que poseen el MCHR-1 ya que se identificaron neuronas serotoninérgicas y GABAérgicas. Esto permite la conexión además de anatómica, funcional entre estos tres sistemas de neurotransmisión.

Sin embargo, no podemos descartar que el MCHR-1 esté presente en otros fenotipos neuroquímicos, los cuales ya se encuentra reportada su presencia en el NDR. El NDR también posee células dopaminérgicas lo cual fue evidenciado por IHQ (Jahanshahi et al. 2013). El NDR, contiene además neuronas glutamatérgicas y nitrérgicas (Stamp & Semba 1995; Lowry et al. 2008; Calizo et al. 2011).

Conclusión

De acuerdo a los estudios y ensayos realizados en este trabajo podemos concluir que el MCHR-1 en el sistema nervioso central de la rata, se encuentra a nivel de las cilias primarias de las neuronas, en el hipotálamo, estriado, corteza cerebral, hipocampo y NDR. Esto fue evidenciado tanto por IHQ por IF. Además, de acuerdo a la importancia que tiene el NDR para nuestro grupo de trabajo, identificamos parte de los fenotipos neuroquímicos de las neuronas que poseen el MCHR-1, ya que se encuentra en neuronas serotoninérgicas, GABAérgicas y otras neuronas sin fenotipo neuroquímico identificado (ver figura resumen). Pensamos que estas conexiones de tipo anatómicas entre los sistemas MCHérgico, serotoninérgico y GABAérgico en el NDR sientan bases para futuros estudios en nuestro laboratorio de carácter funcional, por ejemplo vinculados a la fisiopatología del desorden de depresión mayor.

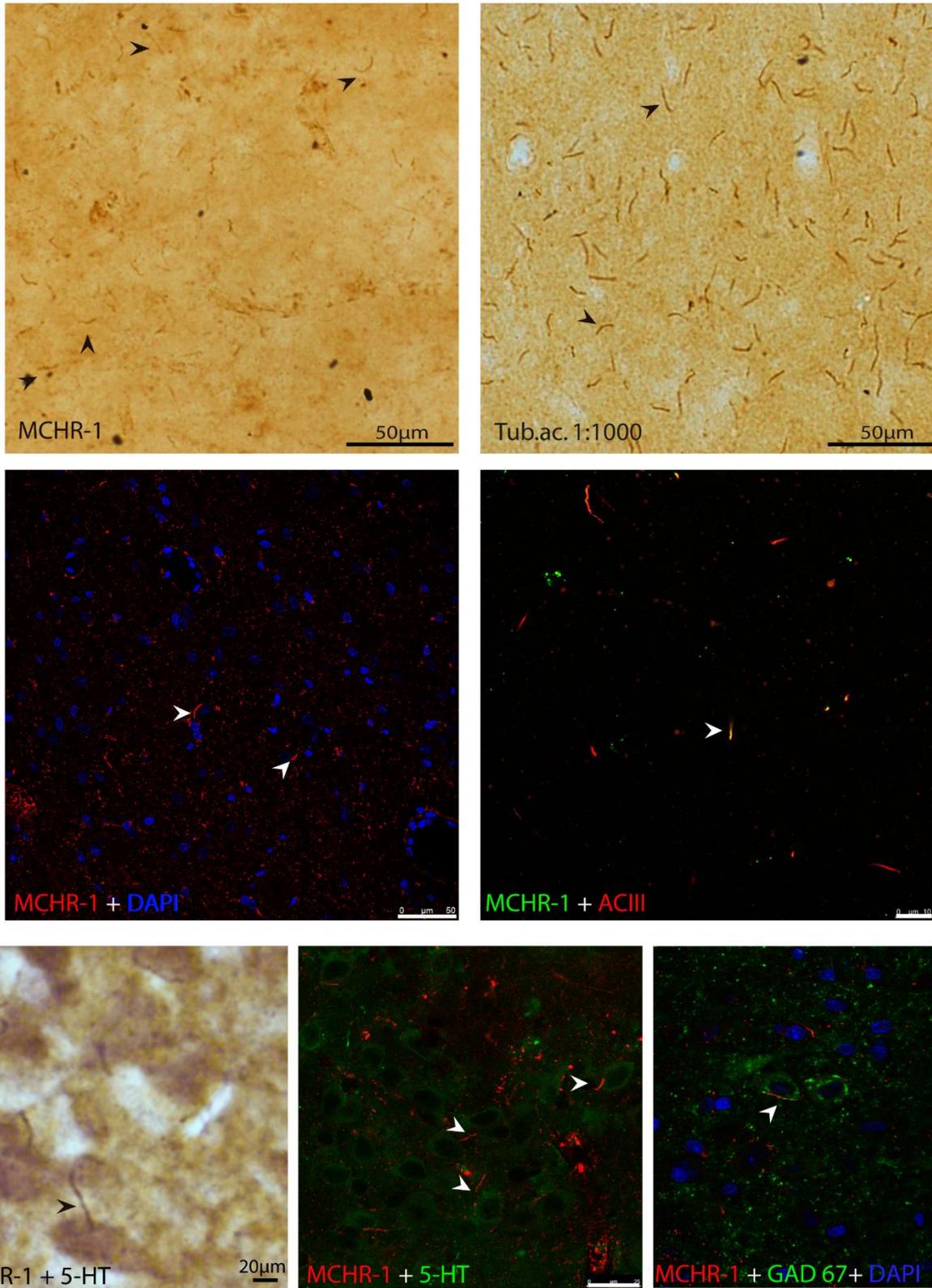


Figura resumen| Imágenes de los resultados positivos más significativos obtenidos en este trabajo. Se observan la detección del MCHR-1 y de las cilias primarias por IHQ e IF. También se visualizan fotos representativas de los ensayos de detección de neuronas serotoninérgicas y el MCHR-1 por IHQ e IF. Por último se observa una foto representativa del ensayo de detección de neuronas gabaérgicas y el MCHR-1 por IF.

Perspectivas

-Realizar ensayos de identificación del MCHR-1 sobre tejidos tratados con MCH conjugada a rodamina para confirmar que las neuronas MCH-ROD (+) son MCHR-1 (+). O realizar ensayos de inmunofluorescencia anti-MCH endógena para determinar si las fibras MCHérgicas se encuentran en las vecindades de las neuronas MCHR-1 (+), lo que evidenciaría una conexión funcional entre esos sistemas.

-Realizar ensayos *in vivo* que permitan el estudio de la distribución del MCHR-1 en distintas condiciones, como por ejemplo frente a manipulaciones farmacológicas que afecten la longitud de las cilias primarias (por ejemplo utilizando algún bloqueante del regulador negativo del MCHR-1 (RGS8), el cual en sobreexpresión estimula el aumento de longitud de la cilia) y cuantificar las variaciones de longitud.

-Comparar la distribución, localización y concentración del MCHR-1 observados en una rata normal con un modelo de depresión, por ejemplo, luego de realizar microinyecciones de MCH en el NDR de la rata. Sobre ese modelo de depresión evaluar si existen diferencias entre machos y hembras a nivel de la concentración de fibras MCHérgicas y distribución del MCHR-1.

-Continuar con la identificación de los fenotipos neuroquímicos de las neuronas que poseen el MCHR-1 en el NDR, por ejemplo dopaminérgicos y nitrérgicos y comparar su distribución en relación a los serotoninérgicos y GABAérgicos.

Perspectivas técnicas

-Buscar métodos alternativos para disminuir el marcado inespecífico y la autofluorescencia.

- Realizar una tinción o inmunomarcación para confirmar la presencia de eritrocitos en los tejidos, por ejemplo utilizando un anticuerpo von Willebrand que detecta el factor de mismo nombre (glucoproteína sanguínea) o un anticuerpo contra el receptor del mismo factor (glucoproteína Ib-V-IX), que se encuentra en el endotelio. También podría utilizarse la tinción denominada lectina de tomate específica para vasos.

-Utilizar una solución de *buffer* citrato para el proceso de recuperación con un pH más básico que el de la solución utilizada, con el objetivo de mejorar la nitidez de la marca de algunos antígenos.

Bibliografía

- 1- Adell A, Celada P, Abellán MT, Artigas F. 2002. "Origin and functional role of the extracellular serotonin in the midbrain raphe nuclei". *Brain Res Brain Res Rev* 39 (2–3):154–180.
- 2- Ahnaou A, Drinkenburg WH, Bouwknecht JA, Alcazar J, Steckler T, and Dautzenberg FM. 2008. "Blocking Melanin-Concentrating Hormone MCH1 Receptor Affects Rat Sleep-Wake Architecture." *European Journal of Pharmacology* 579 (1–3): 177–88.
- 3- Arellano JI, Guadiana SM, Breunig JJ, Rakic P and Sarkisian MR. 2012. "Development and Distribution of Neuronal Cilia in Mouse Neocortex." *Journal of Comparative Neurology* 520 (4): 848–73.
- 4- Aughton KL, Hamilton-Smith K, Gupta J, Morton JS, Wayman CP, and Jackson VM. 2008. "Pharmacological Profiling of Neuropeptides on Rabbit Vaginal Wall and Vaginal Artery Smooth Muscle in Vitro." *British Journal of Pharmacology* 155 (2): 236–43.
- 5- Baly C, Aioun J, Badonnel K, Lacroix MC, Durieux D, Schlegel C, Salesse R, and Caillol M. 2007. "Leptin and Its Receptors Are Present in the Rat Olfactory Mucosa and Modulated by the Nutritional Status." *Brain Research* 1129 (1): 130–41.
- 6- Beisker W, Dolbeare F, and Gray JW. 1987. "An Improved Immunocytochemical Procedure for High-sensitivity Detection of Incorporated Bromodeoxyuridine." *Cytometry* 8 (2): 235–39.
- 7- Berbari NF^a, Johnson AD, Lewis JS, Askwith CC and Mykytyn K. 2008. "Identification of Ciliary Localization Sequences within the Third Intracellular Loop of G Protein-Coupled Receptors." *Molecular Biology of the Cell* 19 (4): 1540–47.
- 8- Berbari NF^b, Lewis JS, Bishop GA, Askwith CC, and Mykytyn K. 2008. "Bardet-Biedl Syndrome Proteins Are Required for the Localization of G Protein-Coupled Receptors to Primary Cilia." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (11): 4242–46.
- 9- Berbari NF, Kin NW, Neeraj Sharma, Edward J. Michaud, Robert A. Kesterson, and Bradley K. Yoder. 2011. "Mutations in Traf3ip1 Reveal Defects in Ciliogenesis, Embryonic Development, and Altered Cell Size Regulation." *Developmental Biology* 360 (1). : 66–76.

- 10- Berbari NF, Malarkey EB, Yazdi SM, McNair AD, Kippe JM, Croyle MJ, Kraft TW and Yoder BK. 2014. "Hippocampal and Cortical Primary Cilia Are Required for Aversive Memory in Mice." *PLoS ONE* 9 (9).
- 11- Berbari NF, Sharma N, Malarkey EB, Pieczynski JN, Gaertig J, Guay-woodford L and Yoder BK. 2014. "Microtubule Modifications and Stability Are Altered by Cilia Perturbation and in Cystic Kidney Disease" 70 (1): 24–31.
- 12- Berbari NF, Bishop GA, Askwith CC, Lewis JS and Mykytyn K. 2007. "Hippocampal Neurons Possess Primary Cilia in Culture." *Journal of Neuroscience Research* 85 (5): 1095–1100.
- 13- Bernardis LL and Bellinger LL. 1996. "The Lateral Hypothalamic Area Revisited: Ingestive Behavior." *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 20 (2): 189–287.
- 14- Bittencourt JC, Presse F, Arias C, Peto C, Vaughan J, Nahon JL, Vale W and Sawchenko PE. 1992. "The Melanin-concentrating Hormone System of the Rat Brain: An Immuno- And Hybridization Histochemical Characterization." *Journal of Comparative Neurology* 319 (2): 218–45.
- 15- Bloodgood RA. 2000. "Protein Targeting to Flagella of Trypanosomatid Protozoa." *Cell Biology International*.
- 16- Bombardi C. 2012. "Neuronal Localization of 5-HT_{2A} Receptor Immunoreactivity in the Rat Hippocampal Region." *Brain Research Bulletin* 87 (2–3).
- 17- Borowsky B, Durkin MM, Mohammad KO, Marzabadi R, DeLeon J, Heurich R, Lichtblau H et al. 2002. "Antidepressant, Anxiolytic and Anorectic Effects of a Melanin-Concentrating Hormone-1 Receptor Antagonist." *Nature Medicine*, 825–30.
- 18- Brailov I, Bancila M, Brisorgueil MJ, Miquel MC, Hamon M and Vergé D. 2000. "Localization of 5-HT₆ Receptors at the Plasma Membrane of Neuronal Cilia in the Rat Brain." *Brain Research* 872 (1–2): 271–75.
- 19- Cahill CM, Morinville A, Lee MC, Vincent JP, Collier B and Beaudet A. 2001. "Prolonged Morphine Treatment Targets δ Opioid Receptors to Neuronal Plasma Membranes and Enhances δ -

Mediated Antinociception". *The Journal of Neuroscience*. 21(19):7598–7607

- 20- Calizo LH, Akanwa A, Ma X, Pan YZ, Lemos JC, Craige C, Heemstra LA and Beck SG. 2011. "Raphe Serotonin Neurons Are Not Homogenous: Electrophysiological, Morphological and Neurochemical Evidence." *Neuropharmacology* 61 (3). Elsevier Ltd: 524–43.
- 21- Cantagrel V, Silhavy JL, Bielas SL, Swistun D, Holden KR, Marsh SE, Bertrand JY, et al. 2008. "Mutations in the Cilia Gene ARL13B Lead to the Classical Form of Joubert Syndrome," 170–79.
- 22- Caspary T, Larkins CE and Anderson KV. 2007. "Article The Graded Response to Sonic Hedgehog Depends on Cilia Architecture," no. May: 767–78.
- 23- Chambers J, Ames RS, Bergsma D, Muir A, Fitzgerald LR, Hervieu G, Dytko GM, et al. 1999. "Melanin-Concentrating Hormone Is the Cognate Ligand for the Orphan G- Protein-Coupled Receptor SLC-1." *Nature* 400 (6741): 261–65.
- 24- Conductier G, Brau F, Viola A, Langlet F, Ramkumar N, Dehouck B, Lemaire T, et al. 2013. "Melanin-Concentrating Hormone Regulates Beat Frequency of Ependymal Cilia and Ventricular Volume." *Nature Neuroscience* 16 (7): 845–47.
- 25- Cronan JE and Waldrop GL. 2002. "Multi-Subunit Acetyl-CoA Carboxylases." *Progress in Lipid Research*.
- 26- Davenport JR, Watts AJ, Roper VC, Croyle MJ, van Groen T, Wyss JM, Nagy TR, Kesterson RA, and Yoder BK. 2007. "Disruption of Intraflagellar Transport in Adult Mice Leads to Obesity and Slow-Onset Cystic Kidney Disease." *Current Biology* 17 (18): 1586–94.
- 27- Davis, E.E. and Katsanis, N. (2012) "The ciliopathies: a transitional model into systems biology of human genetic disease," *Current Opinion in Genetics & Development*, 22(3) 290-303.
- 28- Defer N, Best-Belpommev M and Hanoune J. 2000. "Tissue Specificity and Physiological Relevance of Various Isoforms of Adenylyl Cyclase." *American Journal of Physiology. Renal Physiology* 279: F400–416.

- 29- Devera A, Pascovich C, Lagos P, Falconi A, Sampogna S, Chase MH and Torterolo P. 2015. "Melanin-Concentrating Hormone (MCH) Modulates the Activity of Dorsal Raphe Neurons." *Brain Research* 1598: 114–28.
- 30- Dias Abdo Agamme AL, Aguilar Calegare BF, Fernandes L, Costa A, Lagos P, Torterolo P and D'Almeida V. 2015. "MCH Levels in the CSF, Brain preproMCH and MCHR1 Gene Expression during Paradoxical Sleep Deprivation, Sleep Rebound and Chronic Sleep Restriction." *Peptides* 74. Elsevier Inc.: 9–15.
- 31- Domire JS, Green JA, Lee KG, Johnson AD, Askwith CC and Mykytyn K. 2011. "Dopamine Receptor 1 Localizes to Neuronal Cilia in a Dynamic Process That Requires the Bardet-Biedl Syndrome Proteins." *Cellular and Molecular Life Sciences* 68 (17): 2951–60.
- 32- Engle SE, Antonellis PJ, Whitehouse LS, Bansal R, Emond MR, Jontes JD, Kesterson RA, Mykytyn K and Berbari NF. 2018. "A CreER Mouse to Study Melanin Concentrating Hormone Signaling in the Developing Brain". *genesis*. 56:e23217
- 33- Ferguson SS. 2001. "Evolving Concepts in G Protein-Coupled Receptor Endocytosis: The Role in Receptor Desensitization and Signaling." *Pharmacological Reviews* 53 (1): 1–24.
- 34- Francke F, Ward RJ, Jenkins L, Kellett E, Richter D, Milligan G and Bächner D. 2006. "Interaction of Neurochondrin with the Melanin-Concentrating Hormone Receptor 1 Interferes with G Protein-Coupled Signal Transduction but Not Agonist-Mediated Internalization." *Journal of Biological Chemistry* 281 (43): 32496–507.
- 35- Gao XB and van den Pol AN. 2001. "Melanin-Concentrating Hormone Depresses Synaptic Activity of Glutamate and GABA Neurons from Rat Lateral Hypothalamus." *Journal of Physiology* 533 (1): 237–52.
- 36- Gao XB and van den Pol AN .2002. Melanin-concentrating hormone depresses L-, N-, and P/Q-type voltage-dependent calcium channels in rat lateral hypothalamic neurons. *Journal of Physiology* 542:273–286
- 37- Gervasoni D, Peyron C, Rampon C, Barbagli B, Chouvet G, Urbain N, Fort P, Luppi PH. 2000. "Role and origin of the GABAergic innervations of dorsal raphe serotonergic neurons". *J Neurosci*.

20:4217-4225.

- 38- Hamon M, Doucet E, Lefevre K, Miquel MC, Lanfumey L, Insausti R, Frechilla D, Del Rio J, Verge D. 1999. Antibodies and antisense oligonucleotide for probing the distribution and putative functions of central 5-HT₆ receptors. *Neuropsychopharmacology*. 21:68S–76S
- 39- Händel M., Schulz S., Stanarius A., Schreff M., Erdtmann-Vourliotis M., Schmidt H., Wolf G., Holtt V. Selective targeting of somatostatin receptor 3 to neuronal cilia. *Neuroscience*. 1999;89:909–926.
- 40- Hawes BE, Erin KIL, Green B, O’Neill KIM, Fried S and Graziano MP. 2000. “The Melanin-Concentrating Hormone Receptor Couples to Multiple G Proteins to Activate Diverse Intracellular Signaling Pathways.” *Endocrinology* 141 (12): 4524–32.
- 41- Heinis L, Ishiinit K, Coughlin SR and Brian K. 1994. “Intracellular Targeting and Trafficking of Thrombin Receptors.”
- 42- Hervieu GJ, Cluderay JE, Harrison D, Meakin J, Maycox P, Nasir S and Leslie RA. 2000. “The Distribution of the mRNA and Protein Products of the Melanin-Concentrating Hormone (MCH) Receptor Gene, Slc-1, in the Central Nervous System of the Rat.” *Eur J Neurosci* 12 (4): 1194–216.
- 43- Jahanshahi A, Steinbusch HWM and Temel Y. 2013. “Distribution of Dopaminergic Cell Bodies in the Median Raphe Nucleus of the Rat Brain.” *Journal of Chemical Neuroanatomy* 53. 60–63.
- 44- Jiao Y, Sun Z, Lee T, Fusco FR et al. 1999. “A Simple and Sensitive Antigen Retrieval Method for Free- Oating and Slide-Mounted Tissue Sections.” *Journal of Neuroscience Methods* 93: 149–62.
- 45- Jitrapakdee, S and Wallace JC. 1999. “Structure, Function and Regulation of Pyruvate Carboxylase.” *Biochem.J.* 340 (0264–6021): 1–16.
- 46- Kawauchi H, Kawazoe I, Tsubokawa M, Kishida M and Baker BI. 1983. “Characterization of Melanin-Concentrating Hormone in Chum Salmon Pituitaries.” *Nature*.
- 47- Kobayashi Y, Takemoto R, Yamato S, Okada T, Iijima M, Uematsu Y, Chaki S and Saito Y. 2018.

- “Depression-Resistant Phenotype in Mice Overexpressing Regulator of G Protein Signaling 8 (RGS8).” *Neuroscience* 383: 160–69.
- 48- Lagos P, Torterolo P, Jantos H, Chase MH and Monti JM. 2009. “Effects on Sleep of Melanin-Concentrating Hormone (MCH) Microinjections into the Dorsal Raphe Nucleus.” *Brain Research* 1265: 103–10.
- 49- Lagos P, Urbanavicius J, Scorza MC, Miraballes R and Torterolo P. 2011. “Depressive-like Profile Induced by MCH Microinjections into the Dorsal Raphe Nucleus Evaluated in the Forced Swim Test.” *Behavioural Brain Research* 218 (2): 259–66.
- 50- Lakaye B, Minet A, Zorzi W and Grisar T. 1998. “Cloning of the Rat Brain cDNA Encoding for the SLC-1 G Protein-Coupled Receptor Reveals the Presence of an Intron in the Gene.” *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1401 (2): 216–20.
- 51- Ledizet M. 1987. “Microtubules Containing Acetylated α -Tubulin in Mammalian Cells in Culture” 104: 289–302.
- 52- Lee JH and Gleeson JG. 2010. “The Role of Primary Cilia in Neuronal Function.” *Neurobiology of Disease*.
- 53- Lembo PM, Grazzini E, Cao J, Hubatsch DA, Pelletier M, Hoffert C, St-Onge S, et al. 1999. “The Receptor for the Orexigenic Peptide Melanin-Concentrating Hormone Is a G-Protein-Coupled Receptor.” *Nature Cell Biology* 1 (5): 267–71.
- 54- Li F, Ponissery-saidu S, Yee KK, Wang H, Chen ML, Iguchi N, Zhang G, Jiang P, Reisert J and Huang L. 2013. “Heterotrimeric G Protein Subunit G γ 13 Is Critical to Olfaction” 33 (18): 7975–84.
- 55- Lowry CA, Evans AK, Gasser PJ, Hale MW, Staub DR, Shekhar A. 2008. “Topographical organization and chemoarchitecture of the dorsal raphe nucleus and the medial raphe nucleus”. In Monti JM et al. (Eds), *Serotonin and Sleep: molecular, functional and clinical aspects*. Birkhauser Verlag, Switzerland. 25–68.
- 56- Ludwig DS, Tritos NA, Mastaitis JW, Kulkarni R, Kokkotou E, Elmquist J, Lowell B, Flier JS and Maratos-Flier E. 2001. “Melanin-Concentrating Hormone Overexpression in Transgenic Mice

- Leads to Obesity and Insulin Resistance." *The Journal of Clinical Investigation* 107 (3): 379–86.
- 57- Luttrell LM and Lefkowitz RJ. 2002. "The Role of Beta-Arrestins in the Termination and Transduction of G-Protein-Coupled Receptor Signals." *Journal of Cell Science* 115 (3): 455–65.
- 58- Macdonald D, Murgolo N, Zhang R, Durkin JP, Yao X, Strader CD and Graziano. 2000. "Molecular Characterization of the Melanin-Concentrating Hormone/receptor Complex: Identification of Critical Residues Involved in Binding and Activation." *Molecular Pharmacology* 58 (1): 217–25.
- 59- Maloney KJ, Mainville L, Jones BE. 1999. "Differential c-Fos expression in cholinergic, monoaminergic, and GABAergic cell groups of the pontomesencephalic tegmentum after paradoxical sleep deprivation and recovery". *J. Neurosci.* 19: 3057–3072.
- 60- Mason JT and O'Leary TJ. 1991. "Effects of Formaldehyde Fixation on Protein Secondary Structure: A Calorimetric and Infrared Spectroscopic Investigation." *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 39 (2): 225–29.
- 61- McGrath JC and CJ Daly. 2006. "Use of Fluorescent Ligands and Receptors to Visualize Adrenergic Receptors." *The Adrenergic Receptors*, no. July 2015: 151–72.
- 62- McGregor R, Damián A, Fabbiani G, Torterolo P, Pose I, Chase M and Morales FR. 2005. "Direct Hypothalamic Innervation of the Trigeminal Motor Nucleus: A Retrograde Tracer Study." *Neuroscience* 136 (4): 1073–81.
- 63- Miyamoto-Matsubara M, Saitoh O, Maruyama K, Aizaki Y and Saito Y. 2008. "Regulation of Melanin-Concentrating Hormone Receptor 1 Signaling by RGS8 with the Receptor Third Intracellular Loop." *Cellular Signalling* 20 (11): 2084–94.
- 64- Miyoshi K, Kasahara K, Miyazaki I and Asanuma M. 2009. "Lithium Treatment Elongates Primary Cilia in the Mouse Brain and in Cultured Cells." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 388 (4): 757–62.
- 65- Morinville A, Cahill CM, Esdaile MJ, Aibak H, Collier B, Kieffer BL and Beaudet A. 2003. "Regulation of δ -Opioid Receptor Trafficking via δ -Opioid Receptor Stimulation : Evidence from δ -Opioid Receptor Knock-Out Mice" 23 (12): 4888–98.

- 66- Murdoch H, Feng GJ, Bächner D, Ormiston L, White JH, Richter D and Milligan G. 2005. "Periplakin Interferes with G Protein Activation by the Melanin- Concentrating Hormone Receptor-1 by Binding to the Proximal Segment of the Receptor C-Terminal Tail." *Journal of Biological Chemistry* 280 (9): 8208–20.
- 67- Nagata A, Hamamoto A, Horikawa M, Yoshimura K, Takeda S and Saito Y. 2012. "Characterization of Ciliary Targeting Sequence of Rat Melanin-Concentrating Hormone Receptor 1." *General and Comparative Endocrinology* 188 (1): 159–65.
- 68- Nauli SM, Alenghat FJ, Luo Y, Williams E, Vassilev P, Li X, Elia AEH, et al. 2003. "Polycystins 1 and 2 Mediate Mechanosensation in the Primary Cilium of Kidney Cells." *Nature Genetics* 33 (2): 129–37.
- 69- Nitz D & Siegel J. 1997. "GABA release in the dorsal raphe nucleus: role in the control of REM sleep." *Am. J. Physiol.* 273: R451–455.
- 70- Noble EE, Hahn JD, Konanur VR, Hsu TM, Page SJ, Cortella AM, Liu CM, et al. 2018. "Control of Feeding Behavior by Cerebral Ventricular Volume Transmission of Melanin-Concentrating Hormone." *Cell Metabolism* 28 (1): 55–68.e7.
- 71- O'Connor AK, Malarkey EB, Berbari NF, Croyle MJ, Haycraft CJ, Bell PD, Hohenstein P, RA Kesterson and Yoder BK. 2013. "An Inducible CiliaGFP Mouse Model for in Vivo Visualization and Analysis of Cilia in Live Tissue." *Cilia* 2 (1): 1–14.
- 72- Orihara K, Morita H, Yagami A, Kajiwara N, Nakae S, Matsumoto K, Nagasaki H, Saito Y, Saito H and Matsuda A. 2009. "TH2 Cytokines Potently Induce an Appetite-Stimulating Peptide, Melanin-Concentrating Hormone, in Human Vascular Endothelial Cells." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 124 (3).
- 73- Pan J, Wang Q and Snell WJ (2005) "Cilium-generated signaling and cilia-related disorders," *Laboratory Investigation*, 85 (4) 452-463.
- 74- Paxinos G, Watson C. 2005. The rat brain in stereotaxic coordinates. 5th ed. Sydney: Academic Press.

- 75- Pedersen LB and Rosenbaum JL. 2008. "Chapter Two Intraflagellar Transport (IFT). Role in Ciliary Assembly, Resorption and Signalling." *Current Topics in Developmental Biology*.
- 76- Portas CM, Thakkar M, Rainnie D, McCarley RW. 1996. "Microdialysis perfusion of 8-hydroxy-2 (di-*n*-propylamino)tetralin (8-OH- DPAT) in the dorsal raphe nucleus decreases serotonin release and increases rapid eye movement sleep in the freely moving cat". *Journal of Neuroscience*. 16: 2820–2828.
- 77- Praetorius HA and Spring KR. 2001. "Bending the MDCK Cell Primary Cilium Increases Intracellular Calcium." *Journal of Membrane Biology* 184 (1): 71–79.
- 78- Ruiz V. 2017. Estudios in vivo de la internalización de la hormona concentradora de melanina (MCH) y su receptor MCHR1 en el Sistema Nervioso Central de rata. Tesis de Maestría.
- 79- Saito Y, Wang Z, Hagino-Yamagishi K, Civelli O, Kawashima S and Maruyama K. 2001^a. "Endogenous Melanin-Concentrating Hormone Receptor SLC-1 in Human Melanoma SK-MEL-37 Cells." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 289 (1): 44–50.
- 80- Saito Y, Cheng M, Leslie FM and Civelli O. 2001^b. "Expression of the Melanin-Concentrating Hormone (MCH) Receptor mRNA in the Rat Brain." *J Comp Neurol* 435 (1): 26–40.
- 81- Saito Y and Nagasaki H. 2008. "The Melanin-Concentrating Hormone System and Its Physiological Functions." *Results and Problems in Cell Differentiation* 46: 159–79.
- 82- Saito Y, Nothacker HP and Civelli O. 2000. "Melanin-Concentrating Hormone Receptor: An Orphan Receptor Fits the Key." *Trends in Endocrinology and Metabolism*.
- 83- Saito Y, Nothacker HP, Wang Z, Lin SHS, Leslie F and Civelli O. 1999. "Molecular Characterization of the Melanin-Concentrating-Hormone Receptor." *Nature* 400 (6741): 265–69.
- 84- Saito Y, Tetsuka M, Li Y, Kurose H and Maruyama K. 2004. "Properties of Rat Melanin-Concentrating Hormone Receptor 1 Internalization." *Peptides* 25 (10): 1597–1604.
- 85- Sanchez M, Baker BI and Celis M. 1997. "Melanin-Concentrating Hormone (MCH) Antagonizes the Effects of α -MSH and Neuropeptide E-I on Grooming and Locomotor Activities in the Rat."

Peptides 18 (3): 393–96.

- 86- Sandig H, McDonald J, Gilmour J, Arno M, Lee TH and Cousins DJ. 2007. "Human Th2 Cells Selectively Express the Orexigenic Peptide, pro-Melanin-Concentrating Hormone." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (30): 12440–44.
- 87- Santollo J & Eckel LA. 2013. "Oestradiol decreases melanin-concentrating hormone (MCH) and MCH receptor expression in the hypothalamus of female rats" *Journal of Neuroendocrinology*. 25(6): 570–579.
- 88- Sharma N, Kosan ZA, Stallworth JE, Berbari NF and Yoder BK. 2011. "Soluble Levels of Cytosolic Tubulin Regulate Ciliary Length Control." *Molecular Biology of the Cell* 22 (6): 806–16.
- 89- Shimada M, Tritos NA, Lowell BB, Flier JS and Maratos-Flier E. 1998. "Mice Lacking Melanin-Concentrating Hormone Are Hypophagic and Lean." *Nature* 396 (December): 670–74.
- 90- Sorokin S. 1962. "Centrioles and the Formation of Rudimentary Cilia by Fibroblasts and Smooth Muscle Cells.," no. 10.
- 91- Stamp JA and Semba K. 1995. "Extent of Colocalization of Serotonin and GABA in the Neurons of the Rat Raphe Nuclei." *Brain Research* 677 (1): 39–49.
- 92- Tan CP, Iwaasa HSH, Pan J, Sailer AW, Hreniuk DL, Feighner SD, et al. 2002. "Melanin-Concentrating Hormone Receptor Subtypes 1 and 2: Species-Specific Gene Expression." *Genomics* 79 (6): 785–92.
- 93- Tetsuka M, Saito Y, Imai K, Doi H and K Maruyama. 2004. "The Basic Residues in the Membrane-Proximal C-Terminal Tail of the Rat Melanin-Concentrating Hormone Receptor 1 Are Required for Receptor Function." *Endocrinology* 145 (8): 3712–23.
- 94- Tong L. 2014. "Structure and Function of Biotin-Dependent Carboxylases" 70 (5): 863–91.
- 95- Torterolo P, Lagos P and Monti JM. 2011. "Melanin-Concentrating Horm One: A New Sleep Factor?" *Frontiers in Neurology* 2: 1–12.

- 96- Torterolo P, Lagos P, Sampogna S and Chase MH. 2008. "Melanin-Concentrating Hormone (MCH) Immunoreactivity in Non-Neuronal Cells within the Raphe Nuclei and Subventricular Region of the Brainstem of the Cat." *Brain Research* 1210: 163–78.
- 97- Torterolo P, Rojas M, Sampogna S, Morales FR and Chase MH. 2003. MCH-containing neurons and the control of sleep and wake-fulness. *Sleep* 26, A20.
- 98- Torterolo P, Yamuy J, Sampogna S, Morales FR, Chase MH. 2000. GABAergic neurons of the cat dorsal raphe nucleus express c-fos during carbachol-induced active sleep. *Brain Research* 884: 68–76
- 99- Torterolo P, Scorza C, Lagos P, Urbanavicius J, Miraballes R, Jantos H and Monti JM. 2009^a. "228 Melanin-Concentrating Hormone (Mch) in the Dorsal Raphe Nucleus: Role in Rem Sleep and Depression." *Sleep Medicine* 10: 61–62.
- 100- Torterolo P, Sampogna S and Chase MH. 2009^b. "MCHergic Projections to the Nucleus Pontis Oralis Participate in the Control of Active (REM) Sleep." *Brain Research* 1268: 76–87.
- 101- Ungerfeld R, Alzugaray S, Quintela HG, Lagos P, Torterolo P and Bielli A. 2011. "Melanin Concentrating Hormone (MCH) in the Cerebrospinal Fluid of Ewes during Spontaneous Oestrous Cycles and Ram Effect Induced Follicular Phases." *Peptides* 32 (12): 2511–13.
- 102- Urbanavicius J, Lagos P, Torterolo P, Abin-Carriquiry JA and Scorza C. 2016. "Melanin-Concentrating Hormone Projections to the Dorsal Raphe Nucleus: An Immunofluorescence and in Vivo Microdialysis Study." *Journal of Chemical Neuroanatomy* 72.: 16–24.
- 103- Vaughan JM, Fischer WH, Hoeger C, Rivier J and Vale W. 1989. "Characterization of Melanin-Concentrating Hormone from Rat Hypothalamus." *Endocrinology* 125 (3): 1660–65.
- 104- Verret L, Goutagny R, Fort P, Cagnon L, Salvert D, Léger L, Boissard R, Salin P, Peyron C and Luppi P. 2003. "Central Regulation of Paradoxical Sleep." *BMC Neuroscience* 10: 1–10.
- 105- Wakil SJJ, Stoops JKK and Joshi VCC. 1983. "Fatty Acid Synthesis and Its Regulation." *Annual Review of Biochemistry* 52: 537–79.

- 106-Wilchek M and Bayer EA. 1990. "Introduction to Avidin-Biotin Technology." *Methods in Enzymology* 184 (C): 5–13.
- 107-Yale Flow Cytometry. 2018. "Flow cytometry (FACS) staining protocol (Cell surface staining)" <https://medicine.yale.edu/immuno/flowcore/protocols/analysis.aspx>. Consultado 27/09/2018.
- 108-Yoon YS and Lee HS. 2013. "Projections from Melanin-Concentrating Hormone (MCH) Neurons to the Dorsal Raphe or the Nuclear Core of the Locus Coeruleus in the Rat." *Brain Research* 1490: 72-82

Anexo

Tabla 2| Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en los ensayos de IHQ, con sus respectivos huéspedes, concentraciones y compañía.

Anticuerpos utilizados para IHQ	
Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario
Goat anti-MCHR-1 (1:1000, Santa Cruz Biotechnology)	Donkey anti-goat biotinilado (1:600, Jackson Inmunoresearch)
Mouse anti-NeuN (1:500, Millipore)	Donkey anti-mouse biotinilado (1:600, Jackson Inmunoresearch)
Mouse anti-tubulina acetilada (1:500, 1:1000 Sigma Aldrich)	Donkey anti-mouse biotinilado (1:600, Jackson Inmunoresearch)
Rabbit anti-ACIII (1:500, 1:1000, Santa Cruz)	Donkey anti-rabbit biotinilado (1:600, Jackson Inmunoresearch)
Rabbit anti-5HT (1:5000, Immunostar)	Donkey anti-rabbit biotinilado (1:600, Jackson Inmunoresearch)

Tabla 3 | Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en los ensayos de IHQ, con sus respectivos huéspedes, concentraciones y compañía.

Anticuerpos utilizados para IF	
Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario
Goat anti-MCHR-1 policlonal (1:500, Santa Cruz Biotechnology) (1:250)	488-Alexa Fluor Donkey anti-goat (1:1000) (1:250), (1:500 y 1:1000)
Goat anti-MCHR-1 policlonal (1:1000, Santa Cruz Biotechnology)	Donkey anti-goat biotinilado (1:600, Jackson ImmunoResearch) y Streptavidina conjugada con *555 (1:2000, Molecular Probs)
Mouse anti-NeuN (1:200, 1:500, Millipore)	488-Alexa Fluor Donkey anti-mouse (1:1000) (1:1500)
Mouse anti-tubulina acetilada (1:500, 1:1000 Sigma Aldrich)	488-Alexa Fluor Donkey anti-rabbit (1:1000), Donkey anti-mouse biotinilado (1:600, Jackson ImmunoResearch), Streptavidina conjugada con *555 (1:1500, Molecular Probs)
Goat anti-ARL13B (1:500, 1:2000, Santa Cruz)	Donkey anti- goat biotinilado (1:600, Jackson ImmunoResearch), Streptavidina conjugada con *555 (1:2000, Molecular Probs)
Rabbit anti-ACIII (1:500, 1:1000, Santa Cruz)	Donkey anti-rabbit biotinilado (1:600, Jackson ImmunoResearch), Streptavidina conjugada con *555 (1:2000, Molecular Probs), Streptavidina conjugada con FITC (1:300), Streptavidina conjugada con *488 (1:2000, Invitrogen)
Rabbit anti-5-HT (1:1000; Immunostar) (1:500)	488-Alexa Fluor Donkey anti-rabbit (1:1000)
Goat anti-5-HT (1:500, 1:250)	488-Alexa Fluor Donkey anti-goat (1:1000)
Mouse anti-GAD67 (1:500, Millipore)	488-Alexa Fluor Donkey anti-mouse (1:1000)