



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Biológicas
Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas
Área Biología Celular y Molecular

Rol de Cx43 en la proliferación y acoplamiento de tanicitos hipotalámicos



Tesis presentada a la Escuela de Graduados de la Universidad de Concepción como parte de los requisitos para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas, área Biología Celular y Molecular

ANTONIA JESÚS RECABAL BEYER
CONCEPCIÓN-CHILE
2019

Profesor guía: María de los Ángeles García Robles
Depto. de Biología Celular, Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Profesor co-guía: Teresa Caprile Elola-Olaso
Depto. de Biología Celular, Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Esta tesis fue realizada en el Departamento de Biología Celular, perteneciente a la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción.

Profesores integrantes Comisión Evaluadora:

Dra. María de los Ángeles García
Profesor guía de Tesis
Universidad de Concepción

Dra. Teresa Caprile
Profesor Co-guía de tesis
Universidad de Concepción



Dr. J. Leonardo Guzmán
Profesor Evaluador Interno
Universidad de Concepción

Dr. Juan Pablo Henríquez
Profesor Evaluador Interno
Universidad de Concepción

Dr. L. Federico Bátiz
Profesor Evaluador externo
Universidad de los Andes

Dr. Ariel Castro
Director
Programa Doctorado en Ciencias
Biológicas, área Biología Celular y
Molecular
Universidad de Concepción



Tesis de doctorado financiada por:
Proyecto FONDECYT # 1140677 (2015-2017)
Proyecto FONDECYT # 1180871 (2018-2019).
Beca CONYCYT para estudios de doctorado nacional (2015-2019)
Escuela de Graduados de la Universidad de Concepción (2015-2019)

RESUMEN

En la última década se ha descrito la presencia de neurogénesis postnatal en regiones no convencionales como el hipotálamo, región cerebral que, entre otras funciones, integra señales asociadas al comportamiento alimenticio y al balance energético. En el hipotálamo, el rol de precursora neuronal (PN) ha sido atribuido a unas células semejantes morfológicamente a la glía radial embrionaria que recubren la pared del tercer ventrículo (3V), denominadas tanicitos. Los tanicitos son capaces de proliferar en respuesta a una dieta hipercalórica alta en grasa y diferenciarse a neuronas maduras que desempeñan un rol en la moderación del peso corporal. Este postulado sugiere que la neurogénesis hipotalámica funcionaría como un mecanismo adaptativo en respuesta a cambios metabólicos. Al respecto, se generan algunas interrogantes: ¿cuál es el efecto causado por otras dietas hipercalóricas, como una dieta rica en glucosa? ¿cuál es el mecanismo molecular que permite la detección de cambios metabólicos y a su vez, la proliferación de tanicitos?

Existen antecedentes que revelan que hemicanales conformados por conexina 43 (Cx43) forman parte del mecanismo de respuesta de los tanicitos a incrementos en la glucorraquia. El rol de Cx43 ha sido asociado a la proliferación de PNs en otras regiones cerebrales y en distintas etapas del desarrollo, tanto en la modalidad de hemicanales, activando la señalización purinérgica y generando ondas de calcio que sincronizan el ciclo celular, como en la modalidad de uniones comunicantes. La hipótesis de este trabajo pretende dilucidar el rol de Cx43 en la proliferación y comunicación de tanicitos.

A través de la incorporación de bromodesoxiuridina (BrdU) combinada con el uso de inhibidores farmacológicos de Cx43 y receptores purinérgicos, esta tesis demostró que los tanicitos: (i) proliferan en respuesta a un incremento de glucosa en la dieta y (ii) que su división celular, acelerada por factores mitogénicos, es sensible a la inhibición de Cx43. Recíprocamente, el mitógeno FGF2 provoca la apertura de hemicanales-Cx43, gatilla la señalización purinérgica e induce la transición de células tanicíticas a mitosis. Finalmente, recurriendo a técnicas de electrofisiología y ratones-Cx43 *knockout* (célula específica), se corroboró que las uniones comunicantes, conformadas específicamente por Cx43, son responsables de la red de acoplamiento entre tanicitos, entregándose las primeras evidencias de acoplamiento panglial hipotalámico. La falta de Cx43 afecta no solo el acoplamiento y transmisión de iones sino también su capacidad de autorrenovación. Por lo tanto, la red celular acoplada por uniones comunicantes podría regular la función hipotalámica tanto a corto como a largo plazo.

SUMMARY

In the last decade, the presence of postnatal neurogenesis has been described in unconventional regions, including the hypothalamus, a brain region that, among other functions, integrates signals associated with feeding behavior and energy balance. In this region, the role of neuronal precursor (PN) has been attributed to the radial glia-like cells that line the wall of the third ventricle (3V), called tanycytes. Tanycytes can proliferate in response to a high-fat hypercaloric diet and differentiate into mature neurons that play a role in moderating body weight, suggesting that hypothalamic neurogenesis functions as an adaptive mechanism in response to metabolic changes. In this regard, some questions are generated: What is the effect caused by other hypercaloric diets, such as a high glucose diet? What is the molecular mechanism that allows the detection of metabolic changes and proliferation of tanycytes?

Previously, it has been shown that the glucosensing mechanism of tanycytes involves hemichannels formed by connexin 43 (Cx43), which has a role in the proliferation of NPs in other brain areas and different developmental stages, both, in the hemichannel modality, activating purinergic signaling and generating calcium waves that synchronize the cell cycle through gap junctions. The hypothesis of this work aims to elucidate the role of Cx43 in the proliferation and communication of tanycytes.

The present work used bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation combined with pharmacological inhibitors of Cx43 and purinergic receptors to show that tanycytes: (i) proliferated in response to an increase in dietary glucose and (ii) that

their cell division, accelerated by mitogenic factors, was sensitive to Cx43 inhibition. Reciprocally, the mitogen, fibroblast growth factor 2 (FGF2) caused the opening of hemichannels-Cx43, triggered purinergic signaling and induced the transition of tanycytes to mitosis. Finally, using electrophysiology and cell specific Cx43 knockout mice, it was confirmed that Cx43 was specifically responsible for the tanycyte coupled network, giving the first evidence of hypothalamic panglial coupling. The absence of Cx43 affected not only the coupling and transmission of ions but also their self-renewal capacity. Therefore, the gap junctions-coupled network could regulate hypothalamic function in both the short and long term.



TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN	IV
SUMMARY	VI
TABLA DE CONTENIDOS	VIII
ABREVIATURAS.....	XIII
I. INTRODUCCIÓN	1
1. Neurogénesis en el cerebro adulto	1
2. Hipotálamo adulto como nicho neurogénico	4
3. Tanicitos como PNs hipotalámicos	8
4. Neurogénesis hipotalámica como mecanismo adaptativo	10
5. Cambios metabólicos modulan la neurogénesis hipotalámica	13
6. Uniones comunicantes-Cx43 sincronizan la proliferación de PNs	16
7. Señalización purinérgica estimula la proliferación de PNs.....	18
7.1. Apertura de Hemicanales	18
7.2. Liberación de nucleótidos e interacción con los receptores purinérgicos	20
8. Señalización purinérgica en tanicitos	22
9. Planteamiento general del problema.....	25
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	27
Hipótesis	27
Objetivo general.....	27
Objetivos específicos	27
III. MATERIALES Y MÉTODOS	28
1. Declaración de ética para trabajo con animales.....	28
2. Cultivo primario de tanicitos	28
3. RT-PCR y RT-PCR en tiempo real.....	30
3.1 Extracción de ARN total.....	30
3.2 Transcripción reversa (RT) del ARN total	30
3.3 Amplificación del ADNc por PCR	31
3.4 Electroforesis en geles de agarosa.....	32
3.5 RT-PCR en tiempo real.....	32
4. Análisis de secuenciación de ARN de tanicitos en cultivo	34

5. Captación de etidio y detección de fluorescencia <i>in vivo</i>	34
6. Medición de la concentración extracelular de ATP	35
7. Inmunocitoquímica	36
8. Ensayos de inmunodetección de proteínas	37
9. Incorporación de BrdU en cultivo celular.....	38
10. Electrofisiología.....	39
10.1 Preparación de rebanadas:.....	39
10.2 <i>Patch clamp</i> de célula completa e incorporación de biocitina.....	40
11. Administración de BrdU	41
11.1 En ratones	41
11.2 En ratas sometidas a una dieta rica en sacarosa	42
12. Determinación de la glicemia	43
13. Preparación de las bombas osmóticas	43
14. Implantación de cánula por estereotaxia.....	44
15. Anticuerpos y ensayos inmunohistoquímicos	45
16. Conteo de células acopladas y BrdU positivas	47
17. Análisis estadístico.....	48
IV. RESULTADOS.....	49
1. HSD no altera parámetros metabólicos a los 8 días de exposición.....	49
2. HSD produce un alza de glicemia a corto plazo.....	52
3. HSD estimula la proliferación de tanicitos β 2	54
4. Cambios en la ingesta alimentaria tras infusión icv de FGF2 y Gap27	59
5. Gap27 inhibe la proliferación inducida por FGF2 en β -tanicitos <i>in vivo</i>	62
6. Tanicitos <i>in vitro</i> mantienen la expresión de marcadores de indiferenciación, Cx43, receptores purinérgicos, FGFs y su receptor.....	69
7. Cx43 y P2Y1 son necesarios para la proliferación de tanicitos <i>in vitro</i> inducida por FGF2.	75
8. FGF2 provoca un aumento de la captación de etidio sensible a Gap27 en tanicitos <i>in vitro</i>	79
9. FGF2 media la liberación de ATP a través de la apertura de Cx43-HCs en cultivo de tanicitos.....	81
10. ATP extracelular ejerce un efecto mitogénico sobre los tanicitos <i>in vitro</i> . 84	

11.	FGF2 modula positivamente la expresión de Cx43 en tanicitos.....	88
12.	Cx43 es la conexina más abundante en tanicitos de rata	98
13.	Localización de Cx43 y Cx45 en el hipotálamo de rata.....	102
14.	Cx43 es responsable de la red de acoplamiento de tanicitos con células hipotalámicas	108
15.	Los tanicitos establecen una red de acoplamiento panglial con astrocitos y oligodendrocitos	116
16.	La pérdida de red de acoplamiento altera el flujo iónico en α -tanicitos <i>in vivo</i>	120
17.	La pérdida de uniones comunicantes afecta la proliferación hipotalámica	124
V.	DISCUSIÓN	127
	Efecto de la glucosa en la dieta sobre la proliferación de células hipotalámicas	127
	Cx43 en la proliferación de tanicitos	129
	FGF2 modula la apertura de HCs-Cx43 en tanicitos.....	131
	Rol de Cx43 en la red de acoplamiento	137
VI.	AGRADECIMIENTOS	146
VII.	BIBLIOGRAFÍA	148
VIII.	ANEXOS	158

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de los tipos de progenitores y linajes de la ZSV adulta.	2
Figura 2. Representación esquemática del hipotálamo basal.	6
Figura 3. Modelo de detección de glucosa en tanicitos.	24
Figura 4. Análisis de parámetros metabólicos de ratas sometidas a HSD.	51
Figura 5. Cambios en la glicemia a corto plazo inducida por HSD.	53
Figura 6. Proliferación de células hipotalámicas de ratas expuestas a HSD y ND.	58
Figura 7. Parámetros metabólicos tras la administración icv de FGF2 y/o Gap27.	61
Figura 8. Proliferación de células hipotalámicas tras la exposición icv a FGF2, Gap27 y la mezcla de ambos.	64
Figura 9. Análisis cuantitativo de las células hipotalámicas proliferativas tras la infusión icv de FGF2 y/o Gap27.	68
Figura 10. Conservación de Cx43 y marcadores de indiferenciación en tanicitos <i>in vitro</i>	71
Figura 11. Expresión transcripcional de Cx43, los componentes de la vía purinérgica y señalización de FGF2 en cultivo de tanicitos.	74
Figura 12. Proliferación de tanicitos en cultivo tras la exposición a FGF2, Gap27 y MRS2179.	78
Figura 13. Apertura de Hemicanales-Cx43 y liberación de ATP al medio extracelular inducida por FGF2.	83
Figura 14. Proliferación de tanicitos <i>in vitro</i> tras la exposición a concentraciones crecientes de ATP, ATP γ S e inhibidor de P2Y1, MRS2179.	87
Figura 15. Cambios en la expresión de Cx43 total luego de exposición a FGF2.	91
Figura 16. Cambios en la expresión de Cx43 tras las 1, 4 y 7 horas de exposición a FGF2.	93
Figura 17. Desacoplamiento de las uniones comunicantes de tanicitos <i>in vitro</i> tras tratamiento con FGF2.	97
Figura 18. Cx43 está abundantemente expresada en tanicitos de rata.	101
Figura 19. Localización de Cx43 y Cx45 en tanicitos de rata <i>in vivo</i>	104
Figura 20. Ausencia de Cx43 hipotalámica en ratones Cx30, Cx43 dko.	107
Figura 21. α -Tanicitos muestran patrones de corriente de membrana pasivos y están robustamente acoplados entre sí y con células parenquimales a través de Cx43.	111

Figura 22. Análisis cuantitativo de la red de acoplamiento de α -tanicitos por Cx43	112
Figura 23. Los β -Tanicitos están altamente acoplados entre sí y con células parenquimales.....	115
Figura 24. Análisis del acoplamiento panglial mediado por α -tanicitos	119
Figura 25. La pérdida de acoplamiento por uniones comunicantes afecta el patrón de corriente de α -tanicitos.....	123
Figura 26. La pérdida de acoplamiento por uniones comunicantes afecta la proliferación celular hipotalámica	126
Figura 27. Modelo propuesto.....	136
Figura 28. Red de acoplamiento establecida por los tanicitos.	143

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2: Contenido nutricional de la dieta rica en sacarosa (HSD)	158
Tabla 3: Contenido nutricional de la dieta control (ND)	159
Tabla 4. Detalle del número de células BrdU positivas tras ND y HSD.....	160
Tabla 5. Detalle del número de células BrdU positivas tras FGF2 y/o Gap27.....	160

ABREVIATURAS

ADN	:	ácido desoxirribonucleico
ADP	:	adenosina monofosfato
AgRP	:	proteína relacionada agouti
AMP(c)	:	adenosine monofosfato (cíclico)
AraC	:	arabonósido de citosina
ARC	:	núcleo arequeado
ARN	:	ácido ribonucleico
ARNseq	:	secuenciación de ácido ribonucleico
ATP	:	adenosina trifosfato
ATPγS	:	adenosina 5' -o-(3-tio trifosfato)
BDNF	:	factor neurotrófico derivado del cerebro
BLBP	:	proteína de union a lípidos del cerebro
BrdU	:	5-bromo-2-deoxiuridina
Cy	:	cianina
CBX	:	carbenoxolona
Cer	:	cerebro
CNTF	:	factor neurotrófico ciliar
CPS	:	cuentas por segundo
Cre	:	Cre recombinasa
Cx	:	conexina
DCX	:	doblecortina
DHA	:	ácido docosahexaenoico

Dko	:	doble <i>knock out</i>
dNTPs	:	nucleósidos trifosfato
EDTA	:	ácido etilendiaminotetracético
EGFP	:	proteína verde fluorescente potenciada
EM	:	eminencia media
ENTPDasa	:	ectonucleotidasa
Ep	:	epéndimo
ERK1/2	:	quinasa regulada por señal extracelular 1/2
Etd	:	etidio
FGF	:	factor de crecimiento de fibroblastos
FGFR	:	receptor del factor de crecimiento de fibroblastos
GABA	:	ácido gamma-aminobutírico
Gap27	:	péptido mimético de Cx43
GFAP	:	proteína fibrillar acídica glial
GK	:	glucoquinasa
GLAST	:	transportador de glutamato/aspartato
GLUT2	:	transportador de glucose 2
GSTpi	:	glutación S-transferasa pi
G β	:	subunidad beta de la proteína G
HC	:	hemicanal
HCl	:	ácido clorhídrico
HEPES	:	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazineetanosulfónico
HFD	:	dieta rica en grasas (<i>High fat diet</i>)
Hip	:	hipotálamo

HSD	:	dieta rica en sacarosa (<i>High sucrose diet</i>)
IGF	:	factor de crecimiento insulínico
IPC	:	precursor celular intermediario
IP ₃	:	inositol trifosfato
IU	:	unidad internacional
kDa	:	kilo Dalton
ko	:	knock out
La ³⁺	:	lantano
LCR(a)	:	líquido ceforraquídeo artificial
LoxP	:	sitios de recombinación en el sitio lox
MAPK	:	proteína quinasa activada por mitógenos
MCT	:	transportador de monocarboxilato
Me	:	músculo estriado
MRS2179	:	inhibidor de P2Y1
ND	:	dieta normal (<i>Normal diet</i>)
nIPC	:	célula precursora intermediaria de neuronas
NPY	:	neuropéptido Y
oIPC	:	célula precursora intermediaria de oligodendrocitos
Panx	:	panexina
PBS	:	tampón fosfato salino
PFA	:	paraformaldehído
PIP2	:	fosfatidilinositol difosfato
PCR	:	reacción en cadena de la polimerasa
PKC	:	proteína quinasa C

PNs	:	precursoras neuronales
POMC	:	proopiomelanocortina
PSA-NCAM	:	molécula de adhesión celular neuronal con modificación de ácido polisiálico
P2X	:	receptores purinérgicos ionotrópicos
P2Y	:	receptores purinérgicos metabotrópicos
qRT-PCR	:	retrotranscripción y PCR cuantitativa
ROI	:	región de interés
RT-PCR	:	retrotranscripción y PCR
SBF	:	suero bovino fetal
SDS	:	dodecil sulfato sódico
SNC	:	sistema nervioso central
SOX2	:	Región Y determinante del sexo-2
STAT3	:	transductor de señal y activador de la transcripción 3
TAE	:	tampón tris acetato EDTA
Tan	:	taninos
Tas1r2	:	receptor de sabor tipo 1 miembro 2
TBS	:	tampón tris salino
TEMED	:	N, N, N', N'-Tetrametiletilenediamina
Tfam	:	factor de transcripción mitocondrial A
Tm	:	temperatura de denaturación
UA	:	unidades arbitrarias
UDP	:	uridina difosfato
UTP	:	uridina trifosfato

VMN	:	núcleo ventromedial
WGA	:	aglutinina del germen del trigo (<i>wheat germ agglutinin</i>)
ZSG	:	zona subgranular
ZSV	:	zona subventricular
ZV	:	zona ventricular
3V	:	tercer ventrículo



I. INTRODUCCIÓN

1. Neurogénesis en el cerebro adulto

La neurogénesis postnatal puede ser definida como una serie de eventos que conllevan a la producción de nuevas neuronas en el cerebro adulto, comprendiendo desde la división celular de los progenitores neurales (PNs) y su posterior maduración hasta el establecimiento de la neurona generada en la red neuronal (Lledo *et al.* 2006). En murinos, los nichos neurogénicos más estudiados se encuentran en la zona subgranular del hipocampo (ZSG) y la zona subventricular de los ventrículos laterales (ZSV), donde diferentes subpoblaciones celulares coexisten para originar neuronas y células gliales. En ambos nichos, los progenitores primarios que generan estos tipos celulares son de origen glial; clásicamente considerados astrocitos (Kriegstein & Alvarez-Buylla 2009). En la ZSV reside una subpoblación de astrocitos, denominados células B, que actúan como PNs y son mayoritariamente quiescentes (Doetsch *et al.* 1999). Las células B, las cuales tienen una lenta tasa de división, dan origen a las células C (también denominadas precursor intermediario o de rápida amplificación), las cuales, a su vez, pueden generar las células A (neuroblastos inmaduros) que migran por la corriente rostral migratoria hacia el bulbo olfatorio para establecerse en la capa glomerular y convertirse en neuronas maduras (Figura 1).

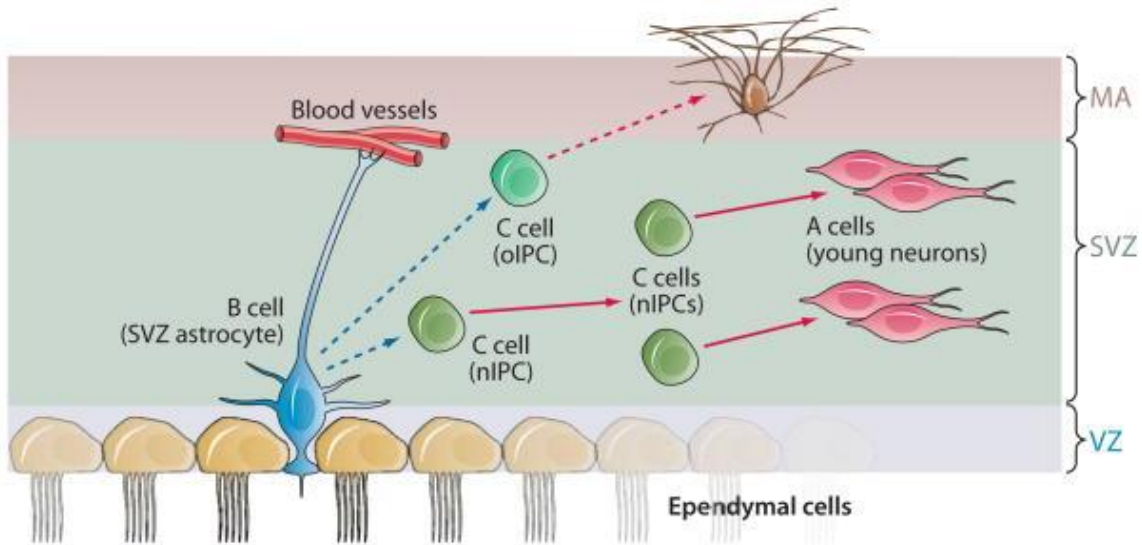


Figura 1. Esquema de los tipos de progenitores y linajes de la ZSV adulta.

Las PNs en la pared de los ventrículos laterales de los roedores adultos corresponden a las células tipo B (astrocitos de la ZSV), las cuales retienen las propiedades epiteliales, incluyendo la extensión de un pequeño proceso apical que termina en el ventrículo y un proceso basal que contacta los vasos sanguíneos. Estos astrocitos dan origen a las células C, que corresponden a los precursores intermedios de amplificación para producir nuevas neuronas (nIPCs) u otros tipos gliales como los oligodendrocitos (oIPC). Finalmente, las células A (neuroblastos) migran por la corriente rostral migratoria y se insertan en la red neuronal. Extraído de (Kriegstein & Alvarez-Buylla 2009). Similar a lo que ocurre en la ZSV, existen astrocitos radiales, llamados también progenitores de tipo I, que residen en la ZSG del hipocampo y actúan como PNs (Altman & Das 1965). Los astrocitos radiales dan origen a neuronas indirectamente a través de precursores intermedios, denominados células tipo D o progenitores de tipo II.

Esta renovación a nivel celular no es estática ni meramente regenerativa, sino que constituye una respuesta adaptativa al entorno animal o estado interno de éste. Concordante con esto, factores como la actividad sensorial y enriquecimiento del olor y la exposición al mismo modulan la neurogénesis en el bulbo olfatorio, mientras que el ejercicio físico, el aislamiento social, el entrenamiento cognitivo, el estrés y la exposición al alcohol, nicotina y antidepresivos modulan la neurogénesis en el hipocampo (Lledo *et al.* 2006).

Los cambios plásticos del cerebro adulto involucran varios niveles de organización, desde moléculas a sistemas; con cambios en elementos neuronales concomitantes a cambios en las glías y vasos sanguíneos. Dentro de las posibles funciones de las nuevas neuronas generadas está integrarse en el circuito pre-existente, cumpliendo su rol sin provocar otros cambios (regeneración) o modificar la red neuronal existente (plasticidad) (Lledo *et al.* 2006).

La mayoría de las técnicas empleadas para descubrir la generación de nuevas neuronas, consisten en la administración *in vivo* de un nucleótido marcado, tales como timidina tritiada o 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU), los que son incorporados al ADN cuando las células se dividen y permiten el seguimiento de las células hijas a través del tiempo. La combinación de esta técnica con el uso de marcadores fenotipo-específicos, permiten la identificación y caracterización de las células hijas. Proteínas, tales como doblecortina (DCX) (Batailler *et al.* 2014) o la molécula de adhesión celular neuronal con modificación de ácido polisiálico (PSA-NCAM) (Bonfanti *et al.* 1992) son ejemplos de marcadores para neuroblastos migrantes.

Una de las limitaciones de este procedimiento, es analizar la neurogénesis en humanos. Análisis *post-mortem* de cerebros humanos, mostraron presencia de neuronas hipocampales nacientes (Boldrini *et al.* 2018), pero limitada neurogénesis en la ZSV después de los 8 meses de edad (Eriksson *et al.* 1998). Sin embargo, células DCX positivas (Batailler *et al.* 2014) y potenciales poblaciones de PNs con capacidades proliferativas (Pellegrino *et al.* 2018) fueron encontradas en rebanadas hipotalámicas de humanos adultos y en otros nichos neurogénicos “no-canónicos” que han sido descubiertos en roedores, tales como el complejo dorsal vagal (Bauer *et al.* 2005) y amígdala (Jhaveri *et al.* 2018), los cuales se localizan especialmente en la cercanía de órganos circunventriculares (Hourai & Miyata 2013).



2. Hipotálamo adulto como nicho neurogénico

Además de la ZSV y ZSG, se demostró la existencia de neurogénesis en el hipotálamo adulto (Cheng 2013; Batailler *et al.* 2014; Xu *et al.* 2005; Kokoeva *et al.* 2005; Perez-Martin *et al.* 2010; Kokoeva *et al.* 2007), estructura cerebral localizada en la base del diencefalo, cercano al tercer ventrículo (3V) y en estrecho contacto con la eminencia media (EM), un órgano circunventricular. El hipotálamo es el mayor centro regulador del balance energético y comportamientos instintivos, como lo es el comportamiento alimenticio. En el hipotálamo, el núcleo arqueado (ARC) está compuesto de agrupaciones neuronales que inician o inhiben la ingesta alimenticia a través de la liberación de péptidos orexigénicos o

anorexigénicos, respectivamente (Schwartz *et al.* 2000). No sólo células neuronales, sino también glías componen la maquinaria celular que permite la detección de nutrientes. Los tanicitos, por ejemplo, son células clasificadas como endimarias especializadas o como glías radiales reminiscentes que recubren las paredes laterales y el piso del 3V, y sus polos apicales contactan el líquido cefalorraquídeo (LCR), mientras que sus prolongaciones basales se proyectan hasta el ARC (Flament-Durand & Brion 1985). Estas células han sido categorizadas dentro de cuatro sub-grupos de acuerdo a diferencias en su localización y expresión génica; los $\alpha 1$, $\alpha 2$ (Robins *et al.* 2013), $\beta 1$ y $\beta 2$ (Rodríguez *et al.* 2005). Los tanicitos $\alpha 1$ se localizan en la zona más dorsal de las paredes del 3V y sus procesos contactan neuronas del núcleo ventromedial. Los tanicitos $\alpha 2$ y $\beta 1$ se localizan más ventralmente en el hipotálamo y contactan las neuronas orexigénicas y anorexigénicas del ARC a través de sus extensos procesos que pueden alcanzar la superficie pial. La subpoblación $\beta 2$ recubre el piso del 3V y presentan uniones ocluyentes que forman la barrera LCR-EM (Figura 2).

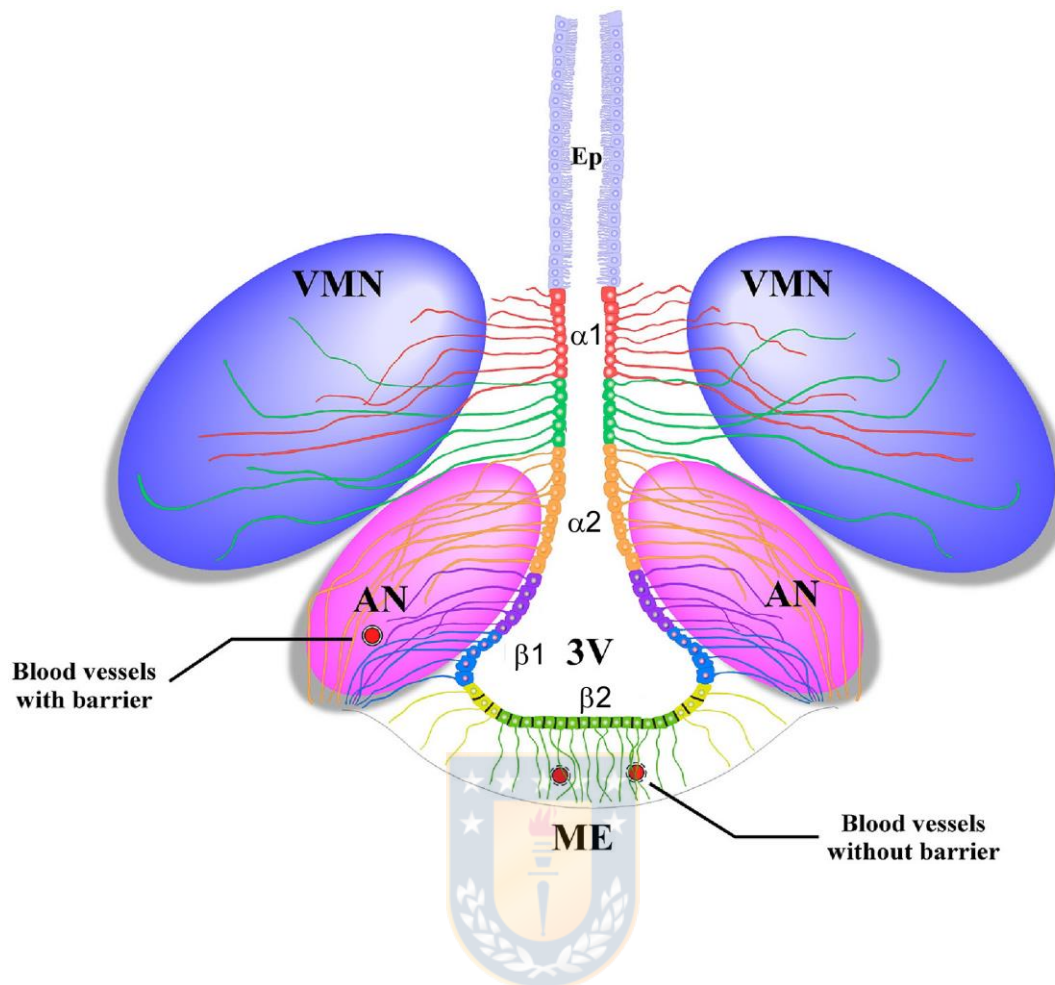


Figura 2. Representación esquemática del hipotálamo basal.

Los endotelios ciliados (Ep) recubren la pared dorsal del 3V. Los tanicitos $\alpha 1$ extienden sus procesos que contactan las neuronas del núcleo dorsomedial (no mostrado), ventromedial (VMN, azul), mientras que los tanicitos $\alpha 2$ y $\beta 1$ lo hacen con neuronas orexigénicas y anorexigénicas y vasos sanguíneos del núcleo arqueado (ARC, rosa). En el piso del 3V, los tanicitos $\beta 2$ están unidos entre sí mediante uniones ocluyentes y sus procesos contactan los capilares fenestrados de la EM, formando parte de la barrera entre la circulación periférica y el LCR. Rediseñado de (Elizondo-Vega *et al.* 2015).

Se ha demostrado que los procesos de los tanicitos $\beta 2$ controlan la secreción de neuropéptidos generados por las neuronas hipotalámicas a la vasculatura portal de la eminencia media, un proceso que puede ser regulado por óxido nítrico y hormonas (Prevot 2002). Además, sus uniones intercelulares de tipo ocluyentes y comunicantes pueden variar dependiendo el estado metabólico del organismo (Langlet *et al.* 2013b). Se ha postulado que los tanicitos actúan como células neuro-moduladoras, ya que regulan la disponibilidad y acceso de hormonas que inducen saciedad como la leptina (Balland *et al.* 2014) y que inducen hambre como la ghrelina (Collden *et al.* 2015) desde el tejido periférico a neuronas del ARC. Recientemente, se ha postulado que los tanicitos liberan FGF21 como una señal neuronal paracrina en respuesta a palmitato periférico, induciendo saciedad y regulando la homeostasis lipídica (Geller *et al.* 2019). Además, poseen la maquinaria molecular que permite la detección de nutrientes como la glucosa; el transportador de glucosa 2 (GLUT2) de alta capacidad (Garcia *et al.* 2003) y la enzima glucoquinasa (GK) (Millan *et al.* 2010). Los tanicitos hipotalámicos responden a glucosa a través de la apertura de hemicanales formados por Cx43, en un proceso que depende de la vía glicolítica y no de la fosforilación oxidativa (Orellana *et al.* 2012). Estas células también poseen los transportadores de monocarboxilatos MCT1-4 (Cortes-Campos *et al.* 2011), que median la liberación de lactato. La inhibición de MCT1 y MCT4 en los tanicitos, altera las respuestas de las neuronas del ARC con consecuencias en la ingesta alimenticia (Elizondo-Vega *et al.* 2016). Por tanto, los tanicitos participan en la generación de respuestas que regulan el comportamiento alimenticio, pero también retienen características de las glías radiales embrionarias, las cuales han

sido identificadas como la mayor fuente de neuronas durante el desarrollo (Gotz & Barde 2005).

3. Tanicitos como PNs hipotalámicos

En 2005, Xu y cols (Xu *et al.* 2005) mostraron por primera vez que la zona del epéndimo del 3V de ratas adultas poseía propiedades neurogénicas. La investigación consistía en inyectar al 3V un adenovirus asociado que portaba un reportero fluorescente e infectar las células ependimarias. Los resultados mostraron que algunas de las células marcadas migraban desde la zona ventricular hasta el parénquima hipotalámico y se transformaban en neuronas maduras que se integraban funcionalmente a la red neuronal pre-existente luego de 4 semanas (Xu *et al.* 2005). Cuando BrdU se administró en adición a factores conocidos por estimular la proliferación, hubo una marcada actividad mitótica en las células circundantes al 3V, incluyendo tanicitos (Xu *et al.* 2005).

Al igual que las células B de la ZSV y los progenitores de tipo I en la ZSG, los tanicitos comparten algunos marcadores típicos de la glía radial (Chen *et al.* 2017), tales como: la proteína ácida fibrilar glial (GFAP, por sus siglas en inglés), nestina (Lee *et al.* 2012), transportador de glutamato-aspartato (GLAST) (Haan *et al.* 2013), proteína cerebral de unión a lípidos (BLBP) (Haan *et al.* 2013) y SRY-box 2 o SOX2 (de sus siglas en inglés Sex determining Region Y-box 2) (Lee *et al.* 2012), el último es necesario para mantener la pluripotencialidad. Los tanicitos también expresan el factor de crecimiento de fibroblastos 10 (FGF10) (Haan *et al.*

2013), Notch1, Notch2, Hes5, Rax, Gpr50, Lhx2, Sox9 y neuronatina (Lee *et al.* 2012), los cuales, en un organismo adulto, se encuentran distribuidos en los nichos con potencial neurogénico (Hajihosseini *et al.* 2008; Lee *et al.* 2012).

La morfología de la glía radial embrionaria se caracteriza por tener una polaridad apical-basal, la cual está relacionada estrechamente a su función; el cuerpo celular está retenido en la zona ventricular y sus procesos mantienen contacto con la superficie pial, sirviendo de guía para la migración parenquimal de los nuevos neuroblastos generados. En este sentido, los tanicitos comparten algunas de las propiedades morfológicas de la glía radial embrionaria; ya que algunos de los tanicitos $\alpha 2$, $\beta 1$ y $\beta 2$ alcanzan la superficie pial del cerebro (Mathew & Singh 1989). Similar a la función de la glía radial embrionaria, algunos investigadores advierten que las nuevas células generadas se mantienen asociadas a los procesos de los tanicitos (Robins *et al.* 2013). Además, los tanicitos retienen la propiedad de PNs de formar neuroesferas (Xu *et al.* 2005; Robins *et al.* 2013), fenómeno que se presenta al aislar y cultivar PNs y sus progenitores de forma separada y flotante y cuya diferenciación a otros tipos celulares puede ser inducida bajo la exposición a condiciones de adhesión celular. Aunque las neuroesferas no están formadas únicamente de progenitores primarios, la mayoría de las células son multipotentes y poseen capacidad de auto-renovarse.

La identidad de los tanicitos responsables de generar nuevas neuronas es aún contradictoria. Estudios de micro-disección de áreas específicas han

demostrado que los α -tanicitos son altamente neurosferogénicos, mientras que los β -tanicitos fallan en la generación de neurosferas (Robins *et al.* 2013). Sin embargo, Lee y cols (Lee & Blackshaw 2012) señalan la existencia de un dominio altamente proliferativo, el que, determinado por su localización, morfología y co-localización de los marcadores nestina, Sox2 y vimentina, corresponde a β 2-tanicitos. Para confirmar el origen de las nuevas células hipotalámicas generadas, se han utilizado experimentos de rastreo de linaje. Esta metodología recurre a ratones genéticamente modificados que expresan una proteína reportera bajo el control de elementos reguladores fenotipo-específico (como Fgf10 en el caso de tanicitos). Ya que el reportero es expresado exclusivamente en tanicitos y su progenie, se permite el seguimiento del destino de estas células a través del tiempo. Estos estudios muestran que en un ratón adulto, los tanicitos proliferan y dan origen a astrocitos parenquimales, neuronas anorexigénicas y orexigénicas que responden a señales periféricas (Recabal *et al.* 2017). De hecho, las nuevas neuronas generadas son positivas para POMC o NPY y su funcionalidad es demostrada a través de la fosforilación de STAT3 luego de inyecciones de leptina (Kokoeva *et al.* 2005; Gouaze *et al.* 2013).

4. Neurogénesis hipotalámica como mecanismo adaptativo

La existencia de neurogénesis en el hipotálamo, el mayor centro regulador de la homeostasis y balance energético, abrió interrogantes sobre la influencia que podría tener ésta en el comportamiento alimenticio o, inversamente, si el estado nutricional tiene un impacto en la generación de nuevas neuronas. Aunque el

factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, por sus siglas en inglés), fue la primera molécula demostrada en promover la génesis de nuevas neuronas hipotalámicas (Pencea *et al.* 2001), la neurogénesis hipotalámica asociada al balance metabólico fue inicialmente confirmada en respuesta al factor neurotrófico ciliar (CNTF) (Kokoeva *et al.* 2005). En la investigación, se observó que la droga Axokina, un análogo de CNTF que fue primeramente desarrollado para el tratamiento contra la obesidad, tenía un efecto que se prolongaba incluso hasta después de cesado el tratamiento. El mismo estudio identificó que los efectos a largo plazo de la administración de CNTF se debían a su capacidad para mantener la división de las precursoras neurales adultas y, por consiguiente, a una remodelación a largo plazo en la estructura cerebral (Kokoeva *et al.* 2005). La metodología consistió en la exposición de ratones a una dieta rica en grasas y simultáneamente, la incorporación de BrdU y CNTF en el LCR. Los ratones tratados con CNTF mostraron una notable reducción en su peso corporal comparado a los ratones controles a los que no les fue administrado este factor. Análisis inmunohistoquímicos de secciones hipotalámicas mostraron que CNTF también aumentó el número de células BrdU positivas tras una administración continua e intracerebroventricular (icv) de 7 días. Algunas de las células BrdU positivas expresaron marcadores de glías, neuroblastos migrantes o neuronas completamente maduras, indicando que las células nacientes pudieron adoptar un fenotipo tanto glial como neuronal. Específicamente, algunas neuronas originadas expresaron el neuropéptido orexigénico NPY y el anorexigénico POMC y fueron capaces de activar la señalización intracelular en respuesta a leptina. A pesar de que este estudio inicial no involucró directamente la proliferación ni diferenciación

de tanicitos, sentó las bases para futuras investigaciones que mostraron la proliferación de tanicitos tras la infusión de otros mitógenos como el factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF2) (Robins *et al.* 2013) y factor de crecimiento de insulina (IGF-I) (Perez-Martin *et al.* 2010). El receptor de ambos mitógenos es expresado en tanicitos (Chaker *et al.* 2016; Kaminskis *et al.* 2019); no obstante, la inhibición de la señalización de IGF en ratones adultos (a través de la delección genética de su receptor) produjo un aumento en la producción neuronal, ya que previno el agotamiento relacionado con la edad selectivamente en α -tanicitos (Chaker *et al.* 2016). Se ha demostrado que el potencial proliferativo de los α -tanicitos bajo condiciones normales disminuye un 48% entre los 4 y 16 meses, mientras que los mutantes mantienen e incluso aumentan hasta un 30% el número de esta población celular (Chaker *et al.* 2016).

No sólo mitógenos sino también nutrientes han sido infundidos en el 3V con el fin de investigar si éstos aumentan la ocurrencia de neurogénesis. Nascimento y cols. (Nascimento *et al.* 2016) administraron ácidos grasos poliinsaturados vía dieta o ácido docosahexaenoico icv. El procedimiento experimental consistió en alimentar a ratones con una dieta rica en grasas o dietas con diferentes porcentajes de sustitución de los ácidos grasos saturados predominantes con aceite de linaza, el que contiene un 45% de omega 3. Para relacionar el efecto de la mejora inducida por omega 3 o ácido docosahexaenoico en los parámetros metabólicos con la neurogénesis hipotalámica, el siguiente paso fue incorporar BrdU y evaluar la expresión de marcadores de neuronas inmaduras. Cuando los ácidos grasos saturados fueron sustituidos, los ratones: (i) redujeron la ganancia

en su peso corporal y los niveles de glucosa circulantes en ayuno (ii) mejoraron la respuesta a leptina, (iii) aumentó el número de células hipotalámicas en división y también de células que expresan DCX, evidenciando la generación de neuroblastos, (iv) aumentó el número de neuronas POMC nacientes, pero no de NPY, sugiriendo que el omega 3 induce neurogénesis predominantemente de fenotipo anorexigénico.

5. Cambios metabólicos modulan la neurogénesis hipotalámica

La tasa de neurogénesis calculada como la proporción de nuevas neuronas generadas sobre el total de células generadas en el hipotálamo de ratones y ratas adultos (1-37%; (Migaud *et al.* 2010)) es baja en comparación a la ZSV y ZSG (70-100%; (Lledo *et al.* 2006)), aunque puede ser elevada por cambios ambientales y/o en el organismo que perturban la homeostasis, tales como altas temperaturas (Matsuzaki *et al.* 2009), ejercicio físico (Niwa *et al.* 2016) o cambios en el comportamiento alimenticio (Kokoeva *et al.* 2005; Lee *et al.* 2012; Gouaze *et al.* 2013; Nascimento *et al.* 2016). Durante la neurogénesis prenatal, la exposición *in utero* a una dieta rica en grasas estimula la producción de neuronas hipotalámicas orexigénicas, lo cual provoca posteriores alteraciones en el comportamiento alimenticio y condiciones fisiológicas que se mantienen hasta la adultez, demostrado por un elevado peso corporal y preferencia calórica en postnatal 70 (P70) (Chang *et al.* 2008).

De manera opuesta, experimentos que utilizan roedores adultos expuestos a una dieta rica en grasas (HFD, *High fat diet*) demostraron lo siguiente:

- (i) La neurogénesis de tipo anorexigénica se vio acelerada, previniendo la ganancia de peso corporal y masa grasa promovida por cambios en la dieta (Gouaze *et al.* 2013), en un periodo de 1-3 semanas en machos. Como ya ha sido mencionado, los ácidos grasos poliinsaturados como el ácido docosahexaenoico (DHA), administrados en la dieta o icv, incrementaron la generación de neuronas POMC positivas, posiblemente a través de la interacción con el receptor de ácidos grasos GPR40 (Nascimento *et al.* 2016).
- (ii) Los ratones hembras, pero no los machos, que consumieron una HFD por 34 días tuvieron un aumento de la proliferación celular atenuado por el estradiol en el ARC (Bless *et al.* 2016).
- (iii) La exposición crónica (mayor a 8 semanas) a una HFD condujo a la pérdida de neuronas hipotalámicas maduras de tipo orexigénicas y anorexigénicas (Moraes *et al.* 2009), así como la pérdida de precursores neuronales hipotalámicos (Li *et al.* 2012). El microambiente inflamatorio activado en pre-obesidad y pre-diabetes perjudicó la supervivencia de los progenitores neuronales hipotalámicos tras la activación del factor I κ B quinasa B/ κ B nuclear (Li *et al.* 2012).
- (iv) La infusión icv simultánea de la droga antineoplásica citosina- β -D-arabinofuranosido (AraC) y el consumo de HFD fue suficiente para causar un aumento exagerado en el peso corporal (Kokoeva *et al.* 2005; Gouaze *et al.*

2013), lo que implica que la neurogénesis hipotalámica puede restablecer el equilibrio energético. En discrepancia, la inhibición de la replicación mediante irradiación sitio dirigida en el hipotálamo ventromedial de ratones hembras disminuyó la neurogénesis hipotalámica, aumentó el gasto de energía y disminuyó su peso corporal, sugiriendo que la diferenciación neuronal debida a una HDF promueve el almacenamiento de energía en la forma de grasa (Lee *et al.* 2012; Lee *et al.* 2014)

- (v) Ratones transgénicos que tuvieron una degeneración progresiva de las neuronas orexigénicas del tipo AgRP debido a la eliminación genética del factor de transcripción mitocondrial A (Tfam) fueron capaces de generar un nuevo subconjunto de neuronas AgRP (Tfam positivas) hecho que explica por qué los ratones mutantes no presentaron un peso corporal reducido como respuesta a la neurodegeneración (Pierce & Xu 2010).
- (vi) Ratones genéticamente modificados para eliminar los tanicitos $\alpha 2$, $\beta 1$ y $\beta 2$, exhibieron un aumento de la distribución de grasa visceral, acompañado de insensibilidad a insulina. La administración de una dieta rica en grasa en estos ratones acelera el incremento de su peso corporal respecto a los ratones controles. Estos resultados clarifican la evidencia de que los tanicitos regulan el metabolismo energético, especialmente su rol en controlar la adiposidad corporal (Yoo *et al.* 2019).

La mayor parte de la evidencia existente sugiere que hay un conjunto de PNs hipotalámicos que responden a las agresiones ambientales al proliferar y convertirse en neuronas con el fenotipo necesario para restablecer el equilibrio

energético. Sin embargo, los datos son contradictorios con respecto a la identificación y localización de las PNs, los cuales pueden deberse a factores endógenos y/o los enfoques técnicos, como la extensión del tratamiento y forma de administración de BrdU (Sousa-Ferreira *et al.* 2014). Asimismo, aún resta por dilucidar los mecanismos subyacentes a la proliferación y sincronización del ciclo celular en los tanicitos.

6. Uniones comunicantes-Cx43 sincronizan la proliferación de PNs

Además de la interacción con factores extracelulares difusibles (tales como FGF2 e IGF) que requieren de la activación de receptores para señalizar, las células pueden interactuar directamente entre ellas a través de uniones comunicantes intercelulares (LoTurco *et al.* 1991). En mamíferos, las proteínas conexas y panexas (Penuela *et al.* 2013) se organizan a modo de hexámeros para formar un hemicanal, también denominado conexón o panexón, respectivamente, el cual se concentra en dominios de la membrana plasmática. Dos conexones, formados por conexas (inexas en invertebrados), pero no por panexas, de células vecinas pueden alinearse y aparearse formando canales intercelulares cuya función es servir de ruta célula-célula para el intercambio de moléculas citosólicas menores a 1 kDa aproximadamente (Axelsen *et al.* 2013). Moléculas como iones inorgánicos (Ca^{2+} , K^+ , Na^+ , etc.), adenosina monofosfato cíclico (AMPc), inositol 3-fosfato (IP_3) y pequeños morfógenos pueden moverse bidireccionalmente a través de estos canales, pero el paso de proteínas y ácidos nucleicos es limitado (Kumar & Gilula 1996). En algunos casos, la fusión completa

de las membranas a través de uniones comunicantes puede asemejarse a un sincicio multinucleado (Dermietzel *et al.* 1990).

Aunque el genoma de mamífero codifica para alrededor de 20 conexinas y 3 panexinas (ambas exhiben patrones de expresión estadio y tejido-específicos (Willecke *et al.* 2002; Panchin *et al.* 2000), sólo ciertas conexinas han sido asociadas al proceso de neurogénesis. Al respecto, se ha sugerido que:

- (i) durante el desarrollo embrionario, Cx26, Cx43 y Cx45 se expresan en la zona ventricular (ZV) de los ventrículos laterales (Bittman & LoTurco 1999; Miragall *et al.* 1997), donde residen los PNs y glías radiales. Cx45 se expresa también en precursores de amplificación de la ZSV adulta para modular su proliferación (Khodosevich *et al.* 2012).
- (ii) los niveles de Cx26 y Cx43 aumentan durante el proceso de neurogénesis embrionaria para luego caer al término de ésta (Bittman *et al.* 1997).
- (iii) en la neurogénesis embrionaria temprana, todos los precursores en fase S-G2 del ciclo celular se encuentran acoplados mediante uniones comunicantes y su desacoplamiento inducido farmacológicamente por octanol disminuye el porcentaje de células de la ZV que entran en fase S (Bittman *et al.* 1997).
- (iv) en estadio adulto, Cx43 promueve la supervivencia de las neuronas nacientes en el hipocampo, mientras que Cx30 restringe su supervivencia (Liebmann *et al.* 2013).
- (v) Otros ejemplos de PNs que se caracterizan por estar robustamente acopladas entre sí y por expresar altos niveles de Cx43 son: las PNs

postnatales tempranas (Freitas *et al.* 2012), las de la ZSV en un cerebro adulto (Lacar *et al.* 2011), neuroferas originadas de la ZSV adulta (Talaveron *et al.* 2015), los astrocitos radiales de la ZSG del giro dentado adulto (Kunze *et al.* 2009) y los precursores neurogénicos proliferativos del canal central (Russo *et al.* 2008).

- (vi) En tanicitos forman un sincicio acoplado, el cual puede ser desacoplado tras el uso de carbenoxelona, un inhibidor inespecífico de uniones comunicantes. Sin embargo, aún no se ha descrito qué conexinas específicas participan en la red de acoplamiento de tanicitos (Szilvasy-Szabo *et al.* 2017). Al respecto este trabajo de tesis realiza un importante aporte.



7. Señalización purinérgica estimula la proliferación de PNs

7.1. Apertura de Hemicanales

Los hemicanales desapareados también pueden formar canales funcionales en dominios de la membrana que no contactan a una célula vecina, conectando el medio intra- con el extracelular y permitiendo el flujo bidireccional de diversas moléculas. Generalmente, los hemicanales se encuentran cerrados bajo condiciones fisiológicas, pero su probabilidad de apertura puede aumentar tras la disminución de la concentración de Ca^{2+} extracelular (Li *et al.* 1996), depolarización de la membrana (Trexler *et al.* 1996), estimulación mecánica (Bao *et al.* 2004), UTP extracelular (Cotrina *et al.* 1998), inhibición metabólica (Vergara *et al.* 2003) e incremento en la concentración Ca^{2+} citosólico (De Vuyst *et al.* 2007), permitiendo la fuga de moléculas como glutamato, Ca^{2+} y ATP al medio e

inversamente, la captación de grandes moléculas extracelulares como yoduro de propidio, bromuro de etidio y Lucifer Yellow (Saez *et al.* 2005; Stewart 1981). Debido a que el paso de estos marcadores ocurre normalmente a través de uniones comunicantes, su captación desde el medio extracelular también puede ser impedida en presencia de bloqueadores generales de uniones comunicantes, como carbenoxelona (CBX), o específicos, como los péptidos miméticos de Cx43, Gap26 y Gap27 (Orellana *et al.* 2012; Arshad *et al.* 2018).

La actividad de hemicanales compuestos específicamente de Cx43 ha sido estudiada bajo estímulos rápidos (minutos) de factores metabólicos, como el incremento en la concentración de glucosa extracelular en tanicitos (Orellana *et al.* 2012) y lentamente (horas) por factores mitogénicos como FGF1 en células Hela y astrocitos espinales (Schalper *et al.* 2008; Garre *et al.* 2010) y FGF2 en células de glioma (De Vuyst *et al.* 2007). La apertura controlada de los hemicanales-Cx43 por estos mitógenos, puede deberse a cambios en el estado de fosforilación/defosforilación de los más de 21 posibles sitios fosforilables de la región C-terminal (Axelsen *et al.* 2013; Pogoda *et al.* 2016), la que interactúa con la región formadora del poro a modo de “bola y cadena”. La activación de los hemicanales conformados de Cx43 inducido por glucosa, FGF1 y FGF2, estimula la liberación de ATP al medio extracelular, gatillando la denominada señalización purinérgica.

7.2. Liberación de nucleótidos e interacción con los receptores purinérgicos

En la glía radial, las ondas de calcio juegan un rol crucial en la regulación y sincronización del ciclo celular (Bittman *et al.* 1997). Éstas ocurren de forma espontánea y requieren la activación de hemicanales conformados de conexinas, activación de la señalización purinérgica y la subsecuente liberación de calcio mediada por inositol trifosfato (IP₃) (Weissman *et al.* 2004). La señalización autoparacrina mediada por nucleótidos extracelulares es compleja, puesto que distintos nucleótidos pueden estimular receptores tanto ionotrópicos (P2X₁₋₇) como metabotrópicos (receptores P2Y_{1,2,4,6,11,12,13,14}), estando estos últimos a su vez, asociados a diferentes vías de señalización (Zimmermann 2006). A pesar de que existen 8 subtipos de receptores P2Y, se ha propuesto que P2Y1 y P2Y2 son necesarios para mantener el estado proliferativo de las PNs (Lin *et al.* 2007). En roedores, ambos receptores son estimulados principalmente por los pares de ligandos ADP; ATP y UTP; ATP, respectivamente (Zimmermann 2006) y su cascada de señalización prosigue activando fosfolipasa C-β, hidrolizando fosfatidilinositol bifosfato (PIP₂) y generando el segundo mensajero inositol trifosfato (IP₃) para finalmente inducir la liberación de Ca²⁺ desde depósitos citoplásmicos sensibles a IP₃ (Burnstock 2007; Rubini *et al.* 2009). El incremento en el calcio intracelular es requerido para redirigir a la célula a la fase S y M del ciclo celular, en vez de salir del ciclo como una neurona post-mitótica (Berridge 1995). Las ondas de calcio, transmitidas intercelularmente a través de uniones comunicantes o a lo largo de la fibra radial (Rash *et al.* 2016), jugarían un rol como “coordinadoras de fase S” de una agrupación de PNs.

Tras cumplir su función, los nucleótidos extracelulares pueden ser inactivados o inter-convertidos por una multiplicidad de enzimas denominadas ectonucleotidasas, de las cuales ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasa 2 (ENTPDasa 2) es característica de los nichos neurogénicos y altamente selectivo para ATP (Masse *et al.* 2007). Es así como el ATP extracelular puede ser degradado a adenosina, la que también puede influir en el desarrollo nervioso vía receptores P1 (A₁, A_{2A}, A_{2B}, A₃) (Zimmermann 2006).

La señalización purinérgica a través de los receptores P2Y1 permite la proliferación de la glía radial durante el desarrollo del sistema nervioso central (SNC) (Weissman *et al.* 2004), promueve la expansión de neurosféricas embrionarias y su expresión decae a medida que las progenitoras se diferencian a neuronas (Lin *et al.* 2007). En un organismo adulto, la infusión de ATP a los ventrículos laterales promueve la proliferación de PNs de la ZSV *in vivo*, mientras que la infusión un agonista selectivo de P2Y1, previene dicho evento (Suyama *et al.* 2012). Concordante con la implicancia de las proteínas Cx43 y P2Y1 en una vía común, las PNs embrionarias crecidas como neurosféricas y obtenidas a partir del cuerpo estriado de ratones deficientes genéticamente de Cx43, presentan además, expresión disminuida de P2Y1 (Scemes *et al.* 2003).

Bajas concentraciones de ATP extracelular (30-100 μ M) también pueden potenciar la proliferación inducida por FGF2 (Neary *et al.* 2008), el cual pertenece a la superfamilia de FGFs. Su unión con el receptor es facilitado por el cofactor heparina y señala a través de los receptores tirosina kinasa FGFR1-4. La activación de FGFR1 es suficiente para gatillar una cascada de señalización

basada en una serie de enzimas quinasas activadas en secuencia (Ras, Raf, MEK, ERK1/2) que transmiten la señal química desde la membrana celular al núcleo. La activación de ERK/MAPK en PNs adultas es necesaria para mantener el estado proliferativo de las mismas (Ma *et al.* 2009; Zheng *et al.* 2004). Receptores P2Y también pueden trans-activar al efector ERK1/2 de forma Raf-independiente a través de la proteína kinasa C (PKC), actuando sinérgicamente con FGF2 para regular la proliferación (Neary *et al.* 1998). En efecto, cultivos de astrocitos co-tratados con ATP y FGF2, exhiben una activación más temprana de ERK1/2 que si fuera solo con FGF2, y más sostenida en el tiempo comparado con sólo ATP (Neary *et al.* 2001).



8. Señalización purinérgica en tanicitos

El rol de los hemicanales y de la señalización purinérgica sobre el potencial gluco-sensor de los tanicitos se ha demostrado en rebanadas hipotalámicas vivas, aplicando altas concentraciones de glucosa sobre los cuerpos celulares de los tanicitos. Este estímulo promueve la liberación de ATP a través de hemicanales e incrementa la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) en tanicitos $\alpha 1$ y 2 (Frayling *et al.* 2011a). El mecanismo específico a través del cual se produce un alza en el $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ha sido estudiado en cultivo primario de tanicitos usando inhibidores farmacológicos y consiste en los siguientes eventos secuenciales; (1) el transporte de glucosa mediado principalmente por transportadores de glucosa (y en menor magnitud por hemicanales), (2) su metabolismo glicolítico y no por fosforilación oxidativa, (3) producción de ATP, (4) cierre de los canales de K^+

sensibles a ATP (K_{ATP}), (5) aumento de la probabilidad de apertura de hemicanales-Cx43, (6) exporte de ATP al entorno extracelular a través de los mismos, (7) activación de los receptores P2Y1, (8) seguido por activación de los receptores sensibles a IP_3 y (9) la liberación de Ca^{2+} desde reservorios intracelulares (Orellana *et al.* 2012) (Figura 3). El mecanismo que genera la apertura de los hemicanales en los tanicitos aún no se conoce, pero se sabe que el cierre del canal K_{ATP} es necesario para la actividad del hemicanal inducida por glucosa. Sin embargo, glibenclamida, un inhibidor de los canales K_{ATP} , no induce la apertura del hemicanal, lo que sugiere que es necesario un mecanismo adicional y aún no identificado para la activación del hemicanal Cx43. En otros tipos celulares se ha demostrado que se requiere de la activación de AKT (Batra *et al.* 2014; Salas *et al.* 2015). La detección de glucosa en cultivos primarios de tanicitos es relativamente consistente con el modelo de detección utilizado por células β -pancreáticas, aunque los tanicitos podrían exhibir otros mecanismos adicionales de detección de glucosa.

Una idea interesante sería asociar la capacidad de los tanicitos de integrar los diferentes tipos de señalización de Ca^{2+} con cambios en la expresión de genes que conlleven a la regulación de su propensión a dividirse y generar nuevas células hipotalámicas (Bolborea & Dale 2013).

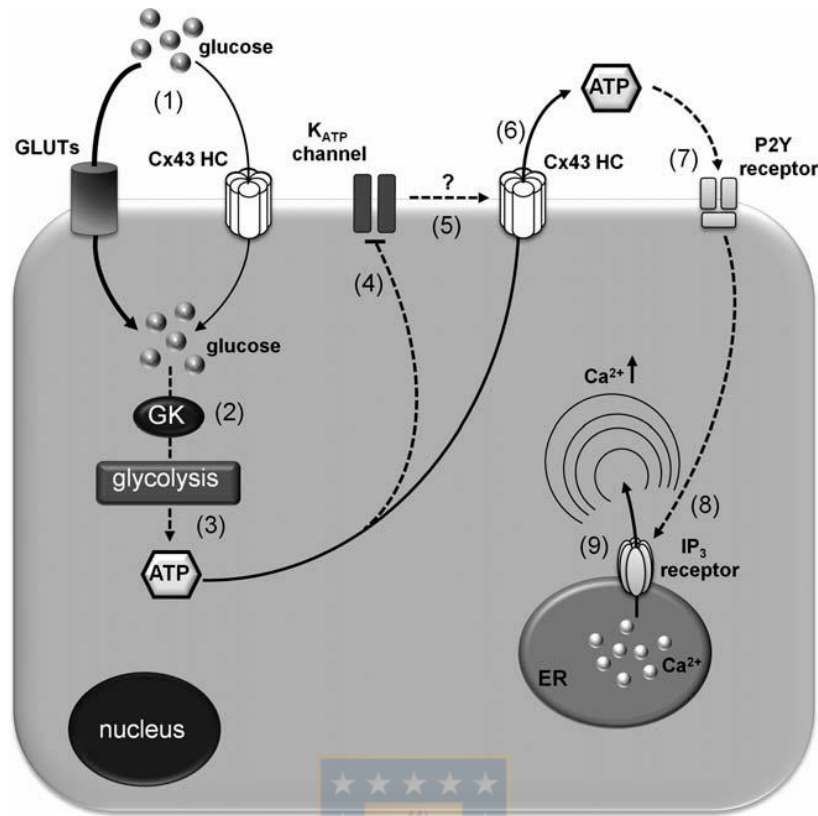


Figura 3. Modelo de detección de glucosa en tanicitos.

Tras un incremento en la concentración de glucosa extracelular, ésta ingresa a la célula principalmente a través de transportadores GLUTs (1), y en menor grado, a través de hemicanales conformados de Cx43. La fosforilación de la glucosa es mediada por la glucocinasa (2), produciendo ATP (3), cuyo incremento cierra los canales de K⁺ sensibles a ATP (4). A través de un mecanismo desconocido, este evento genera la apertura de hemicanales conformados por Cx43 (5), por los cuales es liberado ATP al medio extracelular (6), activando receptores purinérgicos P2Y (7) e induciendo la formación de IP₃ citoplasmático (8). Este evento promueve la liberación de Ca²⁺ almacenado en organelos celulares y gatilla finalmente el incremento en el Ca²⁺ intracelular (9). Extraído de (Orellana *et al.* 2012).

9. Planteamiento general del problema

La restricción calórica y la dieta rica en grasas han sido señalados como los únicos estímulos metabólicos que, hasta el momento, influyen la proliferación de PNs hipotalámicas. Es probable que, ante estímulos hipercalóricos, los tanicitos señalicen a través de múltiples mecanismos moleculares que pueden ser redundantes con aquellos que permiten la detección de metabolitos. En línea con esto, estudios *in vitro* han determinado que los tanicitos responden al incremento en la concentración de glucosa extracelular generando ondas de calcio que son originadas a partir de la activación de la señalización purinérgica; la liberación controlada de ATP al espacio extracelular mediada principalmente por HC-Cx43 y subsecuente activación de receptores P2Y (Bolborea & Dale 2013). Al respecto, es posible formular las siguientes interrogantes: ¿qué efecto tendrá la exposición a otras dietas hipercalóricas como una dieta rica en azúcar sobre la proliferación específicamente de tanicitos? ¿será la señalización purinérgica uno de los mecanismos que, además de ser activada en respuesta a glucosa, participa en la proliferación de este tipo celular?

Cabe recordar que se ha determinado que FGF2 puede inducir tanto la apertura de hemicanales-Cx43 y la salida de ATP en células de glioma (De Vuyst *et al.* 2007), como actuar sinérgicamente con el ATP extracelular para potenciar la proliferación de astrocitos en cultivo (Neary *et al.* 2008). Los tanicitos expresan el receptor FGFR1 (Choubey *et al.* 2017; Kaminskas *et al.* ; Kano *et al.* 2019) y responden a su ligando FGF2 caracterizado mediante la formación de neurosféricas (Xu *et al.* 2005) o a través de explantes hipotalámicos cultivados en presencia de

este factor (Robins *et al.* 2013). Puesto que los tanicitos presentan la maquinaria molecular responsable de la señalización por FGF2 ¿Puede este factor promover la apertura de HCs-Cx43 y liberación de ATP al medio extracelular?

Finalmente, además de las señales difusibles como FGF2, los tanicitos están comunicados intercelularmente a través de uniones comunicantes (Szilvasy-Szabo *et al.* 2017). Sin embargo, se desconocen qué conexinas y tipos celulares están conformando la red de acoplamiento. Ya que los tanicitos expresan Cx43 asociada funcionalmente a hemicanales que cambian su estado de apertura en respuesta a glucosa, ¿estarán los tanicitos comunicados intercelularmente a través de conexinas?



II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

La proliferación de tanicitos hipotalámicos está regulada por la concentración de glucosa y además, por la apertura de hemicanales Cx43 mediada por FGF2 y la subsecuente señalización purinérgica.

Objetivo general

Estudiar la función de Cx43 y de la señalización purinérgica mediada por FGF2 en el acoplamiento y proliferación de tanicitos hipotalámicos.



Objetivos específicos

1. Comprobar *in vivo* si la proliferación de los tanicitos se afecta por la concentración de glucosa.
2. Comprobar *in vitro* e *in vivo* si el mecanismo sensor de glucosa mediado por hemicanales-Cx43 es potenciado por FGF2.
3. Determinar el rol de las conexinas sobre las uniones comunicantes establecidas por tanicitos *ex vivo*.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Declaración de ética para trabajo con animales

Todos los estudios que se llevaron a cabo utilizando ratas, fueron aprobados y revisados por el Comité de Ética Animal de la Comisión Nacional de Chile para estudios Científicos y Tecnológicos (CONICYT, Fondecyt N°1180871), por el comité de ética de la Facultad de Ciencias Biológicas y por el comité de Ética, Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Concepción, Chile. Los animales fueron tratados de acuerdo con las directrices del Instituto Nacional de Salud para el cuidado y uso de los animales, USA. Ratas adultas (120-280 g) se alojaron con un ciclo de 12 horas luz/oscuridad con comida y agua *ad libitum*. Ratones C57BL6/J adultos (Charles River, Wilmigton, USA), Cx30^{-/-} (Cx30ko); Cx30^{-/-}, Cx43^{fl/fl}:hGFAP-Cre⁺ (Cx30, Cx43 dko) (Zhang J, Dublin P, 2013) y ratones con expresión de la proteína verde fluorescente potenciada bajo el promotor de la proteína ácida fibrilar glial humana (hGFAP-EGFP; Nolte C, 2001) de ambos sexos fueron investigados en P38-119 sino indicado de otra manera. Los ratones se mantuvieron bajo condiciones estándar (ciclo de 12 h luz/oscuridad, agua y comida *ad libitum*).

2. Cultivo primario de tanicitos

Los cultivos primarios de tanicitos de rata se llevaron a cabo de acuerdo con el método descrito anteriormente (Orellana, 2012, Garcia et al., 2003). Ratas posts natales 1 (P1) fueron rápidamente decapitadas, el cerebro fue removido y la

región cercana al 3V fue diseccionada en frío. Las muestras fueron incubadas con tripsina 0.25% - EDTA 0.2% (p/v) por 20 minutos a 37°C, antes de ser transferidas a medio de cultivo MEM (Invitrogen), suplementado con 10% suero bovino fetal (SBF), L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/mL y streptomocina 100 mg/mL (Thermo Fisher Scientific). Las muestras fueron disgregadas y las células fueron sembradas en frascos de cultivo T25 cubiertas con poli-L-lisina 0.2 mg/mL (Sigma-Aldrich) a una densidad de 3 millones de células por frasco. Las células se mantuvieron en el mismo frasco por dos semanas y el medio se renovó cada dos días.

Para subsecuentes experimentos, los tanicitos crecidos en monocapa fueron lavados dos veces con tampón fosfato (PBS) 0,1 M a pH 7.4 y tratados con tripsina 0,25%-EDTA 0,2% (p/v) por 3 minutos a 37°C. Las células fueron disgregadas y resembradas en placas de 6, 12 y 24 pocillos, previamente cubiertos con poli-L-lisina 0.01 % (v/v), a una densidad celular de 500.000, 250.000 y 800 células por pocillo, respectivamente. Sólo se trabajó con células en pasaje uno. Antes de todos los experimentos, los tanicitos fueron cultivados por 24 horas en medio sin SBF para prevenir la inhibición de la liberación de ATP y la activación de la señalización purinérgica (Lin *et al.* 2007).

3. RT-PCR y RT-PCR en tiempo real

3.1 Extracción de ARN total

Se obtuvo ARN total de cultivos primarios de tanicitos, hipotálamo, cerebro total y músculo estriado. El ARN se extrajo de acuerdo con el método de tiocianato de guanidina fenol/cloroformo, homogenizando las muestras en 500 μ L de Trizol® e incubándolas 5 minutos a temperatura ambiente. Luego, las muestras fueron tratadas con 200 μ L de cloroformo, agitadas vigorosamente por 15 segundos e incubadas a temperatura ambiente por 3 minutos. Las muestras fueron centrifugadas a 12.000 g por 15 minutos a 4°C para separar las fases. Se recuperó la fase acuosa, se agregó 300 μ L de isopropanol a cada muestra, se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12.000 g por 5 minutos a 4°C. El sobrenadante fue desechado y el pellet se lavó dos veces con etanol 70%, centrifugando a 12.000 g por 10 minutos cada vez. Finalmente, el pellet se resuspendió en 10 μ L de agua libre de ARNasa y se cuantificó midiendo su absorbancia a 260 nm y su pureza de acuerdo con la relación 260/280.

3.2 Transcripción reversa (RT) del ARN total

La síntesis de ADN se realizó utilizando la enzima transcriptasa reversa RevertAid® H Minus M-MuLV (ThermoScientific). Previo a la síntesis, 2 μ g de las muestras de ARN total fueron tratadas con ADNasa (ThermoScientific). Para un volumen final de 20 μ L, se incubó la mezcla anterior con 0,5 μ g de oligo-dT, denaturó a 70°C por 5 minutos y se llevó a hielo por 2 minutos. Posteriormente, se

agregó el tampón de transcripción (Tris-HCl 50 mM pH 8,3, KCl 50 mM, MgCl₂ 4 mM, DTT 10 mM), la mezcla de dNTPs (1 mM de cada uno) y 20 U del inhibidor de ARNsa o Ribolock (ThermoScientific), incubando por 5 min a 37°C. Se agregó 200 U de la enzima transcriptasa reversa RevertAid® H Minus M-MuLV y se incubó por 1 h a 42°C y finalmente a 70°C por 10 min. Los controles negativos para la amplificación de las muestras fueron tratados con el mismo protocolo de transcripción, pero sin añadir a la mezcla oligo-dT ni enzima transcriptasa reversa.


3.3 Amplificación del ADNc por PCR

La amplificación de ADNc se llevó a cabo en un termociclador Mastercycler (Eppendorf) en una mezcla que contuvo Tris-HCl 10 mM (pH 8,8), KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, mezcla de dNTPs (0,2 mM de cada uno) set de partidores específicos (0,2 µM de cada uno) (Tabla 1), Taq ADN polimerasa 0,31 U (ThermoScientific) y 1 µL del producto de transcripción reversa, en un volumen final de 11,5 µL. El programa de incubación consistió 95°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 95°C por 30 s, 55°C por 30 s y 72°C por 30-40 s, y una extensión final de 72°C por 7 min. La síntesis de todos los ADNc fue testada utilizando partidores específicos para β-actina. Los partidores utilizados para amplificar los distintos genes fueron diseñados utilizando el programa AmplifX (versión 1.5.4 por Nicolás Jullien), teniendo en cuenta su T_m, el porcentaje de GC, la formación de dímeros y estructuras secundarias.

3.4 Electroforesis en geles de agarosa

La separación de fragmentos de ADN obtenidos fue realizada mediante geles de agarosa al 1%. El tampón empleado para la electroforesis fue TAE (Tris-Ácido Acético EDTA; Tris-HCl 40 mM, ácido acético 30 mM y EDTA 1 mM; pH 7,6). Los geles de agarosa se prepararon con TAE conteniendo bromuro de etidio 0,5 µg/mL (APEX). El marcador de peso molecular utilizado fue de 100 pb DNA ladder (GeneRuler, Thermo Scientific). Para visualizar las diferentes bandas de ADN en el gel de agarosa, el gel fue ubicado en un equipo transiluminador y fotodocumentador (VilberLourmat PMM9A, Francia).

3.5 RT-PCR en tiempo real



La reacción de RT-PCR en tiempo real fue preparada con el kit Brilliant II SYBR Green qPCR *Master Mix* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) en un volumen final de 20 µL, conteniendo 2 µL de ADNc y 500 nM de cada set de partidores (Tabla 1). Cada mezcla de reacción fue incubada a 95°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos y una extensión final de 72°C por 7 minutos. La expresión relativa de los genes Cx26, Cx30, Cx43, Cx45, Panx1 y Panx2 fue calculada a partir del método de ΔCT , usando ciclofilina como el gen control.

Tabla 1. Set de partidores usados para RT-PCR convencional y cuantitativo y producto final de amplificación.

Nombre	Sentido (5'-3')	Antisentido (5'-3')	Producto (pb)
P2Y1	ATT TGA GGG CAC GGC TGG ATT T	TGT GTC TCC GTT CTG CTT GAA CTC	266
P2Y2	CTC TGT CAT GCT GGG TCT GCT TTT	GCA ACT GAG GTC AAG TGA TCG GAA	235
P2Y4	TTG ATC ACC CTG GTC TGC TAT GGA	CAC ATG ACA GTC AGC TTG CAA CAG	201
FGF1	CCT GAC CGA GAG GTT CAA TCT G	TCA TTT GGT GTC TGC GAG CC	255
FGF2	GCA GAA GAG AGA GGA GTT GTG TCC	TGC CCA GTT CGT TTC AGT GC	200
FGFR1	CCT CTA CGC TTG TGT GAC CAA CAG	TGC TCC CAT ACT CGT TCT CCA C	425
Cx26	TTG CTC AGG GAA GTC CAA AAG ACC	TGG GCC TTT GTT TGG GAG CTT T	231
Cx30	GTG AAC AAG CAC TCG ACC AGC ATA	GCG GAT AAA CTT TCG GGC AGT TTC	288
Cx43	TGG GTA CAA GCT GGT TAC TGG TGA	TGG CTA ATG GCT GGA GTT CAT GTC	221
Cx45	AAA GAG CAG AGC CAA CCA	CCA AAC CCT AAG TGA AGC	311
Panx1	TTC TTC CCC TAC ATC CTG CT	GGT CCA TCT CTC AGG TCC AA	185
Panx2	TGG ACA TCG TAT TGC TCT GC	CCA CGT TGT CGT ACA TGA GG	258
Clcf1	AAA AGG TAC AGT GGG CAC CAA GAG	AAC TGA GTG GTT ACT GGC AAG TGG	116
Fgf18	CAG TGG GAA GCA CAT TCA AGT CCT	TCT CTT TGC CCT TGA TCC GGA CTT	128
Npas4	TCC ATG AAC CCT TCC AGA CTC ACT	AAG GTT GCA CTG CTT GGT GTC A	112
Rcor2	AGC ATG AAG CAG ACC AAC AGC A	TCC AGC GGG AGT TGA ACT TGG TAT	100
PPIB	ATA ATG GCA CTG GTG GCA AGT C	ATT CCT GGA CCC AAA ACG CTC C	239

4. Análisis de secuenciación de ARN de tanicitos en cultivo

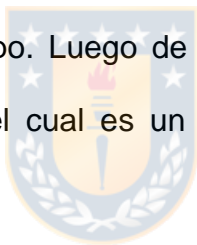
La secuenciación de ARN se realizó tecnología *Illumina* basada en lecturas cortas de 50 pares de bases, en una sola dirección. Se obtuvo un total de 90 millones de lecturas en el experimento. El ARN total fue extraído de cultivos primarios de tanicitos expuestos a baja (2 mM) y alta (15 mM) glucosa y se prepararon librerías de secuenciación *TruSeq* (plataforma *Illumina*). Las secuencias fueron cortadas en los extremos para remover los adaptadores y bases con baja calidad. Luego fueron alineadas al genoma de referencia *hg19* (Ensembl genome version 6.0.81, ensembl.org) usando el alineador "*splice-aware*" *TopHat* v2.0.9 (Trapnell C, Roberts A, Goff L, Pertea G, Kim D, Kelley DR, et al. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with *TopHat* and *Cufflinks*. *Nat Protoc*). La expresión génica fue cuantificada usando el script (en python) *HTseq-count* (Anders S, Pyl PT, Huber W. *HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data*. *Bioinformatics*).

5. Captación de etidio y detección de fluorescencia *in vivo*

Los tanicitos fueron transferidos a cubreobjetos cubiertos con poli-L-lisina, cultivados a una confluencia al menos de 80% en placas de 6 pocillos y tratados por 7 horas a 37°C con una concentración final de FGF2 20 ng/mL (Sigma Aldrich) conjugado con heparina 10 IU/mL para mantener una razón de 5 IU de heparina por cada 10 ng de FGF2, como fue descrito por Shalper, 2008 (Schalper *et al.* 2008). Gap27, un inhibidor específico de Cx43, fue adicionado en una

concentración final de 200 μM al mismo instante que FGF2. Todos los compuestos fueron adicionados en medio de cultivo MEM suplementado con L-glutamina, penicilina y estreptomina, pero sin SBF. Para la detección de fluorescencia, las células fueron lavadas dos veces con PBS 0,1M, pH 7,4, antes de aplicar la solución de registro (NaCl 154 mM, KCl 5,4 mM, CaCl_2 2,3 mM, y HEPES 5 mM, pH 7,4), conteniendo bromuro de etidio (Etd) 5 μM . Las células sobre los cubreobjetos se montaron en un microscopio de célula viva (Nikon, modelo Eclipse Ti-FL) y fueron registradas cada 30 segundos con un objetivo 40x.

Se definieron al menos 10 núcleos celulares por cubreobjetos como regiones de interés y se midió el promedio del cambio en su intensidad de fluorescencia a lo largo del tiempo. Luego de 30 minutos aproximadamente, se agregó lantano (La^{3+}) 200 μM , el cual es un inhibidor general de hemicanales como control de vitalidad celular.



6. Medición de la concentración extracelular de ATP

Los tanicitos fueron sembrados en placas de 12 pocillos, cubiertos previamente con poli-L-lisina y cultivados sin SBF por 24 horas a 37°C, antes de ser tratados con una concentración final de FGF2 20 ng/mL, heparina 10 IU/mL y Gap27 200 μM . El volumen final en el medio de cultivo fue 300 μM por cada pocillo. Luego de 7 horas, se midió la concentración de ATP contenido en 100 μM a través del ensayo de bioluminiscencia luciferina/luciferasa (Sigma-Aldrich). La cantidad de ATP en cada muestra fue calculada a partir de una curva estándar,

cuyo intervalo de concentraciones incluye 10, 20, 40, 60, 80 y 100 pM. Los valores CPS (cuentas por segundo) que excedieron los valores de la curva no se consideraron. La concentración de ATP fue normalizada a la concentración de proteína total de su respectiva muestra, utilizando el reactivo Bradford (Amresco) y espectrofotómetro Optizen Pop (Rafer, Chis., México).

7. Inmunocitoquímica

Una vez tratadas, las células fueron lavadas una vez con PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM, pH 7,4) y fijadas con 4% (p/v) de paraformaldehído (PFA) disuelto en PBS, durante media hora a temperatura ambiente. El procedimiento con aglutinina del germen del trigo (WGA) consideró un paso previo a la fijación que consistió en bañar las células 30 segundos con WGA 1 µg/mL disuelto en PBS frío y luego lavar dos veces con la solución salina. El PFA fue extraído y las células fueron sometidas a tres lavados con tampón tris fosfato (84 mM Na₂HPO₄, 35 mM KH₂PO₄, 120 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 7,8) de diez minutos cada uno antes de ser incubadas por toda la noche a temperatura ambiente con los siguientes anticuerpos primarios disueltos en tris fosfato con 0,1% Tritón: oveja anti-BrdU (1:500, Abcam, AB1893), conejo anti-conexina43 (1:200), ratón anti-Cx43 (1:200, Transduction Laboratories) anticuerpo de ratón anti-nestina (1:1500, Abcam), anticuerpo de ratón anti-vimentina (1:400, DAKO), anticuerpo de cabra anti-SOX2 (1:400, Santa Cruz) y conejo anti-WGA (1:1000, Sigma Aldrich). Las células fueron lavadas tres veces con el tampón tris fosfato e incubadas por dos horas con los respectivos anticuerpos secundarios unidos a

fluoróforos y TOPRO (Invitrogen) en una dilución final de 1:200 y 1:1000, respectivamente. Finalmente, los cubreobjetos fueron montados con medio para fluorescencia Fluoromont™ Aqueous Mounting Medium (Sigma Aldrich®). Las muestras fueron analizadas por microscopía confocal (Microscopio Confocal Espectral y Dos Fotones, modelo LSM780 NLO Zeiss).

8. Ensayos de inmunodetección de proteínas

Extractos de proteína total fueron obtenidos de corazón, hígado y cultivo primario de tanicitos. Las muestras fueron homogenizadas en inhibidor de proteasa (ROCHE) y sonicadas tres veces en hielo a 300 W en el caso de los tejidos o resuspendidas en 40 µL de tampón de lisis (0,5% Igepal CA030, 10mM Hepes pH 7,9, 1mM DTT, 100 mM NaCl, 0,5 mM PMSF) en presencia de inhibidor de proteasas y fosfatasas (ROCHE) en el caso de las células en cultivo. Se igualó concentraciones de las proteínas lisadas mediante la técnica de Bradford y se separaron las proteínas a través de electroforesis en gel denaturante de acrilamida (SDS-PAGE) al 12%. Se utilizaron geles de 1,5 mm para la detección de proteínas. Las muestras se incubaron por 5 minutos a 95°C con un buffer de carga para proteínas (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS, 10% glicerol, 0,01% azul de bromofenol) en presencia de 0,1 M de DTT. Las muestras se sembraron junto al estándar pre-teñido (Spectra Multicolor, Broad Range Protein Ladder, Thermo Scientific) en el gel, para posteriormente correrlas a 80V constantes en solución de corrida (25 mM Tris, 250 mM glicina y 0,1% SDS). Se cargaron entre 25-50 µg de proteínas totales para la detección de proteínas específicas, las que

posteriormente fueron transferidas desde el gel a una membrana de Immobilon-P (0.45 μm pore, Merck Millipore, Tullagreen, Carrigtwohill, Irlanda) en solución de transferencia (25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% metanol) durante 2 horas a 250 mA. Para verificar la correcta transferencia, se tiñó la membrana de nitrocelulosa con rojo "Ponceau" (P3504-10G, Sigma Aldrich). Se realizaron múltiples lavados con TBS-Tween (150 mM NaCl, 10mM Tris, 0,05% Tween20), para luego bloquear la membrana con leche descremada al 5% en TBS-Tween durante 1 hora. Se incubó con el anticuerpo primario y posteriormente con el secundario, disueltos ambos en leche descremada al 5% TBS-Tween a 4°C toda la noche y a temperatura ambiente por una hora, respectivamente. Los anticuerpos primarios utilizados fueron: ratón anti-Cx43 (dilución 1:1000, Invitrogen), conejo anti-lámina B1 (dilución 1:1000, Abcam), anti-phospho ERK1/2 Thr202/Tyr204 (dilución 1:2000, Cell Signalling). Los anticuerpos secundarios utilizados fueron anti-ratón y anti-conejo conjugados a peroxidasa (1:1000; Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., PA, USA). Después de cada incubación de anticuerpo se realizaron tres lavados con TBS-Tween por 10 minutos. Finalmente, la membrana se reveló con líquidos quimioluminocentes ("Western Lightening Plus-ECL", Perkin Elmer) y se expuso en el equipo de imagen quimio luminiscente y fluorescencia (PXi, Syngene).

9. Incorporación de BrdU en cultivo celular

Los tanicitos fueron sembrados sobre cubreobjetos de 8 mm (previamente cubiertos con poli-L-lisina) en placas de 24 pocillos. Los cultivos fueron incubados

a 37° por 26 horas con una concentración final de cada compuesto (o la mezcla de ellos): FGF2 20 ng/mL, heparina 10 IU/mL, Gap26 200 µM, ATP 10, 50, 100 y 200 µM (Sigma Aldrich), ATPγS 10 µM (Sigma Aldrich) y/o MRS2179 10 µM (Sigma Aldrich). Tras 20 horas de incubación, se renovó el medio conteniendo los mismos compuestos y se adicionó BrdU en una concentración final de 10 µM por otras 6 horas. Se decidió incubar los tanicitos por 6 horas, puesto que a las 14 horas todas las células incorporaron BrdU (no publicado). Luego de la incubación, las células fueron lavadas dos veces en PBS 0,1 M, pH 7,4 y fijadas por 30 minutos con 4% paraformaldehído para posterior análisis inmunocitoquímico.

10. Electrofisiología

10.1 Preparación de rebanadas:



Ratones de tipo silvestre, $Cx30^{-/-}$ y $Cx30^{-/-}$, $Cx43^{fl/fl}$, $hGFAP-Cre^{+}$ de ambos sexos entre P39-P122 fueron amablemente provistos por el Prof. C. Steinhäuser. Los ratones fueron anestesiados, decapitados, los cerebros fueron removidos y se realizaron secciones coronales utilizando los bordes rostrales y caudales del polígono de Willis como referencia. Las rebanadas de hipotálamo fueron inmersas en líquido cefalorraquídeo artificial (LCRa) frío conteniendo NaH_2PO_4 1,25 mM, $NaCl$ 87 mM, KCl 2,5 mM, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 7 mM, $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ 0,5 mM, glucosa 25 mM, $NaHCO_3$ 25 mM y sacarosa 50 mM (osmolaridad de 336 osm, aproximadamente) equilibrada con 95% de O_2 y 5% de CO_2 a pH 7,4. Las rebanadas de 200 µm de grosor fueron preparadas usando un vibrátomo (Leica

VT 1200 S, Nussloch, GmbH) a una velocidad de 0,12 mm/s. Las rebanadas fueron transferidas a la misma solución equilibrada a 35°C por 30 minutos.

10.2 *Patch clamp* de célula completa e incorporación de biocitina

Las rebanadas hipotalámicas fueron transferidas a LCRA sin sacarosa conteniendo NaH_2PO_4 1,25 mM, NaCl 126 mM, KCl 3 mM, $\text{MgCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2 mM, $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2 mM, glucosa 10 mM y NaHCO_3 26 mM (osmolaridad de 305-315 osm) equilibrado con 95% de O_2 and CO_2 5% a temperatura ambiente y pH 7,4. Los registros de célula completa se obtuvieron usando un amplificador EPC7 D-6100 (List Medical Electronic, Darmstadt, Germany). El equipo utilizado para afinar las pipetas a 2-5 MOhm fue DMZ-Zeitz-Puller (Zeitz-Instruments, Germany), las cuales fueron llenadas con una solución intracelular que contuvo gluconato de potasio 130 mM, MgCl_2 1 mM, $\text{Na}_2\text{-ATP}$ 3 mM, HEPES 20 mM y EGTA 10 mM, pH 7,2. Para la tinción intracelular, se añadió biocitina ($\text{N}\epsilon$ -biotinyl-L-lysine; Sigma) 0,5% y en algunos casos 300 μM Dextran (Texas Red 3000 MW Lysine Fixable, Molecular Probes) a la solución intracelular. El voltaje fue corregido para el potencial de unión líquida, que ocurre cuando dos soluciones con diferentes concentraciones de electrolitos entran en contacto. La compensación de la resistencia se utilizó ocasionalmente y no sobre el 20 %.

Los registros fueron muestreados a 30 kHz, filtrados a 10 kHz y monitoreados con el software TIDA (HEKA). El control visual de los tanicitos se logró con un microscopio (FN-S2N, Nikon, Japan) y objetivo 60X. El potencial de

membrana se mantuvo constante hasta los -65 mV y -55 mV (en el caso de los ratones de tipo salvaje y dKO, respectivamente) durante los 20 minutos de traspaso de la biocitina a los tanicitos. La resistencia de acceso permaneció bajo los 20 MOhm.

11. Administración de BrdU

11.1 En ratones

Ratones de tipo silvestre y Cx30^{-/-}, Cx43^{fl/fl}, hGFAP-Cre⁺ (P39-P50) de ambos sexos fueron inyectados intraperitonealmente con 100 µl de BrdU 50 mg/kg una vez al día durante 6 días (4 días de inyección, dos días de reposo, seguido de dos días de inyección). El BrdU fue disuelto previamente en solución salina estéril (NaCl 0,9% p/v, pH 7,3) y las alícuotas fueron almacenadas a -20°C. Los animales permanecieron por una semana más sin administración de BrdU para analizar el fenotipo de las nuevas células generadas. Tras la segunda semana desde la primera inyección, los ratones fueron anestesiados con una mezcla de ketamina: xilacina (150:15 mg/kg), vascularmente perfundidos con 30 mL de PBS 0,1 M frío (Na₂HPO₄ 17 mM, KH₂PO₄ 83 mM, NaCl 15 mM, pH 7,4) y luego con 30 mL de paraformaldehído al 4% disuelto en PBS. Para ajustar la velocidad de perfusión del PBS y PFA a 300 mL/h, se utilizó una bomba de perfusión (B. Braun Melsungen AG, Germany) y un propulsor de jeringa motorizado (model SP2201Z, WPI, Germany). Los cerebros fueron removidos y fijados en 4% PFA a 4°C por toda la noche. Los hipotálamos fueron disecados y cortados con un vibrátomo (Leica VT 1200 S, Nussloch, GmbH) a una velocidad de 0,16 mm/s y grosor de 40

µm para posterior inmunohistoquímica. Las rebanadas se preservaron hasta dos semanas en PBS 0,1 M, pH 7,4 a 4°C. Para almacenamiento más prolongado, se adicionó azida de sodio 0,01% (p/v).

11.2 En ratas sometidas a una dieta rica en sacarosa

Ratas macho de 120-230 gramos fueron expuestos por una semana a una dieta rica en sacarosa, denominada *58R1 AIN-76A w/ 11% Fat Energy/Sucrose/Blue* y a una dieta control, denominada *58R0 AIN-76A w/ 11% Fat Energy/Corn Starch/Yellow*, ambas obtenidas de *Test Diet*. La dieta rica en sacarosa (Anexo 1), contiene 74,3% de su energía (kcal/g) conformada de carbohidratos, siendo la sacarosa el 61% éstos. La dieta control (Anexo 2) contiene 73,7% de su energía en carbohidratos, pero el porcentaje de sacarosa es reemplazado totalmente por maicena.

Un día después de iniciar el cambio de dieta, se inyectó a cada rata intraperitonealmente con 200 µl de BrdU 50 mg/kg una vez al día, durante 7 días consecutivos (Wojtowicz & Kee 2006). El BrdU fue previamente disuelto en solución salina estéril (NaCl 0.9% p/v, pH 7,3) y las alícuotas se guardaron a -20°C. El peso corporal y la cantidad de comida ingerida fueron monitoreados diariamente. Antes y después del tratamiento, la glicemia fue medida tras 4 horas de ayuno con un dispositivo *Accu-Check*, punzando la punta de la cola. Un día después de la última inyección con BrdU, las ratas fueron anestesiadas con una mezcla de ketamina: xilazina (150:15 mg/kg, respectivamente) preparada en una

jeringa de un mL, mezclando NaCl 0.9%: Ketamine 10%: Xylazine 20% en una proporción 2:2:1, respectivamente. Los animales fueron perfundidos vascularmente con 200 mL de paraformaldehído 4% disuelto en PBS 0,1 M, pH 7,4. Los cerebros fueron removidos y los hipotálamos fueron disecados para posterior inmunohistoquímica.

12. Determinación de la glicemia

Para evaluar cambios en la glicemia por el tratamiento de dietas a largo plazo, se evaluó la concentración de glucosa en sangre tras 4 horas de ayuno (iniciando a las 9 am) antes y después del tratamiento con las ambas dietas. Para evaluar cambios agudos en la concentración de azúcar en la sangre inducida la dieta rica en sacarosa, las ratas fueron ayunadas por 10 horas iniciando a las 9 am, luego se administraron las respectivas dietas y se midió la glicemia a los 30, 60, 90 y 120 minutos después de la realimentación a través de una punción de sangre de la vena de la cola. La glicemia fue determinada con el glucómetro *Accu-Chek Go* (Roche).

13. Preparación de las bombas osmóticas

Las bombas Alzet modelo 1007D, las cuales tienen una capacidad de 100 μ L y una tasa de liberación continua de 0,5 μ g/h por 7 días, fueron llenadas el día previo a la implantación de acuerdo con el manual del fabricante. BrdU, FGF2 y/o Gap27 fueron disueltos en LCRa filtrado (NaH_2PO_4 1,25 mM, NaCl 126 mM, KCl 3

mM, MgCl₂ 7H₂O 2 mM, CaCl₂ 6H₂O 2 mM, NaHCO₃ 26 mM y glucosa 2 mM, pH 7.4) a una concentración final de 1,5 µg/µL, 25 ng/µL y 0,26 µg/µL, respectivamente. El tubo de acero inoxidable fue ajustado a un catéter de vinilo con un diámetro interior de 0,58 mm y un largo de 3 cm y ambos fueron llenados con la misma solución. Las bombas osmóticas fueron equilibradas en solución salina estéril (0,9% p/v) a 37°C por 16 horas antes de ser implantadas. Tras la implantación, los compuestos fueron infundidos a una tasa de 0,75 µg/h (BrdU), 0,0125 µg/h (FGF2) y 0,13 µg/h (Gap27).

14. Implantación de cánula por estereotaxia

Las cánulas fueron implantadas por estereotaxia al 3V de acuerdo con el siguiente protocolo. Las ratas fueron anestesiadas con una inyección intraperitoneal de la mezcla ketamina/xilazina (90 mg/kg-10 mg/kg) y se rasuró el pelaje sobre la cabeza para exponer el área donde se realizó la incisión. Las ratas fueron fijadas al equipo de estereotaxia con adaptadores auditivos que no rompen el tímpano. La piel rasurada se limpió con cicloheximida, se realizó una incisión con un bisturí y se perforó un agujero con un trepanador para implantar una cánula guía (28 gauge stainless steel; Plastics One, Roanoke, VA), de acuerdo a las siguientes coordenadas: -3,14 mm en el eje anterior-posterior del bregma (punto de confluencia de las suturas de los huesos frontal y parietal), 0,0 medial-lateral del seno medio sagital, 9,2 mm dorsal-ventral desde la parte superior del cráneo. La guía de cánula fue conectada previamente al catéter de 2 cm sujeto a la bomba Alzet y asegurada al cráneo utilizando tornillos de montaje de 3/32 mm y acrílico

dental. Una vez seco el acrílico dental, se incorporó la bomba osmótica por la misma incisión con ayuda de pinzas y se afrontó con suturas sintéticas reabsorbibles 5/0 HR15 (Tagum). Las ratas fueron hospedadas individualmente tras la cirugía y, aunque la infusión del contenido de la bomba osmótica fue inmediata, se permitió 3 días de recuperación para el análisis del comportamiento alimenticio y peso corporal.

15. Anticuerpos y ensayos inmunohistoquímicos

Para la detección de biocitina, las rebanadas de 200 μm fueron lavadas tres veces por 10 minutos con PBS 0,1 M y luego bloqueadas con una solución que contiene 10% de suero normal de cabra (SNC, Chemichon) y Triton X-100 2% disuelto en PBS por 2 horas a temperatura ambiente. Las rebanadas fueron incubadas por toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios. Luego, los anticuerpos primarios fueron lavados tres veces por 10 minutos en PBS 0,1 M e incubados por 2 horas a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios. Los anticuerpos primarios y secundarios fueron diluidos en una solución que contuvo 2% de SNC y Triton X-100 0,1% en PBS. Las rebanadas fueron montadas con Aqua Poly-mount (Poly Science, Inc. 18606). Para otros marcajes, las rebanadas hipotálamicas de 40 μm fueron lavadas con tampón Tris fosfato (84 mM Na_2HPO_4 , 35 mM KH_2PO_4 , 120 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 7,8) en vez de PBS. La detección de BrdU se llevó a cabo con un paso adicional que permitió la denaturación de ADN a través de HCl 1 M a 45°C por 30 minutos, antes del bloqueo. El ácido fue neutralizado lavando las rebanadas tres veces por 10

minutos con tampón Tris fosfato. Se utilizó los siguientes anticuerpos primarios y secundarios:

Anticuerpos primarios: estreptavidina conjugado a Alexa 647 (1:600, Molecular Probes, S32357), anticuerpo de conejo anti-GFAP (1:200, DAKO, Z0334), anticuerpo de pollo anti-GFAP (1:500, Synaptic Systems, 173006), anticuerpo de ratón anti-GSTpi (1:200, BD Transduction Laboratories, 610719), anticuerpo de pollo anti-GFP (1:500, Abcam, Ab13970), anticuerpo de oveja anti-BrdU (1:1000, Abcam, AB1893), anticuerpo de conejo anti-conexina 43 (1:500, Sigma, C6219), anticuerpo de conejo anti-conexina43 (1:200), anticuerpo de ratón anti-nestina (1:1500, Abcam), anticuerpo de pollo anti-vimentina (1:400, Millipore), anticuerpo de ratón anti-vimentina (1:400, DAKO) y anticuerpo de cabra anti-SOX2 (1:400, Santa Cruz).

Anticuerpos secundarios: cabra anti-ratón Alexa 488 (Invitrogen, A11029), cabra anti-ratón Alexa 594 (Invitrogen, A11032), cabra anti-conejo Alexa 488 (Invitrogen, A11034), cabra anti-conejo Alexa 594 (Invitrogen, A11037), cabra anti-conejo Alexa 647 (Molecular Probes, A2124), cabra anti-conejo Alexa 647 (Invitrogen, A21244), cabra anti-pollo Alexa 488 (Invitrogen, A11039), cabra anti-pollo Alexa 549 (Life Technologies, A11042), cabra anti-oveja Alexa 488 (Abcam, AB150177), burro anti-cabra Cy3 (Jackson Immuno Research), burro anti-conejo Alexa 488 (Jackson Immuno Research), burro anti-conejo Dylight 549 (Jackson Immuno Research), burro anti-conejo Alexa 647 (Jackson Immuno Research), burro anti-conejo Cy5 (Jackson Immuno Research), burro anti-pollo Cy2 (Jackson Immuno Research), burro anti-pollo Cy5 (Jackson Immuno Research), cabra anti-

oveja Alexa 488 (Jackson Immuno Research), cabra anti-oveja Cy3 (Jackson Immuno Research), burro anti-ratón Alexa 488 (Jackson Immuno Research), burro anti-ratón Cy3 (Jackson Immuno Research), burro anti-ratón Cy5 (Jackson Immuno Research). Todos los anticuerpos secundarios mencionados se utilizaron en una dilución de 1:200 (para Jackson Immuno Research) y 1:500 (para otras marcas).

16. Conteo de células acopladas y BrdU positivas

El número de tanicitos estreptavidina positivos fue cuantificado en un único plano focal seleccionado como el que presentó la señal más extensa a lo largo del 3V (la profundidad de cada plano fue 1 μm). El número de células parenquimales estreptavidina positivas fue cuantificado utilizando la opción de administrador ROI del programa Image J en los múltiples planos focales a través de toda la extensión de la rebanada. Dos investigadores participaron en el recuento tanto de las células acopladas, como de las BrdU positivas para los diferentes genotipos, considerando células aquellas con núcleos Hoechst positivos. El valor final fue calculado como el promedio de ambos recuentos, mientras tuvieran un error de menos del 15%. Para la medición del largo de la red acoplada en la zona ventricular, se utilizó la superposición de todos los planos focales en la modalidad de *maximum intensity projection* del programa ImageJ. Se utilizó al menos 12 rebanadas y 4 animales para cada genotipo/condición.

El recuento de células hipotalámicas y tancíticas en ratas con implante de bombas osmóticas, se llevó a cabo utilizando el software Imaris 9.1.0. Se establecieron los siguientes parámetros: (i) los tancitos y células ependimarias se determinaron en una cercanía de 20 μm del borde ventricular, (ii) el programa determinó el número de núcleos BrdU positivos como aquellos con un diámetro mayor a 7 μm y menor a 12 μm (en imágenes con aumento 20X) y (iii) se consideró el volumen total del tejido, excluyéndose el área ventricular.

17. Análisis estadístico

Todos los valores analizados fueron calculados como el promedio sobre cada animal o cultivo. Se determinó las diferencias significativas usando la prueba t-Student o ANOVA de una vía con test de comparación múltiple de Bonferroni, sino fue indicado de otro modo. La significancia estadística se definió con $p < 0,05$ utilizando el programa Graphpad Prism 5.0.

IV. RESULTADOS

Se ha demostrado que la neurogénesis hipotalámica se establece como un mecanismo de protección temprana en respuesta a un alza o restricción calórica. Si bien la dieta rica en grasas tiene un efecto positivo en la renovación de PNs, éste es transitorio, con un máximo que se produciría a los tres días después de la introducción de la dieta seguido de una reducción gradual con el tiempo (Gouaze *et al.* 2013). La exposición prolongada de esta dieta favorece los procesos inflamatorios que perjudican la proliferación y deterioran la sobrevivencia de PNs. El potencial efecto de otras dietas hipercalóricas, como la dieta rica en sacarosa (HSD), sobre la proliferación específicamente de tanicitos no ha sido dilucidado.



1. HSD no altera parámetros metabólicos a los 8 días de exposición

El siguiente objetivo consistió en evaluar si la exposición a corto plazo a una dieta rica en glucosa, donde el 61% de los carbohidratos totales está conformado de sacarosa, implicaba la activación del potencial proliferativo de los tanicitos como PNs sensibles a cambios en la dieta. Las ratas fueron sometidas a ambas dietas (ND o HSD) durante 8 días consecutivos, iniciándose la administración de BrdU ip al día siguiente del inicio del régimen y manteniéndose diaria por 7 días (Fig. 4A). Para evaluar si los individuos presentaban cambios en la glicemia tras la exposición a la dieta hipercalórica, se midió la glicemia antes y después del tratamiento (Fig. 4A). La glicemia tras 4 horas de ayuno no varió significativamente entre ambos grupos, siendo inicialmente (promedio \pm error estándar) 6.2 ± 0.4 y

6.9 ± 0.5 (mM) para los grupos ND y HSD, respectivamente, y 7.5 ± 0.4 y 7.1 ± 0.4 (mM) para los mismos grupos tras finalizar el tratamiento (Fig. 4B). Asimismo, se midió el peso corporal e ingesta alimenticia cada día y, dado que los animales variaban en su peso inicial, el aumento de peso corporal fue normalizado respecto al día 1 (Fig. 4C) y la ingesta alimenticia normalizada al peso corporal (Fig. 4D). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en el incremento del peso corporal diario (Fig. 4C) ni en la ingesta alimenticia diaria (Fig. 4D) entre ambos grupos.



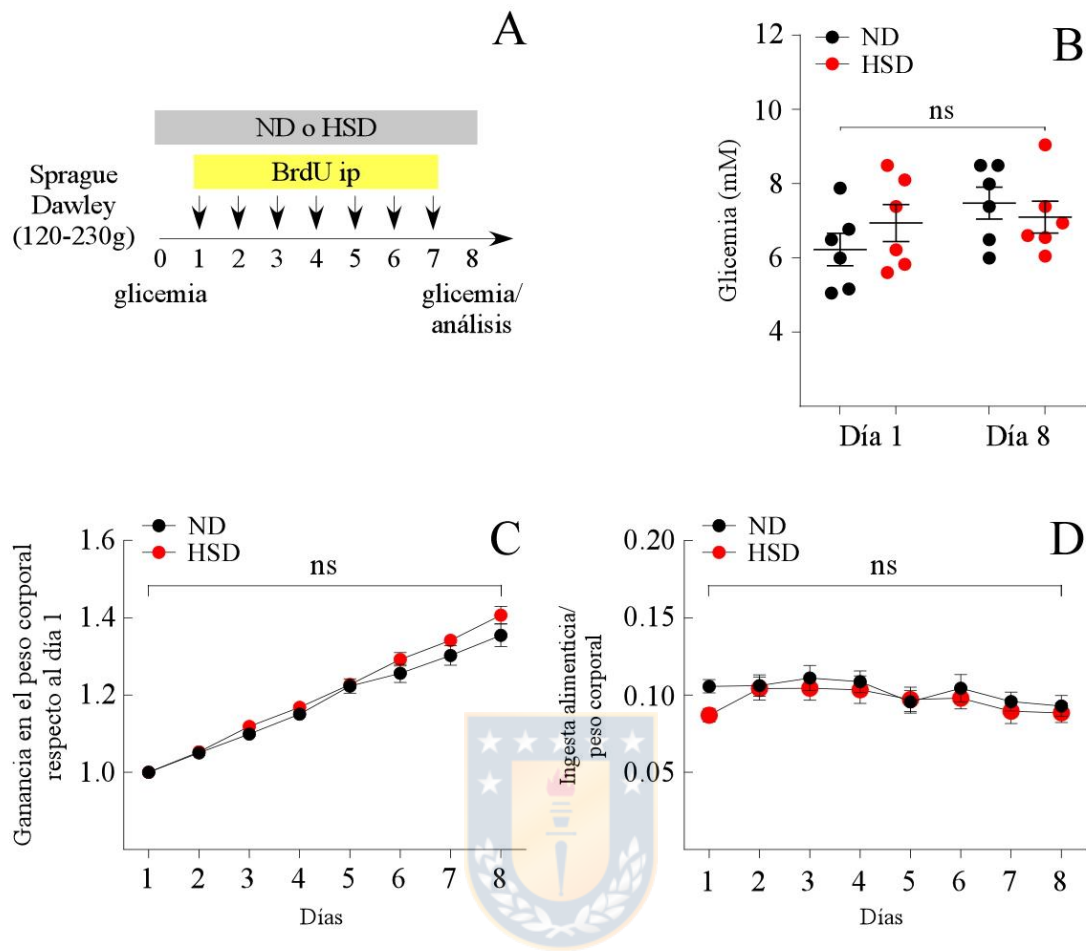
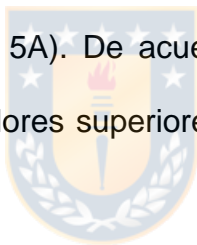


Figura 4. Análisis de parámetros metabólicos de ratas sometidas a HSD.

Las inyecciones ip diarias de BrdU, simultáneas a la exposición de las ratas macho a una dieta rica en sacarosa (HSD) y a una dieta control (ND), se llevaron a cabo como se indica en (A). (B) Valores de glicemia (mM) al inicio y término del experimento, ayunando a las ratas por 4 horas previas a la medición. N=6 animales por condición. (C) Ganancia de peso corporal a lo largo del tiempo respecto al día 1 e (D) ingesta alimenticia a lo largo del tiempo respecto al peso corporal. N= 9 animales por condición. La data es representada como el promedio \pm error estándar de la media; $P < 0.01$; test t-Student

2. HSD produce un alza de glicemia a corto plazo

Subsecuentemente, probamos la efectividad de la dieta rica en glucosa (HSD) en producir un alza en la glicemia a corto plazo comparada con la dieta control (ND), la cual contiene la misma proporción de carbohidratos (alrededor de 74%), pero reemplazando el porcentaje total de sacarosa (61%) por maicena. La digestión de la maicena, al ser un oligosacárido ramificado, implica el desdoblamiento de moléculas complejas y de elevada masa molecular a otras más sencillas, razón por la cual la dieta control es de lenta absorción comparada con la rica en sacarosa. Los animales fueron ayunados por 10 horas y luego se analizó su glicemia antes del acceso a la comida y a los 30, 60, 90 y 120 minutos después de su primera alimentación (Fig. 5A). De acuerdo con lo anterior, los animales sometidos a HSD presentaron valores superiores a los 60, 90 y 120 minutos que los sometidos a la ND (Fig. 5B).



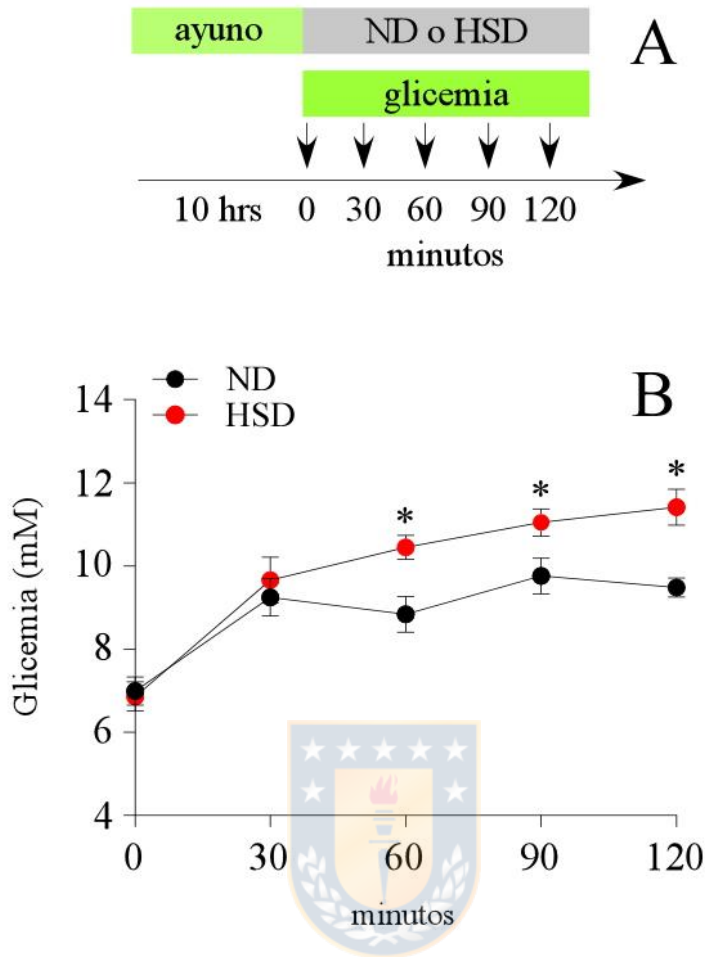


Figura 5. Cambios en la glicemia a corto plazo inducida por HSD.

(A) Tras un ayuno de 10 horas (de 9 am a 19 pm), las ratas macho fueron alimentadas *ad libitum* con las dietas HSD y ND. Su glicemia fue medida antes y 30, 60, 90 y 120 minutos después de la alimentación. (B) Variación en la glicemia (mM) antes y 30, 60, 90 y 120 minutos después de la administración de las dietas HSD y ND. N= 5 animales por condición; la data es representada como el promedio \pm error estándar de la media; $P < 0.01$; test t-Student.

3. HSD estimula la proliferación de tanicitos $\beta 2$

Posteriormente, evaluamos la renovación celular constitutiva en el hipotálamo y exploramos los efectos de la dieta rica en sacarosa sobre ella. Para ello, ratas macho de 120 a 230 gramos fueron inyectadas con 50 mg/kg ip de BrdU durante 7 días (Fig. 4A), al término de los cuales los cerebros fueron colectados y los hipotálamos disecados. Se seleccionaron cortes de la región basal medial (coordenadas Bregma -1.47 a -1.79, correspondientes a la región del NA periventricular). Mediante ensayos de inmunohistoquímica, se procedió a analizar la presencia de BrdU en células vimentina positivas del borde ventricular (Fig. 6A-B'), así como también de la sección hipotalámica lateral y de la EM en los individuos tratados con la dieta control y la dieta rica en sacarosa (Fig. 6A, A' y B, B', respectivamente). También se observaron células BrdU positivas en la pars tuberalis. Es importante notar que la dieta rica en sacarosa no produjo cambios en la ganancia de peso corporal respecto a la dieta control, habiendo aumentado (promedio \pm error estándar) 54.9 ± 1.8 y 47.7 ± 3.5 gramos para ND y HSD, respectivamente al término del tratamiento). Puesto que la EM contiene capilares fenestrados es la región hipotalámica más expuesta a variaciones en la concentración de metabolitos circulantes, los que inclusive pueden incitar cambios estructurales en su estado de vascularización (Langlet *et al.* 2013a), se analizó el estado proliferativo de células residentes en esta zona tras la exposición a HSD. En la región de la EM (Fig. 6C) no se detectaron cambios significativos en el número de células BrdU positivas (promedio \pm error estándar) tras HSD, con 58.7 ± 7.3 células BrdU⁺ (0.8 ± 0.1 células BrdU⁺ por volumen de tejido analizado y

normalizado a la condición control) con respecto a ND, la cual tuvo 60.6 ± 6.3 células BrdU⁺ (1.0 ± 0.2 células BrdU⁺ por μm^3 normalizado a la condición control); Fig. 6C). En la región del parénquima del ARC (Fig. 6D), el nivel de proliferación total en los animales sometidos a HSD no varió significativamente y fue de 42.5 ± 8.0 células (1.0 ± 0.2 células BrdU⁺ por μm^3 , normalizado a la condición control) comparado con ND que fue de 34.3 ± 6.1 células (1.0 ± 0.3 células BrdU⁺ por volumen de tejido analizado y normalizado a la condición control). Posteriormente, se evaluó si los tanicitos en su conjunto, o si las subpoblaciones de éstos eran sensibles a cambios en el contenido de azúcar en la dieta. Para este análisis, se consideró hasta $30 \mu\text{m}$ de profundidad por debajo de la superficie del ventrículo (Fig. 6E-H). Si bien no hubo cambios significativos en el estado proliferativo de la población global de tanicitos, con 6.3 ± 1.1 células BrdU⁺ en ND y 5.8 ± 0.5 células BrdU⁺ en HSD (Fig. 6E), decidimos evaluar en detalle la proliferación celular de las subpoblaciones de tanicitos dividiéndolos en dos grupos. El primer grupo correspondió a los $\alpha 1$ - y $\alpha 2$ -tanicitos que forman la porción dorsal y ventral de la pared del 3V, respectivamente, y el segundo grupo correspondió a los $\beta 2$ -tanicitos que forman el piso del tercer ventrículo. Los $\beta 1$ -tanicitos que forman la pared lateral más basal y parte del piso del tercer ventrículo, poseen una tasa de proliferación mucho más baja que el resto de los tanicitos (data no mostrada), por lo cual su conteo fue excluido de ambos grupos. En el grupo $\alpha 1/\alpha 2$ no se observaron cambios significativos en la incorporación de BrdU en HFD (3.3 ± 0.5 células/ $30 \mu\text{m}$ con respecto a ND (4.8 ± 1.0 ; Fig. 6F). No obstante, los tanicitos $\beta 2$

respondieron al alza de sacarosa en la dieta y el número de células BrdU⁺/μm³ incrementó significativamente de 1.5 ± 0.2 en ND a 2.6 ± 0.4 en HSD (Fig. 6G).

Siendo administrado de forma periférica, el BrdU fue incorporado diferencialmente por las subpoblaciones de tanicitos expuestos a la dieta control, teniendo los β2 una menor tasa de división celular en comparación a los α1/2 (Fig. 6H). No obstante, tras la exposición a la dieta rica en sacarosa, la tasa proliferativa de los β2-tanicitos alcanzó valores semejantes a la de los α1/2, atenuando las diferencias entre ambas subpoblaciones (Fig. 6H). La cuantificación de células BrdU positivas por área se muestran en la tabla comparativa 4 (Anexo). De los resultados se desprende que los cambios en la proliferación celular se deben directamente a la cantidad creciente de glucosa circulante tras HSD o en su defecto, a cambios fisiológicos inducidos tras la misma.



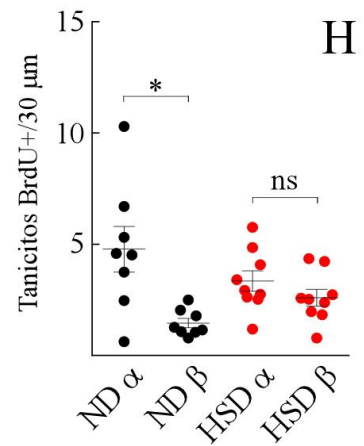
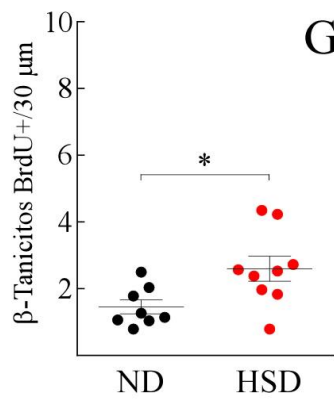
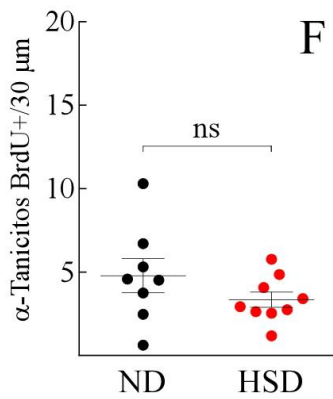
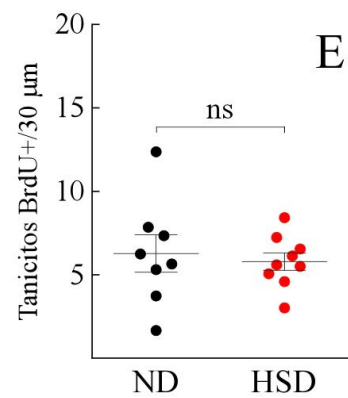
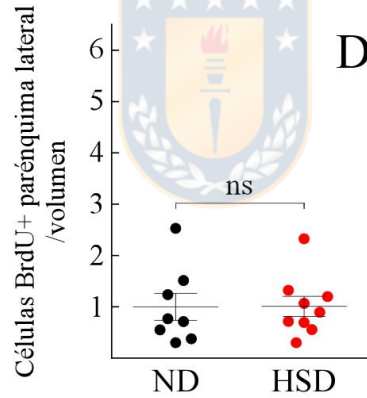
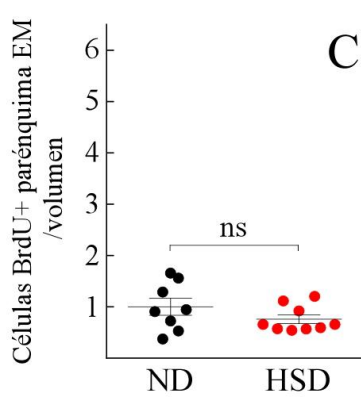
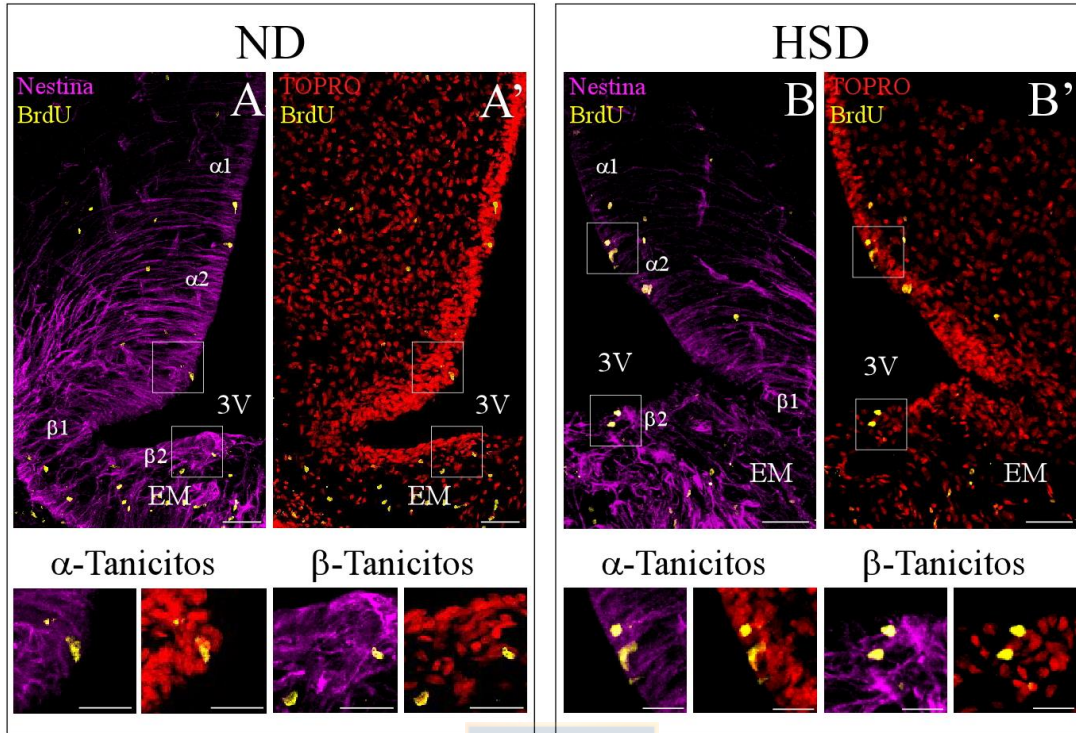


Figura 6. Proliferación de células hipotalámicas de ratas expuestas a HSD y ND.

La secuencia de las inyecciones diarias e ip de BrdU, simultáneas a la exposición de las ratas macho a una dieta rica en sacarosa (HSD) y a una dieta control (ND) coincide con el protocolo de la figura 4A. (A, A', B y B') Inmunohistoquímica de cortes frontales de hipotálamo de ratas expuestas a una dieta control (ND; A-A') y una dieta rica en sacarosa (HSD; B-B'); con anticuerpos que permiten la detección de nestina, BrdU (A, B) y co-localización con el marcador nuclear TOPRO (A'-B'). Las imágenes del panel inferior muestran una magnificación de los recuadros en A, A', B y B', señalando la proliferación de los tanicitos $\alpha 2$ y $\beta 2$, respectivamente. Barra de escala (A-B'): 50 μm . Barra de escala recuadros laterales: 20 μm . 3V, tercer ventrículo. EM, Eminencia Media. (C-D) Cuantificación del número de células proliferativas en la EM (C) y en el parénquima (D) normalizado al volumen de tejido analizado y relativo a la condición control. (E-H) Número de tanicitos proliferativos sin distinción de subpoblaciones (E), número de tanicitos $\alpha 1/\alpha 2$ (F) y $\beta 2$ (G) proliferativos y gráfico comparativo de ambas subpoblaciones en ambas condiciones (H), normalizado a 30 μm de profundidad del tejido. N= al menos 26 rebanadas y 8 animales para cada condición. La data es representada como el promedio \pm error estándar de la media; test t-Student (*) $P < 0.05$, (ns) no significativo.

En conclusión, HSD causa una modificación de la renovación celular en el hipotálamo de ratas a los 8 días de exposición; evento que concierne únicamente a la subpoblación de los β 2-tanicitos. Actualmente, se desconocen los mecanismos moleculares implicados tanto en la detección de glucosa como en la promoción de la proliferación de tanicitos. Una posible alternativa que aúne ambos eventos sería la activación de la señalización purinérgica tras la apertura de hemicanales-Cx43, la cual está presente en tanicitos como maquinaria sensible a glucosa (Orellana *et al.* 2012). Ésta a su vez, también puede ser activada por factores mitogénicos como FGF2 (De Vuyst *et al.* 2007). Con el fin de testear directamente el requerimiento de FGF2 y Cx43 para la proliferación de tanicitos, se implantaron bombas osmóticas que permitieron la administración icv continua de FGF2 y/o del péptido mimético inhibidor de Cx43, Gap27.

4. Cambios en la ingesta alimentaria tras infusión icv de FGF2 y Gap27

FGF2 y/o Gap27 fueron liberados continuamente a través de bombas osmóticas Alzet (modelo 1007D) conectadas al sistema cerebral ventricular por una cánula (Fig. 7A). El BrdU fue coadministrado para verificar la estimulación o interrupción de la proliferación celular. Las moléculas fueron administradas durante 7 días y se monitoreó el peso corporal y la ingesta alimenticia cada día tras 3 días de recuperación postcirugía (Fig. 7B). El incremento en el peso corporal para las condiciones control (infusión únicamente de BrdU), FGF2, Gap27 y la mezcla de ambos, fue normalizada al día 3 postcirugía y no mostró cambios significativos (Fig. 7C), alcanzando los valores promedios de 111.3%, 113.8%,

112.2% y 112.7% al día 6 postcirugía para cada grupo, respectivamente (Fig. 7C). No obstante, los diferentes tratamientos indujeron una alteración en la ingesta alimenticia, evaluada como gramos ingeridos por cada 200 gramos de peso corporal (Fig. 7D), en un intervalo de 24 horas. Los resultados evidenciaron una diferencia significativa entre los grupos de tratamiento Gap27 y FGF2/Gap27, alcanzando los valores de 16.9 ± 0.7 vs 21.4 ± 1.4 g al tercer día y 18.3 ± 0.7 vs 22.2 ± 0.5 g al cuarto día postcirugía (Fig. 7D). En el último día evaluado, el incremento en la ingesta del grupo FGF2/Gap27 (22.8 ± 0.6 g) fue significativo sólo respecto al grupo control (18.2 ± 1.0 g) y FGF2 (18.2 ± 1.1 g; Fig.7D).



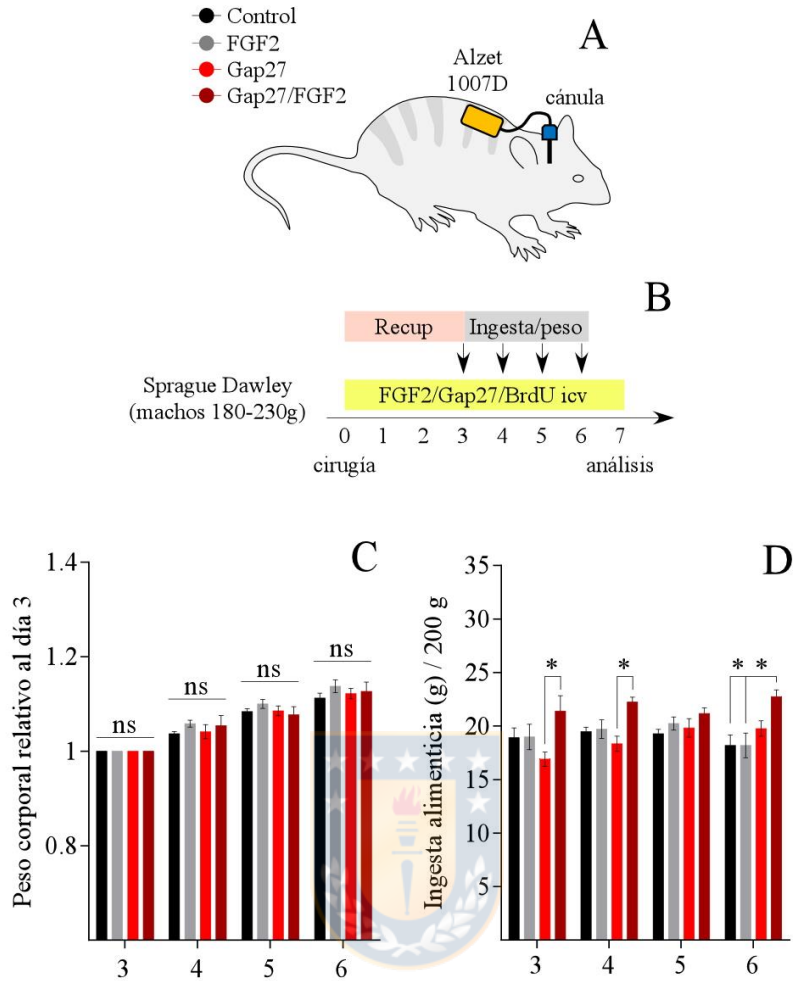


Figura 7. Parámetros metabólicos tras la administración icv de FGF2 y/o Gap27

(A) Tras la cirugía, las bombas de infusión osmótica Alzet se posicionaron intradérmicamente entre las escápulas y fueron acopladas a la cánula que conectó al 3V (Bregma -3.14 mm), permitiendo la infusión continua de BrdU en adición a FGF2 y/o Gap27 a una tasa de 0.5 μ l/h por 7 días (B). Luego de 3 días postcirugía, se evaluó el peso corporal (C) e ingesta alimenticia en gramos por cada 200 g de peso corporal (D), respectivamente. N= 5 animales para cada condición. ANOVA de dos vías. (#) $P < 0.01$, (*) $P < 0.05$, (ns) no significativo. Los datos son representados como promedio \pm error medio estándar.

5. Gap27 inhibe la proliferación inducida por FGF2 en β -tanicitos *in vivo*

Con el objetivo de detectar la renovación celular en el hipotálamo y explorar los efectos de FGF2, Gap27 y su administración conjunta, se utilizó el ensayo de proliferación celular basada en la liberación continua de BrdU al 3V, como se describió anteriormente. Los animales fueron sacrificados 8 días después de la implantación de la bomba osmótica y los cerebros fueron extraídos para posterior análisis inmunohistoquímico a través de la co-localización de BrdU (verde) con el marcador de tanicitos, vimentina (rojo) (Fig. 8). La división celular representativa de la situación control (A-A', F-F'), tras la exposición a FGF2 (B-B', C-C', G-G', H-H'), Gap27 (D-D', I-I') y la mezcla FGF2/Gap27 (E-E', J-J') se detalló en la porción hipotalámica dorsal (Fig. 8A-E') y en la porción ventral (Fig. 8F-J'). Las células ventriculares BrdU positivas, tanto de la pared ventricular lateral como del piso del 3V se muestran con flechas amarillas en la figura 8F-F', B-B', G-G' y E-E'. La infusión con FGF2 indujo un incremento en el número de células ventriculares proliferativas altamente variable, existiendo cortes con gran incorporación de BrdU en la ZV lateral (Fig. 8B-B') y ventral (Fig. 8G-G') y otros con escaso marcaje de BrdU en las mismas zonas (Fig. 8C-C' y H-H', respectivamente). La dispersión de estos datos queda en evidencia en la figura 9D y 9F.

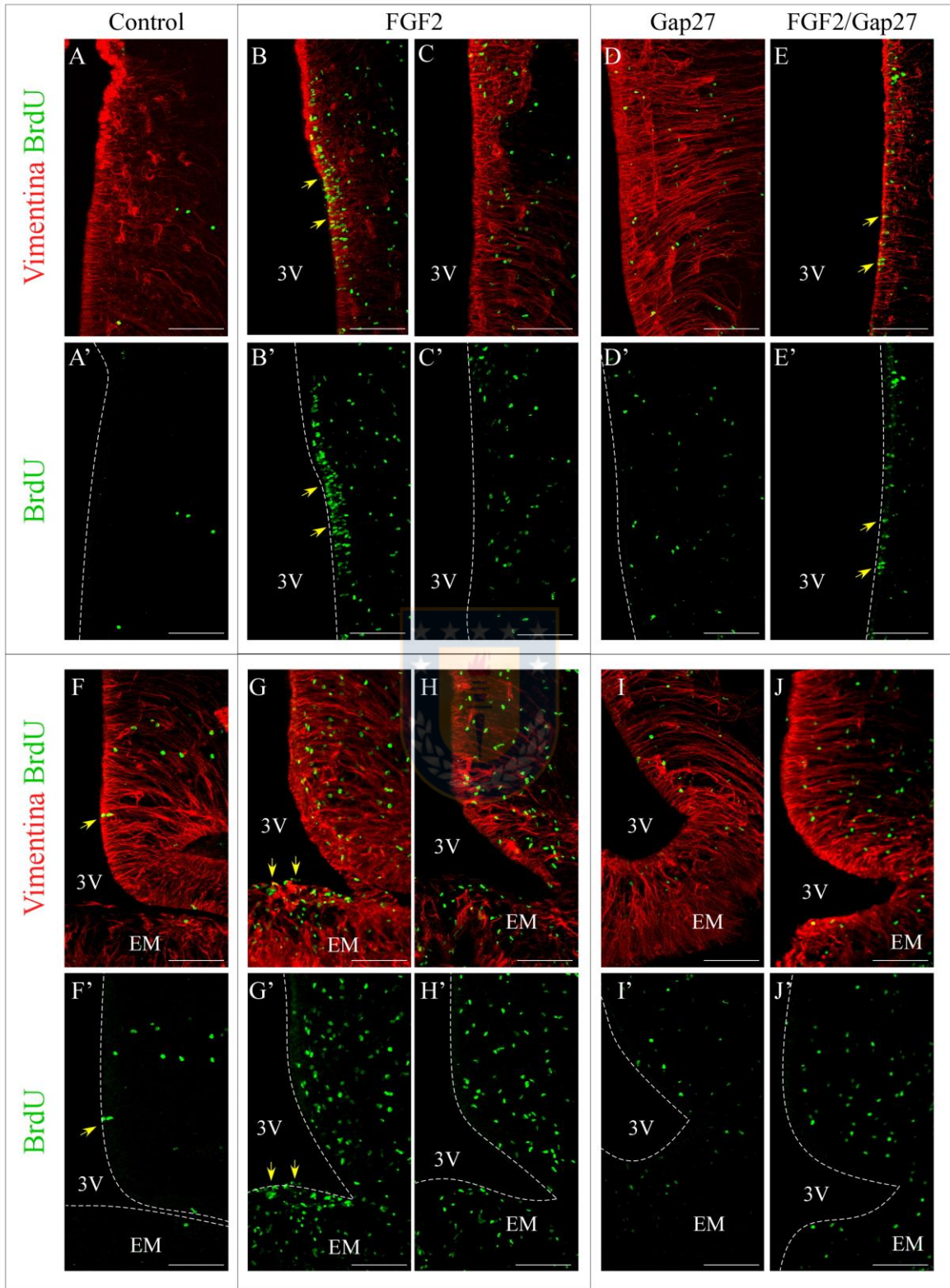


Figura 8. Proliferación de células hipotalámicas tras la exposición icv a FGF2, Gap27 y la mezcla de ambos.

Inmunohistoquímica de cortes frontales de hipotálamo de ratas expuestas por 7 días continuos a la infusión icv de vehículo (A-A', F-F'), FGF2 (B-B', C-C', G-G', H-H'), Gap27 (D-D', I-I') y la mezcla de ambos (E-E', J-J'). Mediante anticuerpos específicos, se muestra la incorporación de BrdU (verde) por células hipotalámicas, incluyendo los tanicitos marcados con vimentina (rojo). A-E'. Porción hipotalámica dorsal, que contempla la subpoblación de α 1-tanicitos y ependimocitos. F-J'. Porción hipotalámica ventral, contemplando los α 2, β 1 y β 2-tanicitos, además de células de la EM. Las flechas amarillas señalan la incorporación de BrdU por tanicitos. Barra de escala: 100 μ m. 3V, tercer ventrículo. EM, Eminencia Media.



El análisis cuantitativo de las células BrdU positivas se llevó a cabo informáticamente, considerando el número de células parenquimatosas que proliferaron, tanto para la sección dorsal y ventral como para la EM. Numerosos tipos celulares exhiben propiedades proliferativas en el parénquima del hipotálamo adulto, incluyendo astrocitos, microglía y células endoteliales (Gouaze *et al.* 2013). No obstante, en este trabajo no se determinó el fenotipo de las células nacientes. Algunos de los valores mostraron importante desviación. Sin embargo, se utilizaron todos los datos. En el hipotálamo dorsal de animales controles, el número de células proliferativas fue de $4.7 \times 10^{-5} \pm 1.1 \times 10^{-5}$ por μm^3 de tejido, y no varió significativamente en los grupos de tratamiento con FGF2 ($5.3 \times 10^{-5} \pm 1.2 \times 10^{-5}$ células BrdU $^+/\mu\text{m}^3$), con Gap27 ($5.5 \times 10^{-5} \pm 1.7 \times 10^{-5}$ células BrdU $^+/\mu\text{m}^3$), ni con la mezcla de ambos ($5.7 \times 10^{-5} \pm 4.8 \times 10^{-6}$ células BrdU $^+/\mu\text{m}^3$; Fig. 9A). El número de células que incorporaron BrdU en el hipotálamo ventral tampoco varió significativamente para los grupos control, FGF2, Gap27 y FGF2/Gap27, siendo los valores $4.5 \times 10^{-5} \pm 4.6 \times 10^{-6}$, $4.0 \times 10^{-5} \pm 2.8 \times 10^{-6}$, $4.8 \times 10^{-5} \pm 4.9 \times 10^{-6}$ y $5.7 \times 10^{-5} \pm 1.7 \times 10^{-5}$ células BrdU $^+/\mu\text{m}^3$ para cada grupo, respectivamente (Fig. 9B). La cuantificación de células proliferativas en la EM arrojó igualmente valores significativamente invariables para el grupo control en comparación a los tratamientos con FGF2, Gap27 y la mezcla de ambos ($6.6 \times 10^{-5} \pm 9.1 \times 10^{-6}$, $5.5 \times 10^{-5} \pm 7.4 \times 10^{-6}$, $5.3 \times 10^{-5} \pm 6.7 \times 10^{-6}$ y $3.2 \times 10^{-5} \pm 8.5 \times 10^{-6}$ células BrdU $^+/\mu\text{m}^3$ para cada grupo, respectivamente; Fig. 9C). A su vez, se determinó el número de tanicitos y/o endimocitos que transitaron por mitosis, definiéndolos como aquellos cuyos núcleos distaron 20 μm del borde. Para el conteo, se consideraron los siguientes grupos; α 1-tanicitos y endimocitos (Fig. 9D), α 2-tanicitos (Fig. 9E) y β 2-tanicitos

(Fig. 9F) y se normalizaron a 30 μm de grosor del tejido. Antecedentes muestran que FGF2 estimula la proliferación de $\alpha 2$ -tanicitos (Robins *et al.* 2013), razón por la cual se utilizó la infusión de este mitógeno como control positivo del procedimiento. Los $\alpha 1$ -tanicitos y endimocitos mostraron una proliferación basal de 70 ± 3 células BrdU⁺ por 30 μm , la cual aumentó, aunque no significativamente, en presencia de FGF2 (127.3 ± 31.4 células BrdU⁺ por 30 μm). Tanto la infusión de ambos compuestos (FGF2/Gap27), como de Gap27 *per se* (131.4 ± 31.9 y 79.1 ± 31.9 células BrdU⁺/30 μm , respectivamente), no disminuyeron significativamente la proliferación de $\alpha 1$ -tanicitos y endimocitos respecto de la inducida por FGF2 ni al control (Fig. 9D). Aunque con un menor número de células, se observó un efecto similar para $\alpha 2$ -tanicitos, cuya proliferación basal (8.7 ± 5.6 células BrdU⁺/30 μm) aumentó, pero no significativamente, en presencia de FGF2 (31.7 ± 8.5 células BrdU⁺/30 μm) y ésta no pudo ser revertida en presencia adicional de Gap27 (48.6 ± 27.8 células BrdU⁺/30 μm). La infusión icv del péptido mimético como control negativo, no disminuyó la proliferación de $\alpha 2$ -tanicitos respecto de la condición basal (11.8 ± 3.4 células BrdU⁺/30 μm ; Fig. 9E). La revisión cuantitativa de los $\beta 2$ -tanicitos, reveló un incremento significativo en su división celular tras la inducción con FGF2 (23 ± 4.4 células BrdU⁺/30 μm) respecto al control (9.7 ± 2.2 células BrdU⁺/30 μm), el cual pudo ser bloqueado en presencia de Gap27 (7.0 ± 0.1 células BrdU⁺/30 μm ; Fig. 9F). La administración de Gap27 por sí mismo, indujo un leve incremento, aunque no significativo, en la incorporación de BrdU respecto al basal (14.9 ± 0.8 células BrdU⁺/30 μm ; Fig. 9F). Así, los $\beta 2$ -tanicitos fueron el único tipo celular afectado por la inhibición de Cx43, la cual fue requerida

para su división en presencia de FGF2. La cuantificación de células BrdU positivas por área se muestran en la tabla comparativa 5 (Anexo).



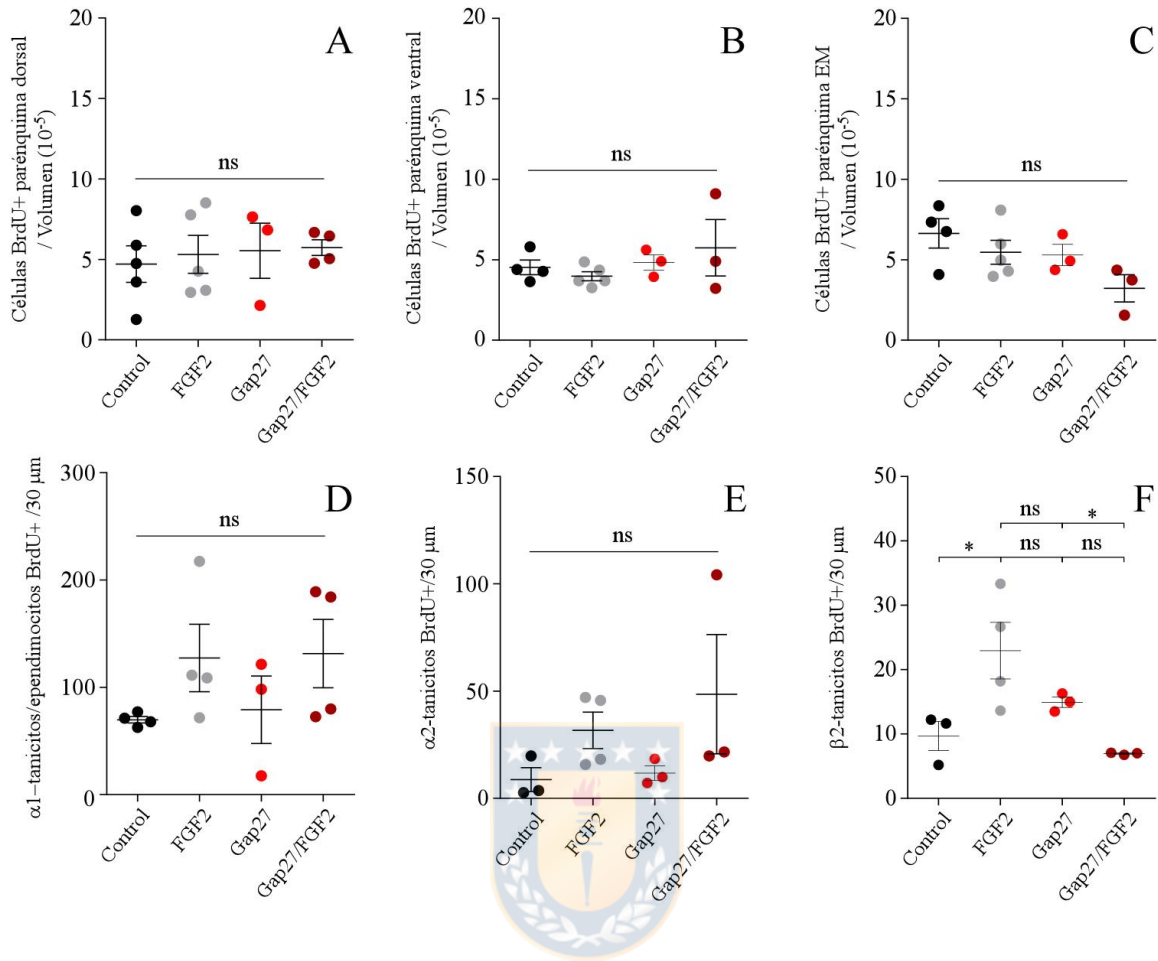


Figura 9. Análisis cuantitativo de las células hipotalámicas proliferativas tras la infusión icv de FGF2 y/o Gap27

(A-C) Número de células BrdU positivas normalizadas al volumen del tejido en el parénquima del hipotálamo dorsal (A), ventral (B) y EM (C). (D-F) Proliferación de las subpoblaciones de tanicytes normalizadas a 30 μm de grosor de la rebanada; (D) α1-tanicytes y ependimocitos, (E) α2-tanicytes y (F) β2-tanicytes. N= al menos 3 animales y 31 rebanadas para cada condición. ANOVA de una vía. (*) P<0.05, (ns) no significativo. Los datos son representados como promedio ± error medio estándar.

Con el objetivo de esclarecer molecularmente si el mecanismo sensor de glucosa que involucra secuencialmente la apertura de hemicanales-Cx43 y la liberación de ATP al medio extracelular es promovida por factores mitogénicos, y si esta señalización purinérgica es capaz de gatillar una respuesta proliferativa en tanicitos, se utilizaron cultivos primarios de tanicitos estandarizados en estudios previos (Orellana *et al.* 2012).

6. Tanicitos *in vitro* mantienen la expresión de marcadores de indiferenciación, Cx43, receptores purinérgicos, FGFs y su receptor

Para evaluar la conservación de marcadores de indiferenciación en los cultivos primarios de tanicitos, se comparó la expresión de Sox2, Cx43 y nestina y/o vimentina entre tanicitos *in vivo* e *in vitro*. Ensayos inmunohistoquímicos de una sección hipotalámica frontal con anticuerpos reactivos para Sox2 (Fig. 10A-A''), Cx43 (Fig. 10B-B'') y vimentina (Fig. 10C-C'') mostraron su expresión conjunta en las paredes que limitan el 3V (Fig. 10D-D''), coincidiendo con células tanicíticas en la porción más ventral y células endimarias en la porción más dorsal. Mientras Sox2 se localizó nuclearmente en los endimocitos (Fig. 10A'), tanicitos $\alpha 1$ (Fig. 10A') y $\alpha 2$ (Fig. 10A''), Cx43 se detectó principalmente en la porción apical tanto de tanicitos $\alpha 1$ como de tanicitos $\alpha 2$ (cabezas de flecha en Fig. 10B' y B''), respectivamente). Cx43 también fue detectada en $\beta 2$ tanicitos (Fig. 10B, flecha blanca). Similar a lo evidenciado anteriormente, Cx43 también se encontró rodeando vasos sanguíneos en el parénquima hipotalámico de rata (flechas en Fig. 10B' y B'').

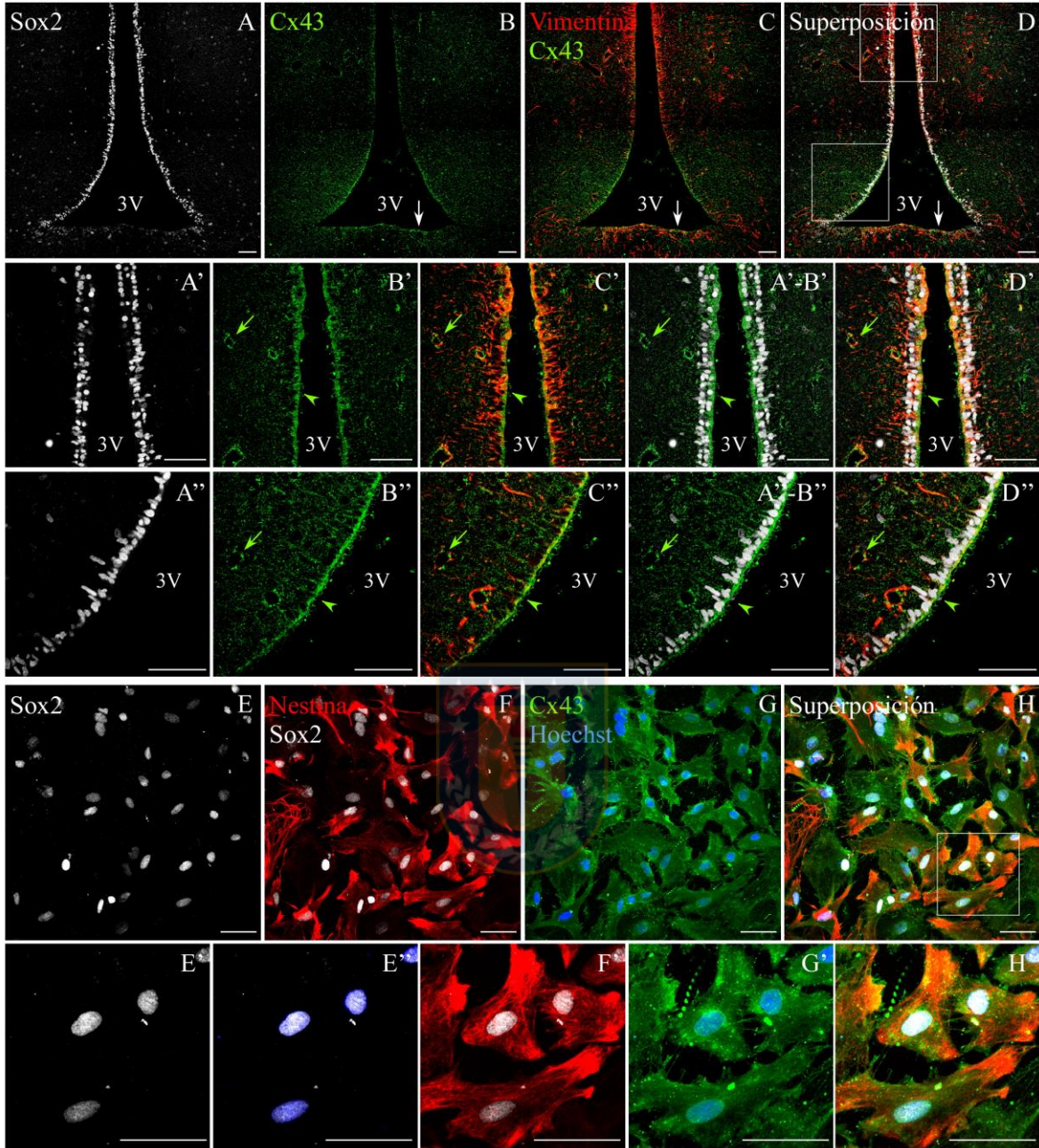


Figura 10. Conservación de Cx43 y marcadores de indiferenciación en tanicitos *in vitro*

(A-D) Inmunohistoquímica de un corte frontal de hipotálamo de rata que muestra la expresión de Sox2 (A-A''), Cx43 (B-B''), vimentina (C-C'') y la superposición de todos los canales (D-D''). Se especifica la presencia de los marcadores mencionados en los tanicitos $\alpha 1$ (A'-D') y $\alpha 2$ (A''-D''), las cuales son imágenes amplificadas de los recuadros en D. Las cabezas de flechas amarillas en B'-B'' señalan la localización de Cx43 en la porción apical de los α -tanicitos, las flechas blancas en B-D muestran su localización en los β -tanicitos y las flechas amarillas en B'-B'' indican su expresión asociada a vasos sanguíneos. (E-H) Inmunocitoquímica en cultivo primario de tanicitos usando anti-Sox2 (E-E'), anti-nestina (F-F'), anti-Cx43 (G-G') y la superposición de todos los canales (H-H'). Se usó Hoechst como marcador nuclear (E', G-G'). (E', E''-H') son imágenes magnificadas del recuadro en H. 3V, tercer ventrículo. Barra de escala: 50 μ m



Normalmente, los cultivos primarios de tanicitos son realizados bajo condiciones adherentes y por consecuencia, pierden su morfología polarizada característica (Fig. 10E-H). No obstante, conservan la expresión de Sox2 nuclear (Fig. 10E-E''), nestina (Fig. 10F-F') y Cx43 (Fig. 10G-G').

Considerando que Cx43 forma hemicanales que son cruciales para gatillar la señalización purinérgica en respuesta a glucosa en tanicitos, se evaluó si HCs-Cx43 además podían aumentar su probabilidad de apertura y potenciar la señalización purinérgica en respuesta a mitógenos como FGF2. La expresión de Cx43 y de los receptores de la señalización purinérgica presentes en PNs, así como del receptor de FGFs, que han demostrado aumentar la probabilidad de apertura de HCs, fue evaluada, en una primera etapa, transcripcionalmente. Su posterior análisis por RT-PCR convencional mostró que *cx43*, los receptores metabotrópicos; *p2y1*, *p2y2* y *p2y4* (Lin *et al.* 2007), *fgf1* (Garre *et al.* 2010; Schalper *et al.* 2008), *fgf2* (De Vuyst *et al.* 2007) y su receptor *fgfr1*, son expresados tanto en extractos hipotalámicos (Hip) como en cultivo primario de tanicitos (Tan; Fig.11).

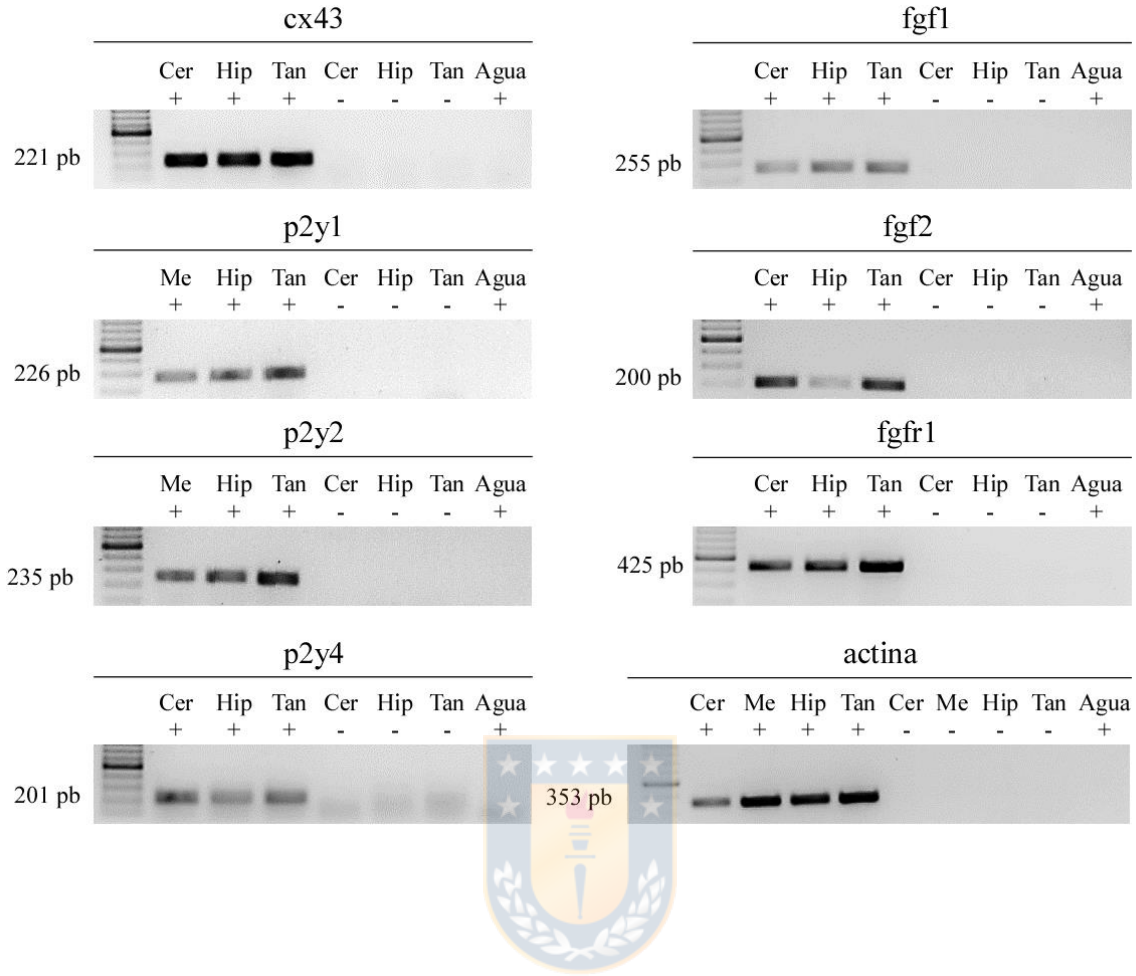


Figura 11. Expresión transcripcional de Cx43, los componentes de la vía purinérgica y señalización de FGF2 en cultivo de tanicitos

Mediante partidores específicos se amplificó un fragmento indicativo de la presencia de ARNm de Cx43, receptores purinérgicos P2Y1, P2Y2 y P2Y4, FGF1 y FGF2, receptor FGFR1 y actina como control de carga. Se extrajo ARNm total y se realizó retrotranscripción de los tejidos cerebrales (Cer), hipotalámicos (Hip), de músculo estriado (Me) y de los cultivos primarios de tanicitos (Tan). Los signos positivos representan la retrotranscripción en presencia de la enzima retrotranscriptasa (Mulv), mientras que los signos negativos indican el control negativo en ausencia de ésta. El tamaño del fragmento amplificado se muestra a la izquierda de cada electroforesis. La banda más densa en la escala de tamaño (primer carril) representa 500 pb. N=1



7. Cx43 y P2Y1 son necesarios para la proliferación de tanicitos *in vitro* inducida por FGF2.

La importancia de Cx43 y P2Y1 en la proliferación de tanicitos en cultivo fue desafiada utilizando Gap27 y MRS2179, respectivamente. Mientras MRS2179 es un antagonista competitivo de P2Y1, Gap27 es un péptido mimético de Cx43 en su secuencia aminoacídica 204-SRPTEKTIFFI-214, que interacciona con el segundo bucle extracelular y bloquea la actividad de hemicanal en minutos, pero también previene el apareamiento de dos hemicanales confrontados y de este modo también afecta la configuración de las uniones comunicantes (Abudara, 2014). La proliferación de tanicitos se evaluó tras 24 horas de ausencia de suero, tratándolos 26 horas con los diferentes compuestos disueltos en el medio de cultivo. 6 horas antes de finalizar, se renovó el medio y se añadió BrdU, como se muestra en la figura 12A. La cuantificación de la proporción de tanicitos que incorporaron BrdU, en la ventana de tiempo analizada, se llevó a cabo a través de inmunocitoquímica con anticuerpos específicos para BrdU y nestina, utilizando TOPRO como marcador nuclear (imágenes representativas en Fig. 12B). La observación arrojó que, bajo condiciones normales, sólo el $1.7 \pm 0.1\%$ (promedio \pm error estándar) de las células proliferaron (Fig. 12C). Puesto que FGFs requieren la presencia de proteoglicanos de heparán sulfato para interactuar con su receptor (Itoh & Ornitz 2004), una solución conteniendo heparina se usó para diluir y depositar FGF2 a los tanicitos (Schalper *et al.* 2008). La presencia de 20 ng/mL de FGF2 en conjunto con su cofactor heparina, aumentó la proporción de células proliferativas en un orden de magnitud, alcanzando un valor de $17.7 \pm 5.1\%$ (Fig.

12C). El cofactor heparina tuvo un efecto *per se* sobre la tasa de división celular, aunque no estadísticamente significativo, aumentando la proliferación a $5.0 \pm 1.7\%$ (Fig. 12C). Interesantemente, la presencia de Gap27 (200 μM) y MRS2170 (10 μM) pudo revertir la proliferación inducida por FGF2 a $4.8 \pm 1.2\%$ y $3.4 \pm 0.9\%$, respectivamente, sugiriendo la importancia del eje Cx43/P2Y1 en la autorenovación de este tipo celular. Cabe mencionar que la exposición de los tanicitos a cada inhibidor no afectó la división celular ($2.1 \pm 0.5\%$ para Gap27 y $1.1 \pm 0.5\%$ para MRS2179; Fig. 12C). Asumiendo que, en los cultivos primarios, nestina es expresada únicamente por tanicitos, se cuantificó el número de células doble marcadas para nestina y BrdU sobre el total de células BrdU para corroborar que los eventos de proliferación observados concernieran exclusivamente a los tanicitos (Fig. 12D). La especificidad del marcaje de BrdU en tanicitos osciló entre 95.5 ± 2.7 (para el tratamiento con Gap27) y 100 ± 0 (para el tratamiento con heparina y MRS2179; Fig. 12D). Estos resultados demostraron un alto grado de pureza en cuanto a los tipos celulares presentes en los cultivos primarios de tanicitos.

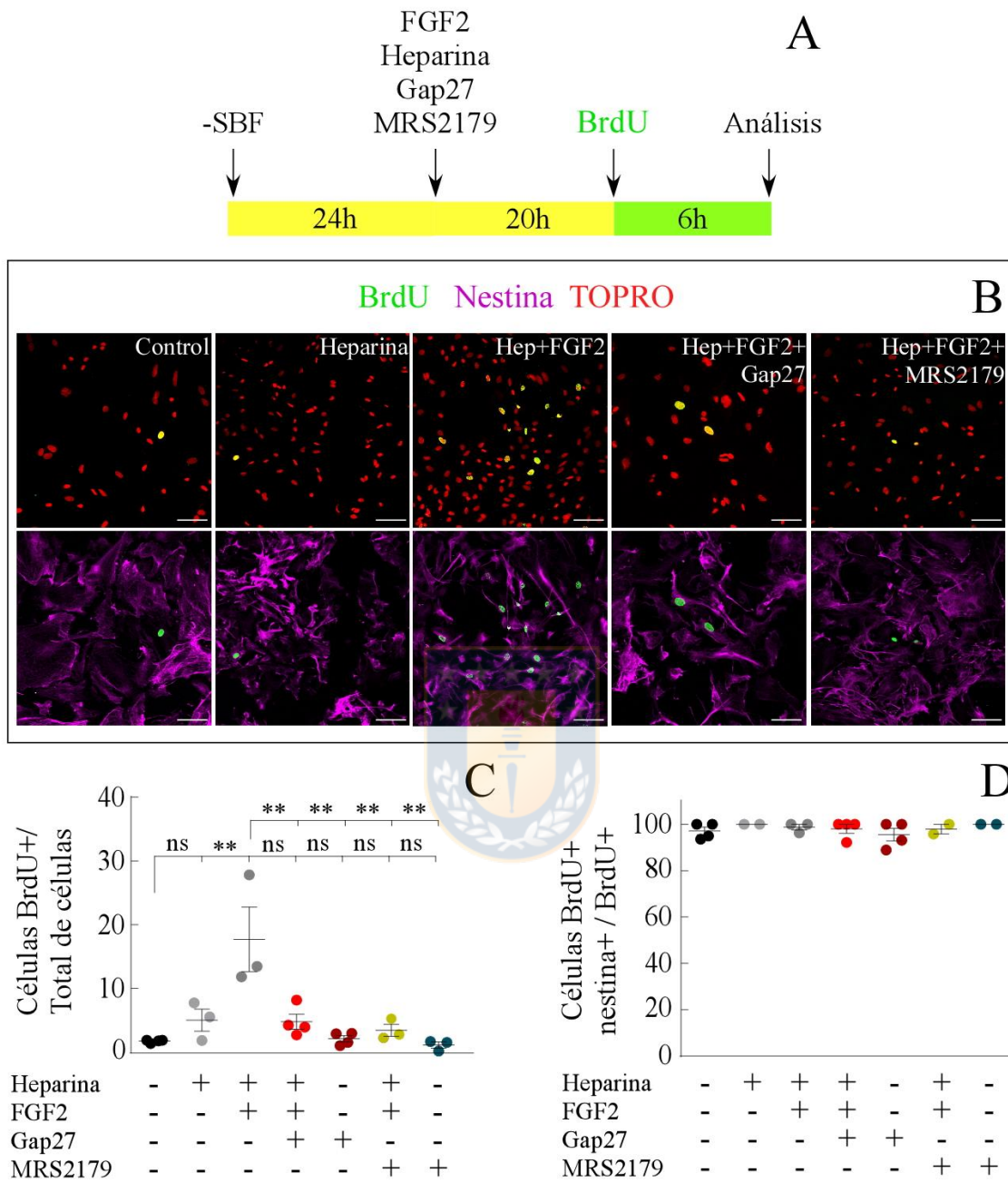


Figura 12. Proliferación de tanicitos en cultivo tras la exposición a FGF2, Gap27 y MRS2179.

(A) Línea de tiempo detallando procedimientos realizados para la incorporación BrdU. (B) Inmunocitoquímica con anticuerpos reactivos para BrdU (verde) y nestina (magenta). Se utilizó TOPRO como marcador nuclear (rojo). Barra de escala: 100 μm . (C) Cuantificación del porcentaje de células BrdU positivas tras exponer a los cultivos al cofactor de FGF2, heparina, a la combinación FGF2/heparina, a esta combinación, pero inhibiendo Cx43 o el receptor purinérgico P2Y1 a través de MRS2179. N = al menos 12 réplicas y 3 cultivos independientes para cada condición. ANOVA de una vía, corrección de Bonferroni. (*) $P < 0.05$, (**) $P < 0.01$, (ns) no significativo. (D) Cuantificación de las células BrdU+/nestina+ sobre el total de células BrdU+. Los datos son representados como promedio \pm error medio estándar.



8. FGF2 provoca un aumento de la captación de etidio sensible a Gap27 en tanicitos *in vitro*

La inhibición de Cx43 y P2Y1 bloqueó la proliferación inducida por FGF2 en tanicitos *in vitro*, sugiriendo que, en parte, la señalización de FGF2 pudiera estar corriente arriba de la vía purinérgica activada por moléculas auto- o paracrinamente liberadas a través de HCs-Cx43. Estudios previos han demostrado que FGF1 y FGF2 afectan la liberación de ATP al medio extracelular, ya sea en presencia o ausencia de cationes divalentes y que esto ocurre a las 7 horas de exposición al mitógeno (Schalper *et al.* 2008). En el presente trabajo, se estudió el efecto de FGF2 sobre el estado funcional de los HCs-Cx43, evaluando la sensibilidad de la captación de etidio (Etd) a Gap27 y lantano (La^{3+}), un inhibidor de HCs conformados específicamente de Cxs, en presencia de concentraciones fisiológicas de cationes divalentes descrito en (Schalper *et al.* 2008). Por esto, cultivos confluentes de tanicitos fueron tratados con 20 ng/mL de FGF2, 10 IU/mL de heparina y/o 200 μM de Gap27 por 7 horas. La captación de etidio se evaluó por la intensidad de fluorescencia nuclear de acuerdo con el protocolo descrito en la figura 13A. Los resultados indicaron que la combinación FGF2/heparina incrementó significativamente la fluorescencia nuclear de etidio en el tiempo (alrededor de 700 UA en promedio a los 25 minutos de registro; Fig. 13B) comparado con la condición control y con heparina (608.7 UA y 614 UA en el mismo tiempo, respectivamente), y que ésta fue sensible a La^{3+} (franja gris en Fig. 13B). El tratamiento con Gap27, aún en presencia de FGF2/heparina, revirtió su efecto a valores semejantes al control (607.6 UA a los 25 minutos). La presencia

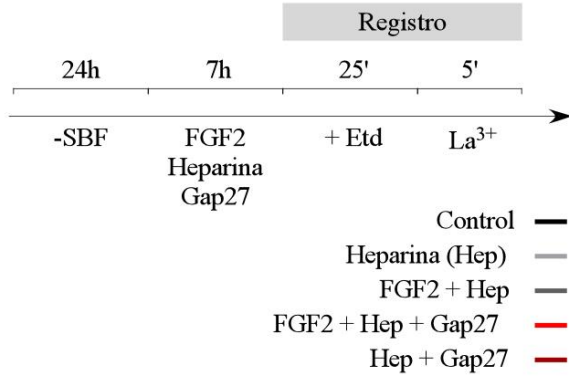
del inhibidor por sí mismo no tuvo algún efecto (conjugado a heparina; 632.2 UA a los 25 minutos).

La tasa de captación de etidio se calculó como la pendiente de las curvas en la figura 13B, y permitió comparar la sensibilidad de la tasa de captación de etidio a los diferentes tratamientos (Fig. 13C). En condiciones normales, la tasa de captación de etidio por tanicitos presentó un valor basal de 1.65 ± 0.10 UA/min (promedio \pm error estándar), la cual disminuyó no significativamente a 0.94 ± 0.08 UA/min tras la adición de La^{3+} . Luego de la adición del cofactor de FGF2, heparina, la captación de etidio aumentó, aunque no significativamente, a 2.35 ± 0.50 UA/min, mientras que la presencia de La^{3+} a los 25 minutos de registro redujo el valor similar a la condición control/ La^{3+} (0.86 ± 0.14 UA/min). Para relacionar la vía a través de la cual FGF2 incrementa la permeabilidad de la membrana de tanicitos, se aplicó un criterio farmacológico; el incremento de los niveles de captación observados en presencia de la combinación FGF2/heparina (4.70 ± 0.35 UA/min) fueron significativamente reducidos tras la aplicación de La^{3+} a los 25 minutos de registro (0.71 ± 0.27 UA/min) y restituidos a niveles similares a la condición control al ser incubados 7 horas con Gap27 (2.00 ± 0.64 UA/min y 0.58 ± 0.64 UA/min en presencia de La^{3+}). La presencia de Gap27 *per se* no tuvo efectos significativos sobre los parámetros evaluados respecto al control (1.57 ± 0.52 UA/min y 0.40 ± 0.22 UA/min en presencia de La^{3+}). Esta data confirmó que la permeabilidad de la membrana de tanicitos, medida a las 7 horas e inducida por el tratamiento con FGF2, dependió principalmente de HCs-Cx43.

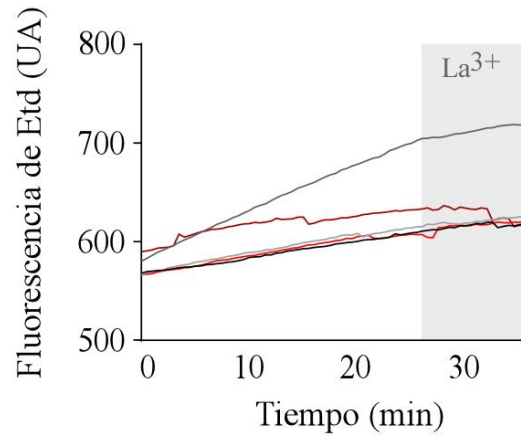
9. FGF2 media la liberación de ATP a través de la apertura de Cx43-HCs en cultivo de tanicitos

En cultivo primario de astrocitos corticales, HCs-Cx43 provee una vía para la captación y liberación de pequeñas moléculas incluyendo aquellas auto- y paracrinas como el ATP (Garre *et al.* 2010). Con el fin de explorar si la apertura de HCs inducida por FGF2 contribuye a la liberación de ATP, se evaluó la concentración de ATP en el medio de cultivo de tanicitos tratados durante 7 horas con FGF2 a través del ensayo luciferina luciferasa a 5.5 mM de glucosa (Fig. 13D). De hecho, en presencia del complejo FGF2/heparina, la concentración de ATP liberada al medio y normalizada a la concentración proteica fue 6.3 veces mayor que el control (24.0 ± 2.0 pM/ $\mu\text{g} \times \mu\text{l}^{-1}$; promedio \pm desviación estándar) y 9.1 veces más que sólo con heparina (16.6 ± 3.6 pM/ $\mu\text{g} \times \mu\text{l}^{-1}$), alcanzando valores de 152.6 ± 30.5 pM/ $\mu\text{g} \times \mu\text{l}^{-1}$. No obstante, la incubación conjunta de FGF2/heparina con Gap27, atenuó la liberación de ATP al medio extracelular significativamente, alcanzando niveles promedio de 48.8 ± 21.1 pM/ $\mu\text{g} \times \mu\text{l}^{-1}$. Nuevamente, la presencia del inhibidor Gap27 no tuvo algún efecto *per se* y los valores residuales de ATP se mantuvieron cercanos al control (32.3 ± 6.1 pM/ $\mu\text{g} \times \mu\text{l}^{-1}$).

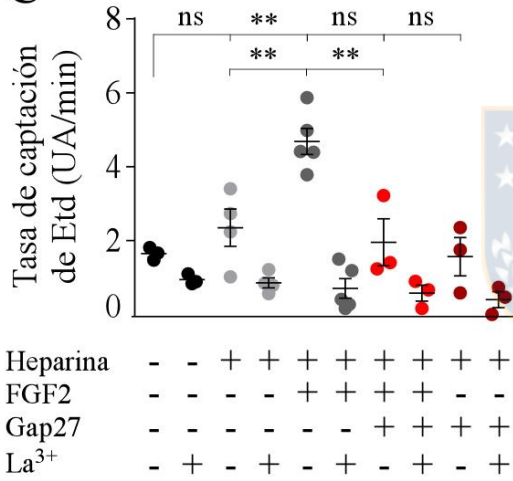
A



B



C



D

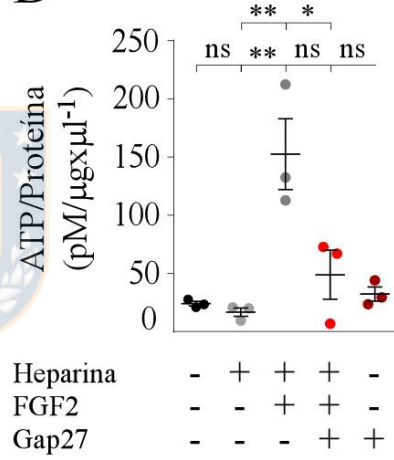
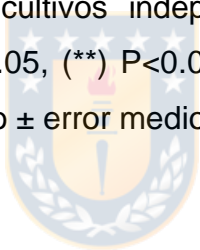


Figura 13. Apertura de Hemicanales-Cx43 y liberación de ATP al medio extracelular inducida por FGF2.

Línea de tiempo detallando procedimientos realizados para la incorporación de etidio (Etd). (B-C) Incorporación de etidio a través del tiempo (B) y tasa de incorporación de etidio (C) tras la exposición de cultivos primarios a las distintas condiciones mencionadas, cuantificada como unidades arbitrarias de fluorescencia nuclear emitida (AU) a través del tiempo (min). Los datos en (B) representan el promedio de los diferentes N experimentales. La barra gris en (B) representa el momento en que se agregó Lantano (La^{3+}) como inhibidor de hemicanales-Cxs. N= se analizó el promedio de la fluorescencia de al menos 10 núcleos y 3 cultivos independientes por condición. (D) Ensayo de Luciferin/luciferasa para medir liberación de ATP (pM) al medio extracelular, normalizado al contenido proteico total ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$). N = al menos 3 cultivos independientes. ANOVA de una vía, corrección de Bonferroni. (*) $P < 0.05$, (**) $P < 0.01$, (ns) no significativo. Los datos son representados como promedio \pm error medio estándar.



10. ATP extracelular ejerce un efecto mitogénico sobre los tanicitos *in vitro*

Estudios previos han demostrado que el ATP extracelular puede ejercer un efecto trófico de largo plazo en cultivo de astrocitos que incluye la promoción de la síntesis de ADN y división celular (Neary, 1998). Estos eventos estarían mediados principalmente por la activación de receptores purinérgicos P2 (metabotrópicos) (Neary, 1998). Para investigar la posible acción mitogénica de la señalización purinérgica activada por ATP extracelular, el cual puede ser liberado al medio por HCs-Cx43 una vez inducido por FGF2, se examinó la incorporación de BrdU en cultivos primarios de tanicitos tratados con: (i) concentraciones crecientes de ATP, (ii) ATP γ S, un análogo no hidrolizable de ATP y (iii) ATP γ S en conjunto con MRS2179, inhibidor competitivo de P2Y1. Los diferentes tratamientos fueron aplicados de acuerdo con protocolo señalado en la figura 15A. Así, condujimos experimentos de tipo concentración-respuesta, en los cuales los tanicitos fueron tratados con concentraciones crecientes de ATP que fueron desde los 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M hasta los 200 μ M. Se realizaron ensayos de inmunocitoquímica con anticuerpos específicos para BrdU (verde) y nestina (violeta), utilizando TOPRO como marcador nuclear (rojo) (imágenes representativas en Fig. 14B) y se cuantificó el número de células doble positivas (BrdU/nestina) sobre el total de células. A 10 μ M y 50 μ M de ATP, la síntesis de ADN en tanicitos fue significativamente mayor que la condición control (Fig. 14C), aumentando el porcentaje de células proliferativas desde 1.73 ± 0.12 % (promedio \pm error estándar) a 7.49 ± 1.21 % (para 10 μ M de ATP) y 6.88 ± 1.28 % (para 50 μ M de ATP). No obstante, concentraciones crecientes de ATP no condujeron a un

incremento concomitante en la síntesis de ADN, ya que a los 100 μM y 200 μM , el porcentaje de células que transitaron por mitosis fue $3.63 \pm 0.80 \%$ y $5.51 \pm 1.42 \%$, respectivamente.

Dos clases principales de receptores purinérgicos de la superficie celular han sido distinguidos por Burnstock (Burnstock & Kennedy 1985); los receptores de ATP P2 y los receptores de adenosina P1. Los receptores P1 pueden ser activados directamente por adenosina o indirectamente después de la descomposición de ATP a adenosina por ectonucleotidasas. Para determinar si la estimulación de la división celular se debía a la activación de receptores P2 y/o P1 en tanicitos, se recurrió al análogo de ATP resistente a la hidrólisis, ATP γ S (Neary *et al.* 1998) y al inhibidor farmacológico de P2Y1, MRS2179 (Fig. 14C). La presencia de 10 μM de ATP γ S fue suficiente para gatillar un aumento significativo en la población de tanicitos ($4.72 \pm 1.37 \%$) comparado con la condición control, mientras que la adición de 100 μM de MRS2179 fue capaz de revertirlo, acercando los niveles de proliferación a los de la condición control ($2.03 \pm 0.80 \%$). Similar a lo descrito anteriormente, la cuantificación de las células doble marcadas nestina+/BrdU+ sobre el total de células proliferativas varió entre 83.8 ± 4.9 (para ATP 10 mM) y $97.1 \pm 1.7 \%$ (para el control).

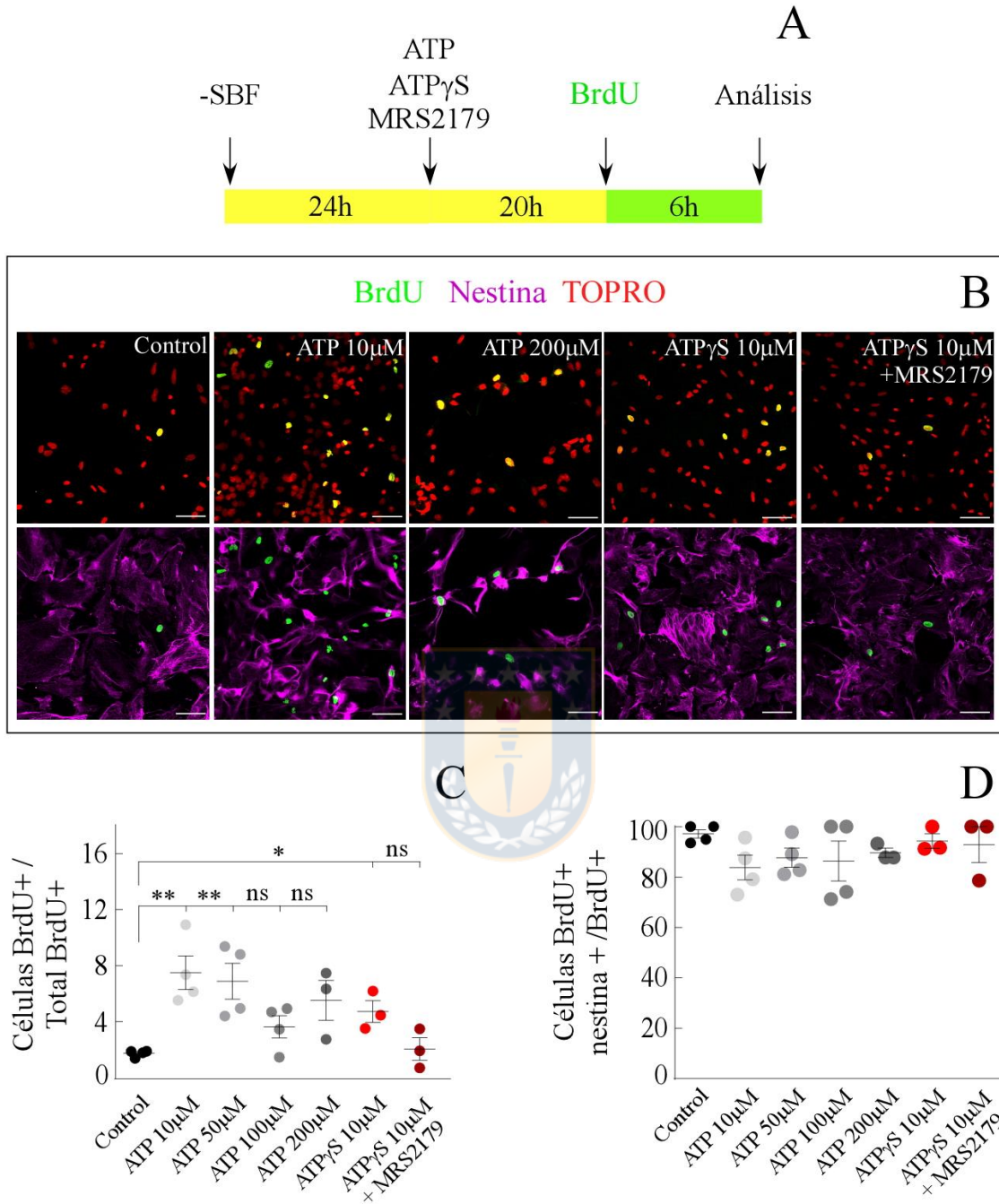


Figura 14. Proliferación de tanicitos *in vitro* tras la exposición a concentraciones crecientes de ATP, ATP γ S e inhibidor de P2Y1, MRS2179.

(A) Línea de tiempo detallando procedimientos realizados para la incorporación BrdU. (B) Inmunocitoquímica con anticuerpos reactivos para BrdU (verde) y nestina (magenta). Se utilizó TOPRO como marcador nuclear (rojo). Barra de escala: 100 μ m. (C) Cuantificación del porcentaje de células BrdU positivas tras exponer a los cultivos a ATP 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M, ATP γ S 10 μ M y ATP γ S 10 μ M en presencia de MRS2179. (D) Cuantificación de las células BrdU+/nestina+ sobre el total de células BrdU+. N = al menos 9 réplicas y 3 cultivos independientes para cada condición. ANOVA de una vía, corrección de Bonferroni. (*) P<0.05, (**) P<0.01, (ns) no significativo. Los datos son representados como promedio \pm error medio estándar.



11. FGF2 modula positivamente la expresión de Cx43 en tanicitos

¿Qué mecanismos podrían explicar la participación tardía de los HCs-Cx43 en la permeabilización inducida por FGF2? Resultados previos demostraron que el tratamiento con FGF2 por 7 horas aumentó la probabilidad de apertura de HCs-Cx43 y liberación de ATP al medio extracelular. La vida media de Cx43 es de 1.3 horas en tejido cardíaco y 5 horas en hepatocitos (Pogoda *et al.* 2016), lo cual sugiere que los cambios observados en la permeabilidad celular mediados por HCs pudieron ser consecuencia de cambios en la expresión de Cx43. Por esta razón, se estudió la expresión de Cx43 total tras el tiempo de inducción con FGF2 (Fig. 15) a través de ensayos de inmunodetección (Fig. 15A-C) e inmunocitoquímica (Fig. 15D-E'). El análisis de inmunodetección se llevó a cabo con anticuerpos específicos, los que demostraron especificidad para la detección de Cx43 en extracto proteico de corazón, y confirmaron la ausencia de ésta en extracto de hígado (Fig. 15A). Los ensayos de inmunodetección fueron realizados a partir de extractos proteicos de 3 cultivos independientes (Fig. 15B), los cuales demostraron cuantitativamente que en tanicitos, el tratamiento con la mezcla heparina/FGF2 dobló la expresión total de Cx43 (Fig. 15C), cuyos valores fueron normalizados a la subunidad β de la proteína G, la cual funciona como control de carga de proteínas insertas en la membrana celular. Para los ensayos de inmunocitoquímica y con la finalidad de identificar el límite celular, las células fueron fijadas y bañadas brevemente con una solución que contuvo aglutinina del germen del trigo (WGA) disuelta en PBS. WGA es una lectina que se une a los monosacáridos N-acetil-D-glucosamina, ácido N-acetilneuramínico y sus derivados

(Acarin *et al.* 1994). Su detección pudo llevarse a cabo por inmunocitoquímica utilizando anticuerpos anti-WGA (en rojo). En la condición control se observó co-localización con anti-Cx43 con anti-WGA en los límites externos de la célula indicando la presencia de Cx43 en la superficie de membrana celular (Fig. 15D-D', flechas). El tratamiento con FGF2 y su cofactor muestran un aparente incremento en su expresión respecto al control en la membrana (Fig. 15E-E', flechas) y también en el intracelular (Fig. 15E-E', cabezas de flechas).



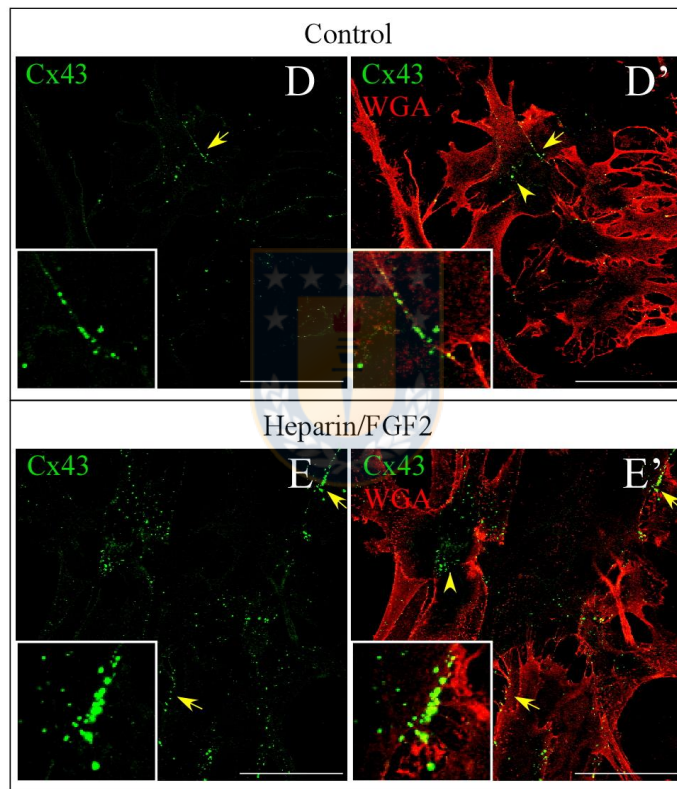
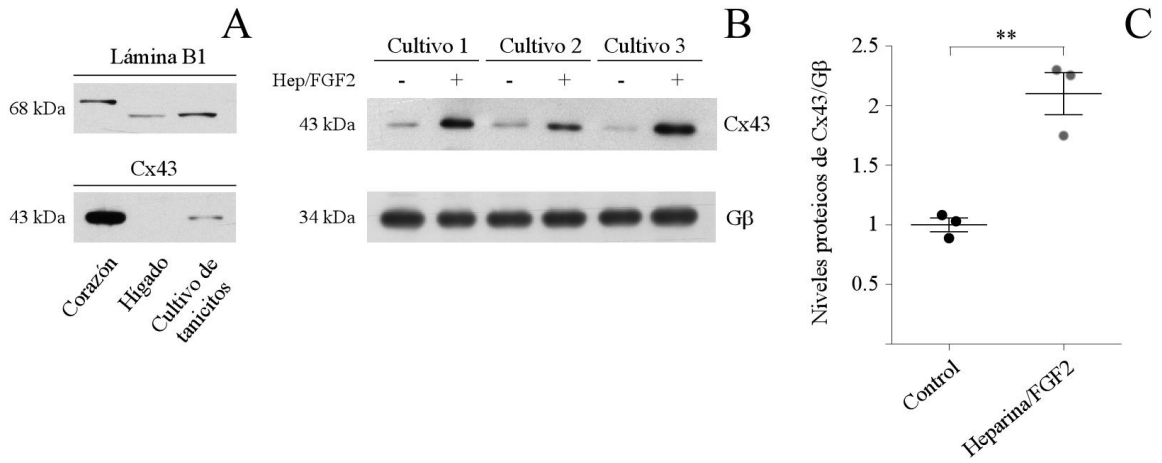


Figura 15. Cambios en la expresión de Cx43 total luego de exposición a FGF2.

(A) Inmuno-detección específica de Cx43 en lisado de tejido cardiaco (control positivo), hepático (control negativo) y extracto de proteína total de cultivo de tanicitos. Se utilizó un anticuerpo para el reconocimiento de lámina B1 como control de carga. (B) Inmunodetección de Cx43 en 3 cultivos primarios de tanicitos independientes expuestos o no a la mezcla heparina/FGF2 por 7 horas. Se utilizó un anticuerpo que detectó la subunidad β de la proteína G como control de carga ($G\beta$). (C) Análisis densométrico de Cx43 tras su inducción con heparina/FGF2, respecto a la expresión de $G\beta$ y normalizado a la situación control. $N=3$ cultivos independientes, la data es representada como el promedio \pm error estándar de la media; $P<0.01$; test t-Student. Cultivos primarios de tanicitos sin tratamiento (D-D') o con exposición de 7 horas a FGF2 (E-E') fueron fijados y tratados con anticuerpos específicos para Cx43 (en canal verde) y WGA (en canal rojo). Las flechas amarillas señalan la presencia de Cx43 en los límites celulares, co-localizando con WGA y las cabezas de flecha señalan un incremento en el intracelular. Barra de escala: 100 μm . Los recuadros muestran una amplificación de las respectivas imágenes en la región marcada con la flecha amarilla.

Posteriormente, se evaluó si el aumento de la expresión de Cx43 observada en los cultivos de tanicitos tratados con heparina/FGF2 tenía relación con componentes de la señalización de la misma vía (Arshad *et al.* 2018), para lo cual se analizó la dinámica de expresión de ERK1/2 fosforilado a diferentes tiempos de incubación dentro del transcurso de la respuesta observada a 7 horas (1, 4 y 7 horas; Fig. 16A). La fosforilación (p) de ERK1/2 es indicativa de la activación de la cascada de señalización inducida por FGF2. Análisis de inmunodetección demostró una caída, aunque no significativa, de la expresión de Cx43 dentro de las horas 1-4, y luego su recuperación a la hora 7 a valores superiores al control sin tratamiento con FGF2 (Fig. 16A superior), evento que fue opuesto a la expresión de ERK1/2 fosforilada (Fig. 16A inferior). La cuantificación densimétrica de la señal emitida para Cx43 y pERK1/2 a los diferentes tiempos fue normalizada a la situación control y se muestran en las figuras 16B y 16C, respectivamente.

Los resultados descritos demostraron que el incremento de la expresión de Cx43 en tanicitos expuestos a FGF2 fue regulado de forma inversa al estado de ERK1/2 fosforilado, cuyo máximo ocurre entre las horas 1-4 de activación por el ligando. Es posible insinuar una interacción indirecta entre ERK1/2 y Cx43 a través de eventos moleculares que no fueron detallados en este trabajo, como lo es la fosforilación del C-terminal de Cx43 o la regulación de su degradación.

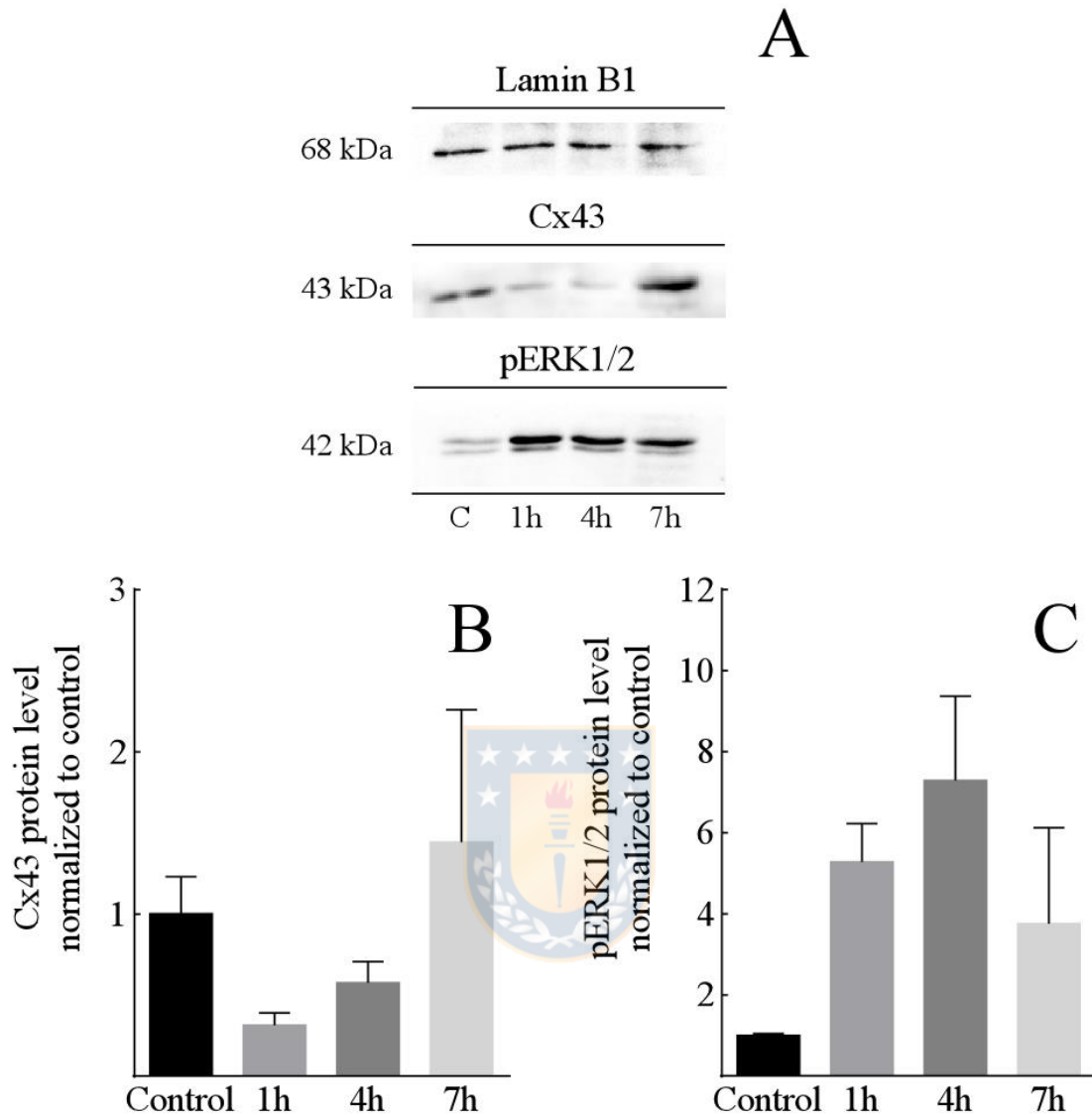


Figura 16. Cambios en la expresión de Cx43 tras las 1, 4 y 7 horas de exposición a FGF2

(A) Expresión de Cx43 y pERK1/2 en ausencia de FGF2/heparina (c=control) y al tiempo 1, 4 y 7 horas de tratamiento con FGF2/heparina. Los pesos moleculares se indican a la izquierda de cada imagen. Cuantificación densimétrica de las bandas representativas de Cx43 (B) y pERK1/2 (C) a los diferentes tiempos de tratamiento. Los valores fueron normalizados a la condición control. N= 3 cultivos independientes. ANOVA de una vía, corrección de Bonferroni, (ns) no significativo.

En cultivo, los hemicanales-Cx43 parecen tener un rol fundamental en la detección de glucosa (Orellana *et al.* 2012) y en la activación de la señalización purinérgica inducida por FGF2. Sin embargo, en la glia radial y PNs adultas, las uniones comunicantes también participan en la sincronización de su ciclo celular a través de la existencia de una red de acoplamiento que permite la propagación de ondas de calcio (Weissman *et al.* 2004). No obstante, la comunicación intercelular establecida por conexinas ha sido poco caracterizada en tanicitos *in vitro* e *in vivo*.

En línea con esto, se evaluó si los tanicitos *in vitro* conservaban la capacidad de formar redes de acoplamiento a través de uniones comunicantes y si éstas eran afectadas por FGF2. Para esto, los tanicitos fueron crecidos en cubreobjetos previamente cubiertos con poli-L-lisina hasta 90% de confluencia y suplementados con medio de cultivo carente de suero. Utilizando una pipeta de registro (Fig. 17A-B, asterisco), una única célula se llenó con Lucifer Yellow (Stewart 1981) durante 5 minutos, tras los cuales se analizó la dispersión de la molécula a otras células a través de microscopía de fluorescencia en la condición control (Fig. 17A-A') y tras 7 horas de tratamiento con heparina/FGF2 (Fig. 17B-B'). Este análisis permitió demostrar que los tanicitos en condiciones normales establecen uniones comunicantes *in vitro* formando grupos de acoplamiento que contuvieron al menos 2 células, aunque también hubo configuraciones más extensas de 10 o más células, alcanzando un promedio de 9 células conectadas (Fig. 17C). El tratamiento con heparina/FGF2 favoreció el desacoplamiento de los tanicitos a grupos de 3.2 células en promedio (Fig. 17D). Estos resultados

sugieren que el mitógeno FGF2 modula la apertura de hemicanales y produce el desacoplamiento entre las células.



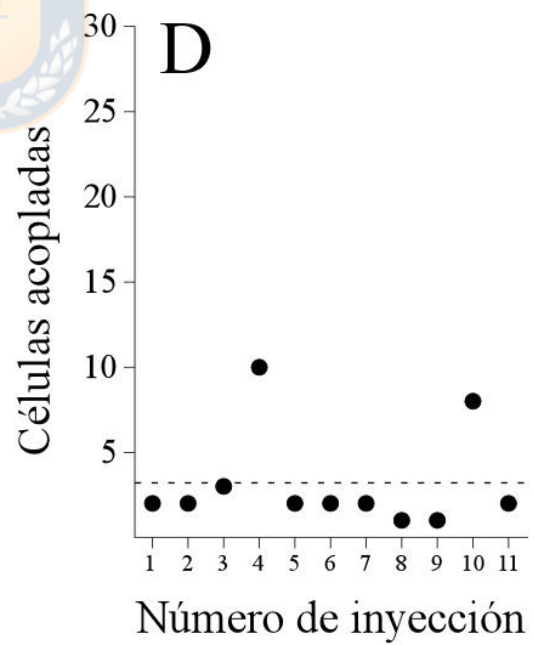
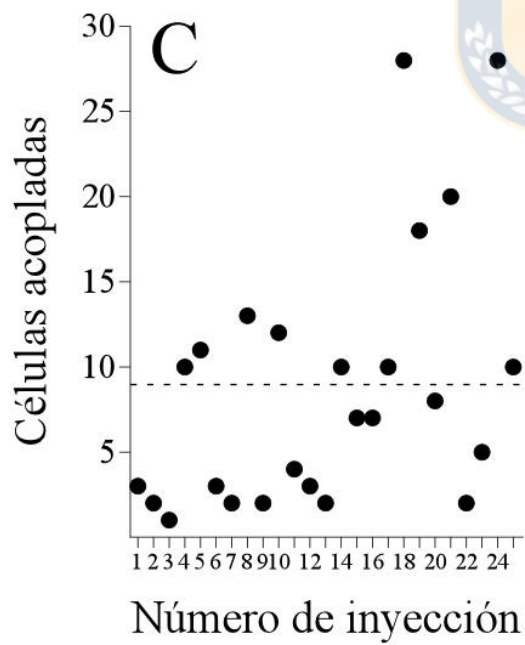
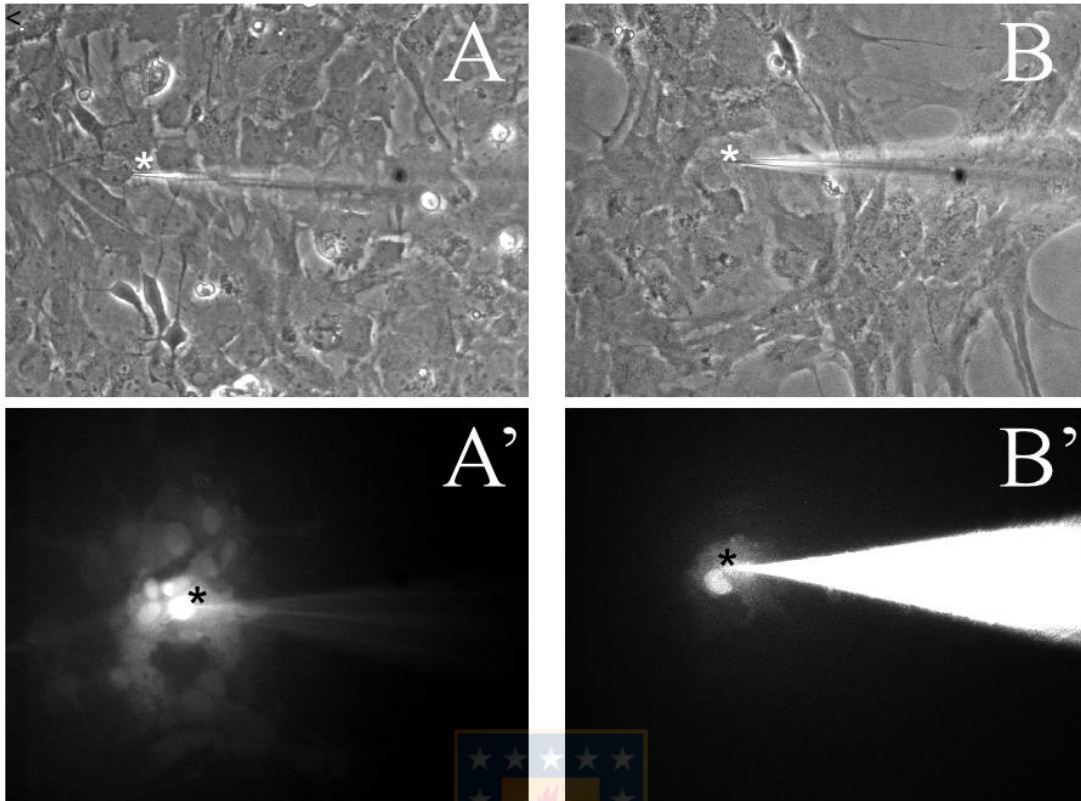


Figura 17. Desacoplamiento de las uniones comunicantes de tanicitos *in vitro* tras tratamiento con FGF2

Cultivos confluentes de tanicitos fueron montados sobre cubreobjetos. (A-B) Una célula individual fue visualizada por microscopía de campo claro, inyectada con una pipeta de registro (asterisco) y llenada con Lucifer Yellow durante 5 minutos. Ese intervalo de tiempo permitió visualizar la difusión de la señal fluorescente representativa de Lucifer Yellow a las células adyacentes (A'-B'), indicando la conformación de una extensa red de más de 10 células para la condición control (A, A') y alrededor de solo 2 células acopladas para la condición heparina/FGF2 (B, B'). (C y D) Cuantificación del número de células acopladas luego de cada inyección para la condición control (C) y heparina/FGF2 (D). La línea punteada define el promedio de células acopladas, siendo éste 9.0 en (C) y 3.2 en (D). N=3 y 1 cultivos independientes para la condición control y heparina/FGF2, respectivamente.



In vivo, un estudio previo muestra que los tanicitos están acoplados a través de uniones comunicantes formando un sincicio (Szilvasy-Szabo *et al.* 2017), que es desensamblado por carbenoxelona, un inhibidor general de uniones comunicantes. Sin embargo, las conexinas específicas involucradas en el acoplamiento de tanicitos no se había establecido hasta este trabajo de tesis.

El siguiente objetivo consistió en caracterizar la red de acoplamiento de tanicitos en rebanadas hipotalámicas vivas en cuanto a las conexinas que conforman las uniones comunicantes y la composición de fenotipos celulares asociados a la red comunicante.

12. Cx43 es la conexina más abundante en tanicitos de rata

Puesto que estudios previos de inmunocitoquímica e inmunohistoquímica han demostrado que Cx43 es expresada en tanicitos (Orellana *et al.* 2012; Szilvasy-Szabo *et al.* 2017), nuestro objetivo fue comparar la expresión de Cx43 con Cx26 y Cx30, puesto que éstas últimas han sido involucradas en la regulación de la proliferación y mantenimiento de PNs en otras áreas del cerebro (Bittman & LoTurco 1999; Liebmann *et al.* 2013) y también son expresadas por astrocitos (Nagy & Rash 2000). A través de RT-PCR en tiempo real, se confirmó la alta expresión de Cx43 en el hipotálamo de rata adulta (Fig. 18A) y cultivo primario de tanicitos (Fig. 18B). Como se muestra en la figura 18A, el ARN mensajero (ARNm) de Cx43 fue 50 veces más abundante que Cx26 y 9 veces mayor que Cx30 en el hipotálamo (barra gris oscura), mientras que Cx43 fue 1300 veces más abundante

que Cx26 y casi 2000 veces mayor que Cx30 en cultivos primarios de tanicitos (Fig. 18B, barra gris oscura). Resultados similares se obtuvieron en los ensayos electroforéticos representativos bajo cada gráfico. Sin embargo, los transcritos de Cx45, Panx1 y Panx2 también fueron altamente expresados en los cultivos primarios de rata, aunque con menor intensidad que Cx43 (Fig. 18C). Además, datos de ARN-seq obtenidos de cultivos primarios de tanicitos expuestos a 2 y 15 mM de glucosa confirmaron que Cx43 es la conexina más expresada en este tipo celular (Fig. 18 D), sugiriendo una función específica de Cx43 en este tipo celular.



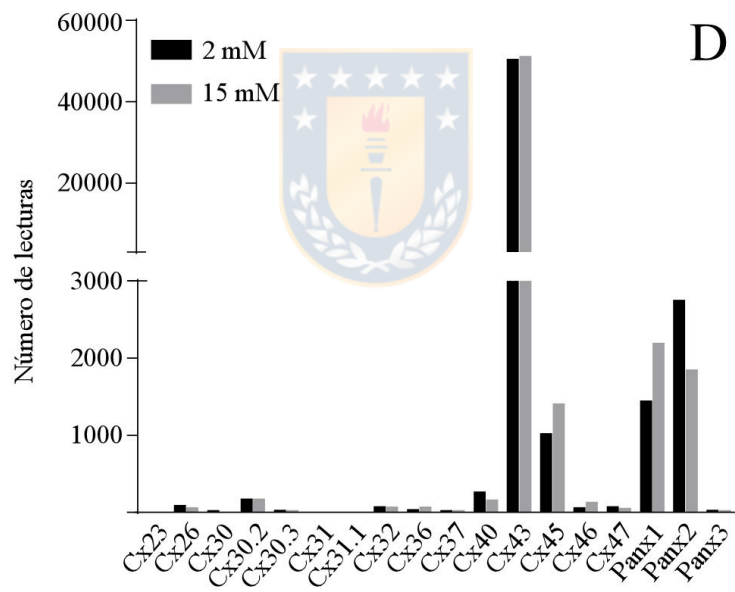
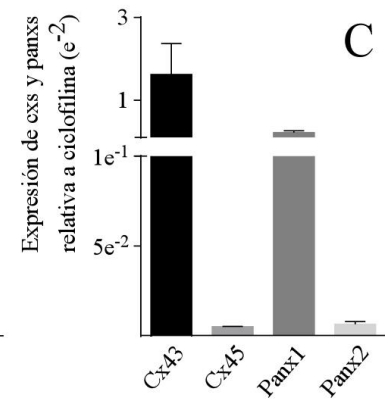
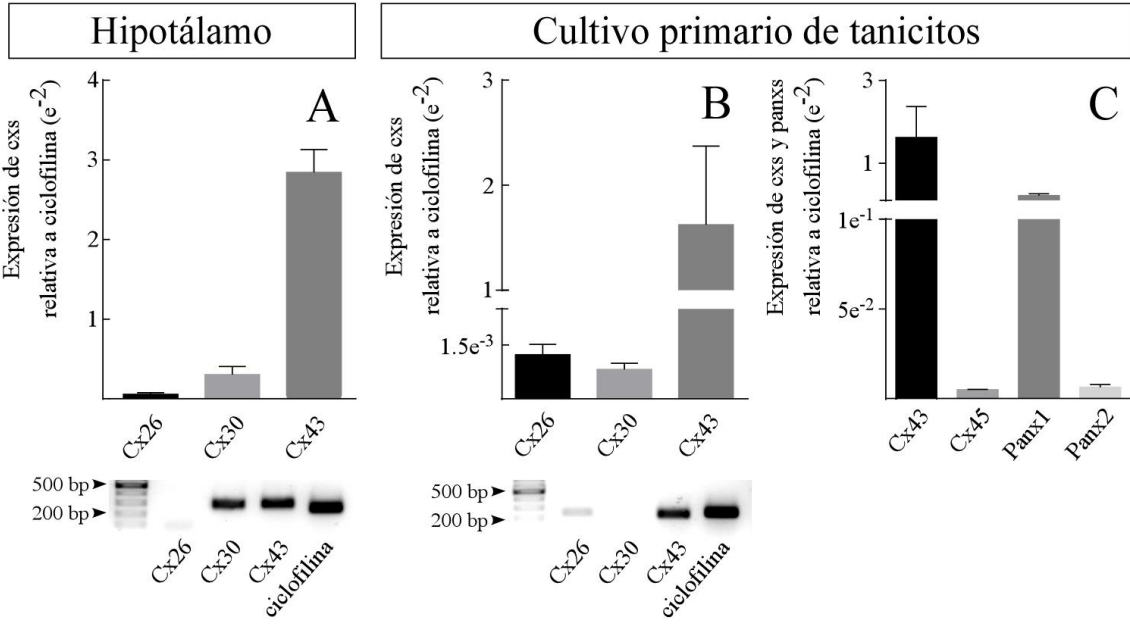


Figura 18. Cx43 está abundantemente expresada en tunicitos de rata

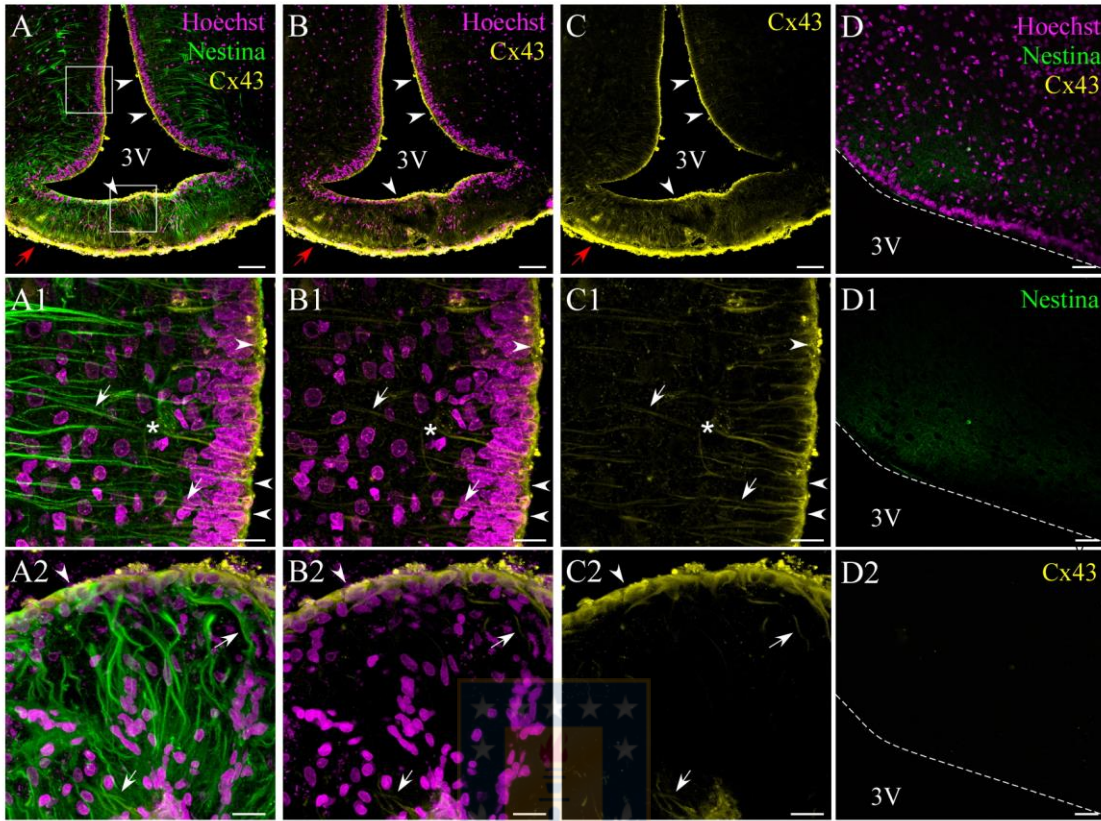
Extractos de ARN total de (A) hipotálamo de rata (N=3 animales) y (B-C) cultivo primario de tunicitos de rata (P1, N=3 cultivos independientes) fueron sujetos a RT-PCR en tiempo real (qRT-PCR) usando partidores para amplificar Cx26, Cx30, Cx43, Cx45, Panx1 y Panx2. La expresión transcripcional de las conexinas y panexinas fue normalizada a la del gen control ciclofilina. Bajo los gráficos A y B se muestra las electroforesis representativas de los productos de qRT-PCR. (C) ARNseq de las conexinas y panexinas expresadas en cultivo primario de tunicitos de rata expuestos a 2 y 15 mM de glucosa.



13. Localización de Cx43 y Cx45 en el hipotálamo de rata

Los elevados niveles de expresión de Cx43 y Cx45 en comparación a las otras conexinas (Fig. 18) nos conllevó a evaluar su localización *in vivo* a través de ensayos inmunohistoquímicos en cortes hipotalámicos frontales de ratas adultas. La inmunoreactividad para Cx43 se concentró principalmente en la pars tuberalis (flecha roja), pared lateral y piso del 3V (Fig. 19A-C, cabezas de flechas blancas). Cx43 es expresada mayoritariamente en el cuerpo celular (cabezas de flechas) y procesos (flechas) de α 1-tanicitos marcados con inmunoreactividad para nestina (Fig. 19A1-C1), pero también en el cuerpo celular de β 2-tanicitos (cabezas de flecha) y en menor medida, en los procesos de estos últimos (flechas en Fig. 19A2-C2). Es importante notar la presencia de Cx43 rodeando vasos sanguíneos parenquimales (asteriscos en Fig. 19A1-C1). De igual manera, la inmunoreactividad para Cx45 se concentra, aunque tenuemente, en la pared lateral del 3V, lugar donde residen los α 1-tanicitos (cabezas de flechas en Fig. 19E-E3) y piso del 3V, específicamente en los β 2-tanicitos (cabezas de flechas en Fig. 19F-F3). En este caso, los tanicitos fueron marcados con anticuerpos para vimentina, lo cual permite la detección específica de células mesenquimales.

Cx43



Cx45

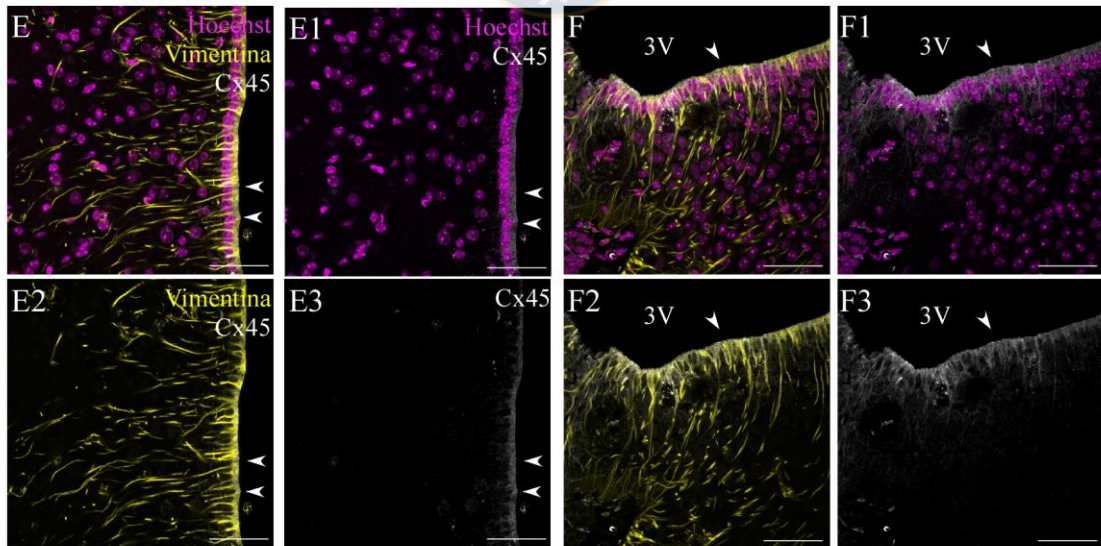
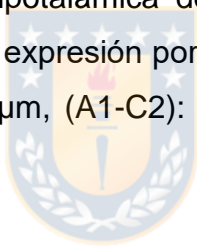


Figura 19. Localización de Cx43 y Cx45 en tanicitos de rata *in vivo*

(A-F3) Immunohistoquímica de una sección hipotalámica frontal mostrando los marcadores de PNs, nestina (en canal verde), vimentina (en amarillo), Cx43 (en amarillo) y Cx45 (en blanco). El marcador nuclear Hoechst es mostrado en magenta. (A-C) La expresión hipotalámica de Cx43 está concentrada en las paredes laterales, el piso del 3V (cabezas de flecha blancas), procesos de tanicitos (flechas blancas) y pars tuberalis (flecha roja). Cx43 es altamente expresada por α -tanicitos (A1-C1) y en menor grado, por β -tanicitos (A2-C2). Las cabezas de flecha muestran Cx43 localizada en el cuerpo celular de los tanicitos, mientras que las flechas indican la presencia de Cx43 en los procesos. Los asteriscos señalan la expresión de Cx43 alrededor de los vasos sanguíneos. A1-C1 y A2-C2 representan una magnificación 60X de los recuadros indicados en A (25X). Los controles negativos sin exposición a anticuerpos primarios se muestran en D-D2. (E-F3) La expresión hipotalámica de Cx45 co-localiza con vimentina (cabezas de flecha), indicando su expresión por α -tanicitos (E-E3) y β -tanicitos (F-F3). Barra de escala (A-C): 100 μm , (A1-C2): 20 μm , (D-F3): 50 μm . 3V, tercer ventrículo. EM, Eminencia Media.



Considerando que Cx30 no es abundantemente expresada como Cx43 en tunicitos, decidimos recurrir a la utilización de un modelo de ratón modificado genéticamente, cuya línea germinal carece de Cx30 (su ausencia es ubicua) y la actividad de la enzima recombinasa es expresada exclusivamente en células GFAP positivas para escindir el gen de Cx43, el cual está flanqueado por sitios *loxP* (Wallraff *et al.* 2006; Zhang *et al.* 2013). En este modelo, astrocitos y α tunicitos carecen tanto de Cx30 como de Cx43, razón por la cual lo denominamos doble *knock out* (dko). Primero, evaluamos la localización de Cx43 en el hipotálamo de un ratón de tipo silvestre C57BL6J y lo comparamos a la del dko (Fig. 20). Consistente con estudios previos (Szilvasy-Szabo *et al.* 2017), la inmunoreactividad para Cx43 se concentró en las paredes laterales del 3V (Fig. 20A, A') y, en menor medida, en el piso del receso infundibular (asterisco en Fig. 20A, A''). GFAP es expresado por astrocitos, pero también por α -tunicitos que colocalizan con la señal para Cx43 (flechas verdes en Fig. 20C-C''). GFAP no es expresado por los β -tunicitos, lo cual implica que es una molécula ideal para controlar la expresión de la actividad recombinasa y confinarla únicamente a astrocitos y α -tunicitos. Por lo tanto, el hipotálamo del dko carece de Cx43 únicamente en los astrocitos y α -tunicitos (cabezas de flechas verdes, Fig. 20F-K). La señal para la Cre-recombinasa (Fig. 20H) colocaliza ocasionalmente, con GFAP en el parénquima y pared ventricular, sugiriendo su expresión por astrocitos y α -tunicitos (cabezas de flechas cian, Fig. 20G, I, K). En la región medial, la señal para la recombinasa se extiende lejos de la pared ventricular en células GFAP positivas, donde la expresión de Cx43 es igualmente negativa (Fig. 20H-K).

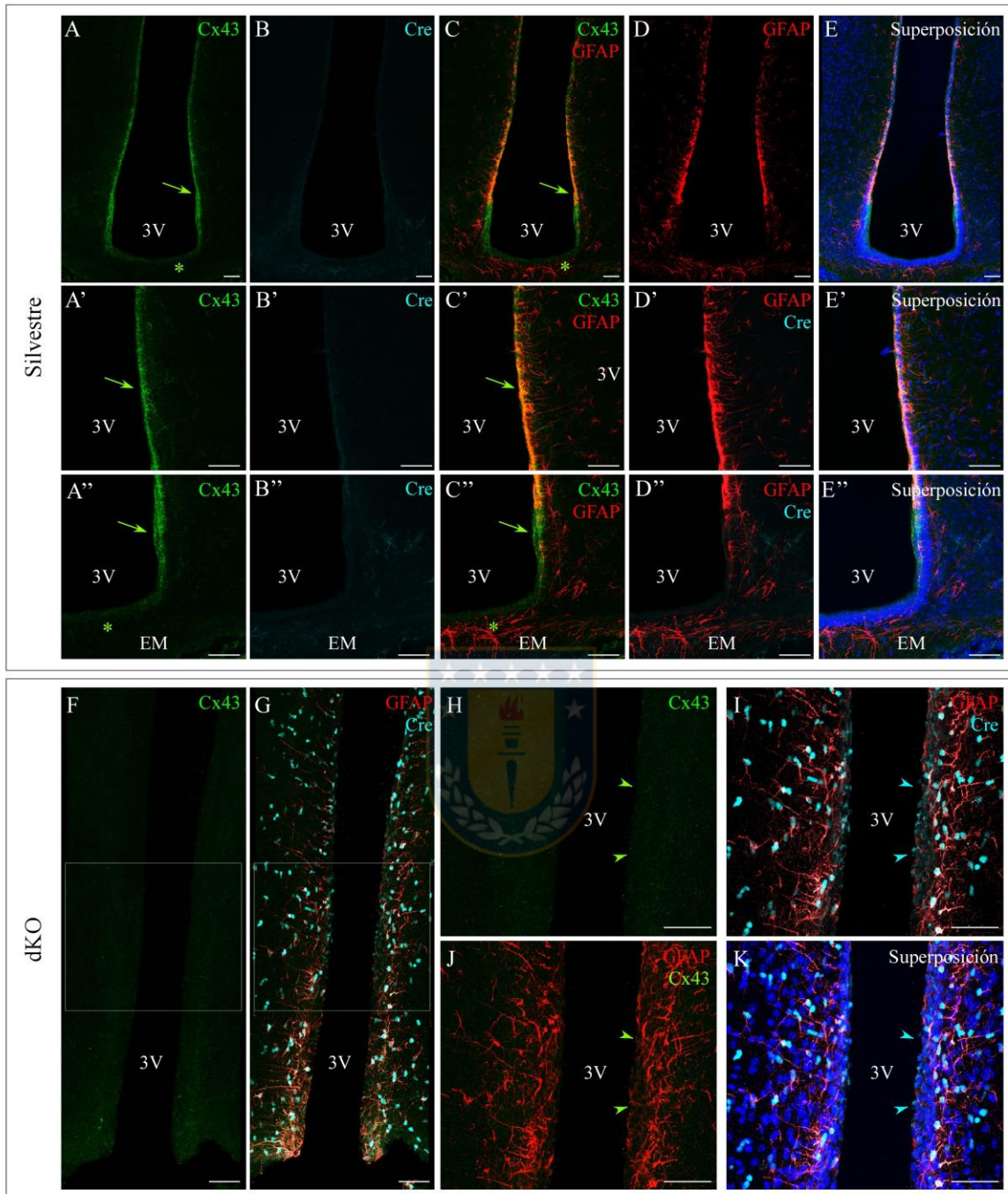


Figura 20. Ausencia de Cx43 hipotalámica en ratones Cx30, Cx43 dko

Ensayos de inmunohistoquímica de cortes hipotalámicos frontales obtenidos de ratones de tipo silvestre (A-E'') y dko (F-K). La expresión de Cx43 se muestra en verde, GFAP en rojo, la recombinasa Cre en cian y el marcador nuclear Hoechst en azul. Las flechas en A-A'' y C-C'' indican los límites de la expresión de GFAP y la colocación de GFAP con Cx43 en las paredes laterales del 3V. El asterisco en A-A'' y C-C'' muestra la débil expresión de Cx43 en los β -tanicitos. (A-E) Imágenes de baja magnificación del área ventricular medial usando los marcadores descritos. (A', A'', B', B'', C', C'', D', D'', E' y E'') son magnificaciones de las respectivas imágenes en su porción dorsal y ventral. (H, I, J y K) son imágenes aumentadas de la porción medial de F y G (recuadro blanco) señalando la expresión de la recombinasa Cre en algunos tanicitos (cabezas de flecha cian) y ausencia de Cx43 en ellos (cabezas de flecha verdes). 3V, tercer ventrículo. EM, Eminencia Media. Barra de escala: 50 μ m.



14. Cx43 es responsable de la red de acoplamiento de tanicitos con células hipotalámicas

Para evaluar el acoplamiento de α tanicitos a través de uniones comunicantes se utilizaron rebanadas frontales hipotalámicas vivas aisladas de ratones de tipo silvestre, llenando una única célula con biocitina durante su registro electrofisiológico a través de *patch clamp* en modo “célula completa”. La biocitina es una molécula de 0.3 kDa aproximadamente, permeable a las conexinas y que es capaz de difundir a otras células en presencia de una red de acoplamiento. El α tanicito seleccionado fue reconocido por su posición en la pared ventricular y su morfología polarizada; el cuerpo celular enfrenta el ventrículo y su largo y único proceso se extiende hacia el parénquima. Los tanicitos se mantuvieron a -80 mV y fueron llenados durante 20 minutos, monitoreando cada 10 minutos que la resistencia de acceso a la pipeta no aumentara sobre 20 MOhm. Mientras se registraban, se aplicó una serie de voltajes de- e hiper-polarizantes (+20 mV a -160 mV) con incrementos de 10 mV con la finalidad de evocar el patrón de corrientes característico de los tanicitos, el cual se mantiene pasivo durante el registro (Fig. 21A). En la camada de tipo silvestre, la inyección de biocitina a un único tanicito, reveló una amplia red de acoplamiento de células que delinean el ventrículo (canal verde en Fig. 21B-C), detectada por el esparcimiento de la señal a 45.4 ± 3.6 células por plano (promedio \pm error estándar; Fig. 21A), las cuales corresponderían a tanicitos a juzgar por su típica morfología y posición. Se analizó sólo un único plano focal, puesto que los tanicitos forman un epitelio de apariencia pseudo-estratificada con

núcleos difíciles de distinguir tridimensionalmente. Interesantemente, la superposición de diferentes planos ópticos mostró señales de células marcadas con biocitina en el parénquima (cabezas de flecha amarillas, Fig. 21B'-C'), las cuales no coincidieron con los procesos de los tanicitos, indicando que la red de acoplamiento se extendía más allá de la pared ventricular (7 ± 3.2 células/rebanada; $n=11$ rebanadas, $N= 5$ animales; Fig. 22B). Luego evaluamos la dispersión de biocitina en α tanicitos en rebanadas originadas en ratones $Cx30^{-/-}$, $Cx43^{+/+}$, $hGFAP-Cre^{-}$ y $Cx30^{-/-}$, $Cx43^{+/+};hGFAP-Cre^{+}$. De modo similar, cuando un α tanicito proveniente de un animal $Cx30$ ko fue llenado con biocitina, la señal se esparció a lo largo de toda la pared ventricular (Fig. 21E-E') a 54.8 ± 1.7 células acopladas por plano ($n=13$ rebanadas, $N=5$ animales; Fig. 22A). El número de células biocitina positivas en el parénquima no fue significativamente diferente a lo observado en los ratones de tipo silvestre (16.8 ± 4.7 células por rebanada, $n=13$ rebanadas, $N=5$ animales; Fig. 22B). Para examinar si la ablación de $Cx43$ es suficiente para eliminar el acoplamiento a través de uniones comunicantes entre los α tanicitos, analizamos las células de la línea $Cx30^{-/-}$, $Cx43^{fl/fl};hGFAP-Cre^{+}$ (dko), la cual muestra una significativa disrupción de la comunicación entre tanicitos (Fig. 21F-F'') con un acoplamiento residual de 3.4 ± 1.6 células por plano ($n=12$ rebanadas, $N=5$ animales; Fig. 22A) y una completa disrupción del acoplamiento con las células parenquimales (Fig. 22B). Estos resultados fueron relacionados con la dispersión de la señal a lo largo de la pared ventricular, la cual corresponde a $195.7 \pm 33.7 \mu m$, $225.4 \pm 56.6 \mu m$ and $16.7 \pm 4.6 \mu m$ para los ejemplares de tipo silvestre, $Cx30$ y dko, respectivamente ($n=$ al menos 12 rebanadas, $N=5$ animales por genotipo; Fig. 22C).

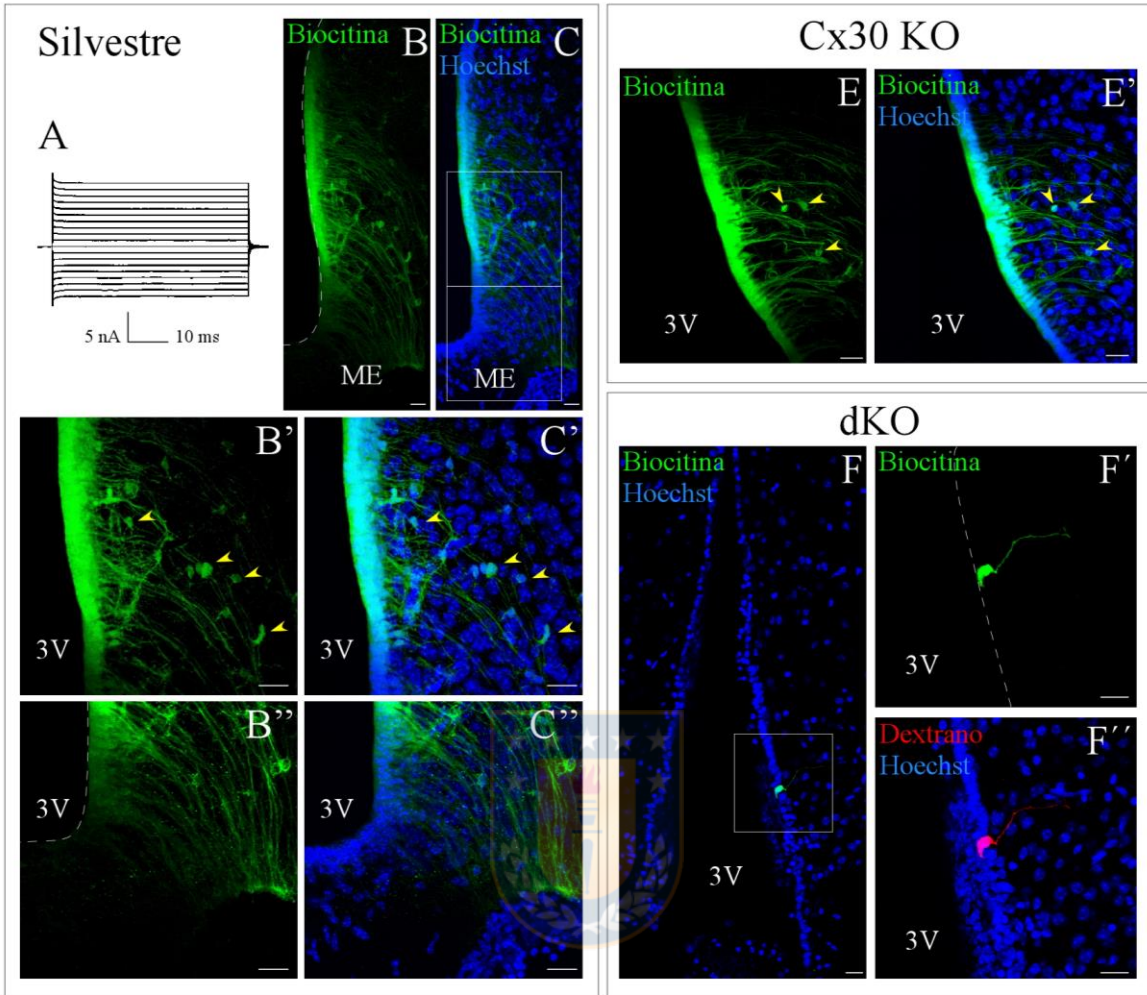


Figura 21. α -Tanicitos muestran patrones de corriente de membrana pasivos y están robustamente acoplados entre sí y con células parenquimales a través de Cx43.

Un único tanicito fue llenado con biocitina usando una pipeta durante registros de patch clamp. (A) Corrientes de- e hiperpolarizantes (+20 mV a -160 mV, potencial sostenido a -80 mV, incrementos de 10 mV) evocaron corrientes de entrada y salida independientes del tiempo y del voltaje, respectivamente. Durante los 20 minutos de registro, la biocitina difundió a través de uniones comunicantes a α -tanicitos y células parenquimales de ratones silvestres (B-C'') y de la línea germinal Cx30^{-/-} (Cx30 ko) (E-E'). No se observó difusión de la señal en ratones doble ko, donde la biocitina fue confinada al tanicito registrado (F-F''). (B-C, E-E' y F) representan un único plano óptico, mientras que (B'-C'' y F'-F'') señalan las áreas enmarcadas en C y F con una mayor magnificación (máxima intensidad de proyección de 5 planos focales). Las flechas amarillas muestran las células parenquimales acopladas. 3V. Tercer ventrículo. Barra de escala: 50 μ m.



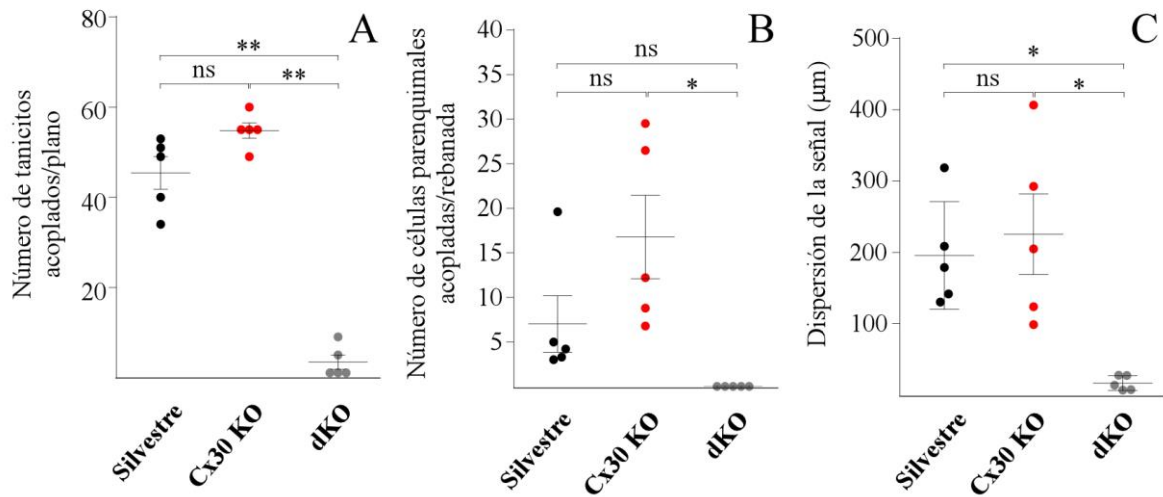


Figura 22. Análisis cuantitativo de la red de acoplamiento de α -tanicitos por Cx43

(A-B) Proporción de los α -tanicitos y células parenquimales acopladas por plano y en toda la sección hipotalámica, respectivamente, de ratones silvestres, Cx30 ko y dko. (C) Dispersión de la señal a lo largo del 3V (μm). (N=5 animales y al menos 12 rebanadas para cada genotipo; data fue representada como promedio \pm error estándar de la media; $P < 0.05$; ANOVA de una vía, Bonferroni post-hoc).

Adicionalmente, analizamos si el acoplamiento panglial detectado en los α -tanicitos de animales de tipo silvestre existe en los β -tanicitos. Un único β -tanicitito fue identificado por la localización de su cuerpo celular en el piso del 3V y su prolongación extendida hasta la vasculatura de la EM. Esta subpoblación de tanicitos presentó un patrón de corrientes transmembrana pasivo tras aplicar una serie de voltajes de- e hiper-polarizantes (+20 mV a -160 mV, con incrementos de 10 mV; Fig. 23A). Para identificar la célula registrada, se adicionó *Texas red* (3 kDa) a la solución intracelular (flecha roja en Fig. 23B-B'). Similar a lo previsto con los α -tanicitos, los β -tanicitos estaban robustamente acoplados entre sí (Fig. 23B-C') y con células parenquimales localizadas en la EM (cabezas de flecha amarillas en Fig. 23B'-C'), las cuales, a juzgar por su localización y morfología, pudieron haber sido astrocitos y oligodendrocitos.



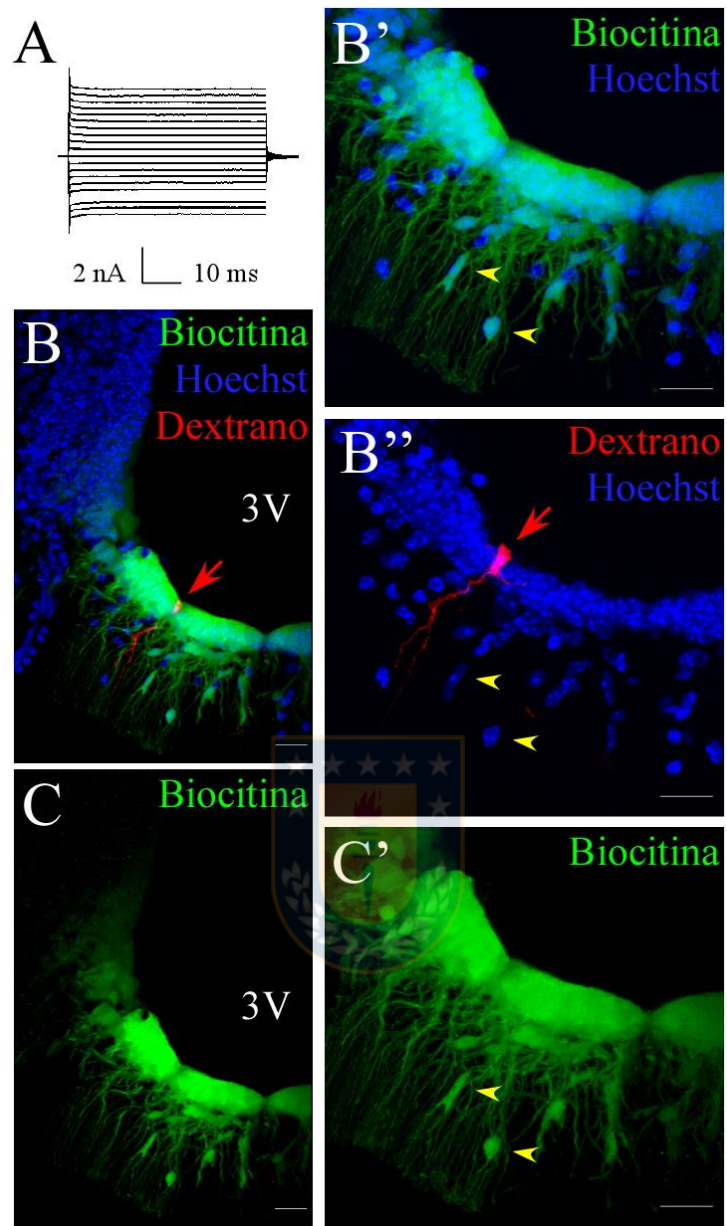


Figura 23. Los β -Tanicitos están altamente acoplados entre sí y con células parenquimales

(A) Corrientes de- e hiperpolarizantes (+20 mV a -160 mV, potencial sostenido a -80 mV, incrementos de 10 mV) evocaron corrientes de entrada y salida independientes del tiempo y del voltaje, respectivamente, en β -tanicitos de ratones de tipo silvestre (B''). (B-C) Dispersión de la biocitina entre los β -tanicitos y células parenquimales. (B', B'' y C'') Magnificación de la porción de la EM, donde los β -tanicitos se localizan. (B'-B'') Para identificar la célula que fue inicialmente registrada, la pipeta fue llenada con dextrano Texas red (3 kDa, flecha y canal cian). 3V. Tercer ventrículo. Barra de escala (B-C'): 20 μ m.



15. Los tanicitos establecen una red de acoplamiento panglial con astrocitos y oligodendrocitos

Puesto que la red de acoplamiento de los tanicitos se extiende lejos en el parénquima hipotálamico de los ratones de tipo silvestre y Cx30 ko, se apuntó a identificar las células que estaban acopladas a los tanicitos utilizando secciones cerebrales de ratones transgénicos que expresaban la proteína verde fluorescente potenciada (EGFP) bajo el promotor de GFAP humano (hGFAP-EGFP), postnatal P44-P64 (Nolte *et al.* 2001). En esta línea germinal tanto astrocitos (flechas blancas en Fig. 24A) como α tanicitos incluidos sus procesos (cabezas de flechas amarillas en Fig. 24A), fueron marcados. Después de que un único α tanicito fuera llenado con biocitina, se cuantificó la proporción de células doble positivas para biocitina y GFAP (flechas blancas en Fig. 24B-B', C-C') y se normalizó sobre el total de células biocitina positivas en la rebanada completa, excluyendo aquellas células de la pared ventricular que indican el acoplamiento de los tanicitos entre sí. La cuantificación del acoplamiento entre α tanicitos y astrocitos mostró que 11.2 ± 2.5 sobre el total de células biocitina positivas 36.6 ± 6 , fueron también eGFP positivas (n=13 rebanadas, N= 5 ratones). En promedio, 40 ± 8.5 % de las células acopladas a α tanicitos fueron astrocitos. En el parénquima, también se detectaron células acopladas EGFP negativas, razón por la cual, se realizaron ensayos de inmunohistoquímica utilizando anticuerpos para glutatión S-transferasa pi (GSTpi) (el cual se expresa sólo en oligodendrocitos y fibras mielinizadas), con el objetivo de determinar si los oligodendrocitos también estaban acoplados a los α tanicitos (Fig. 24D). En algunas rebanadas se encontró la señal de GST-pi (Fig. 24D1-D2)

co-localizando con biocitina (flecha amarilla en Fig. 24D3-D4), indicando que algunos tanicitos pueden establecer uniones comunicantes con oligodendrocitos. A pesar de que el número de células GSTpi positivas en el hipotálamo fue bajo, se cuantificó la proporción de células doble positivas para biocitina y GSTpi sobre el total de células acopladas en el parénquima de ratones hGFAP-EGFP ($3.4\% \pm 2.6$; n=11 rebanadas, N=4 animales).



hGFAP-EGFP

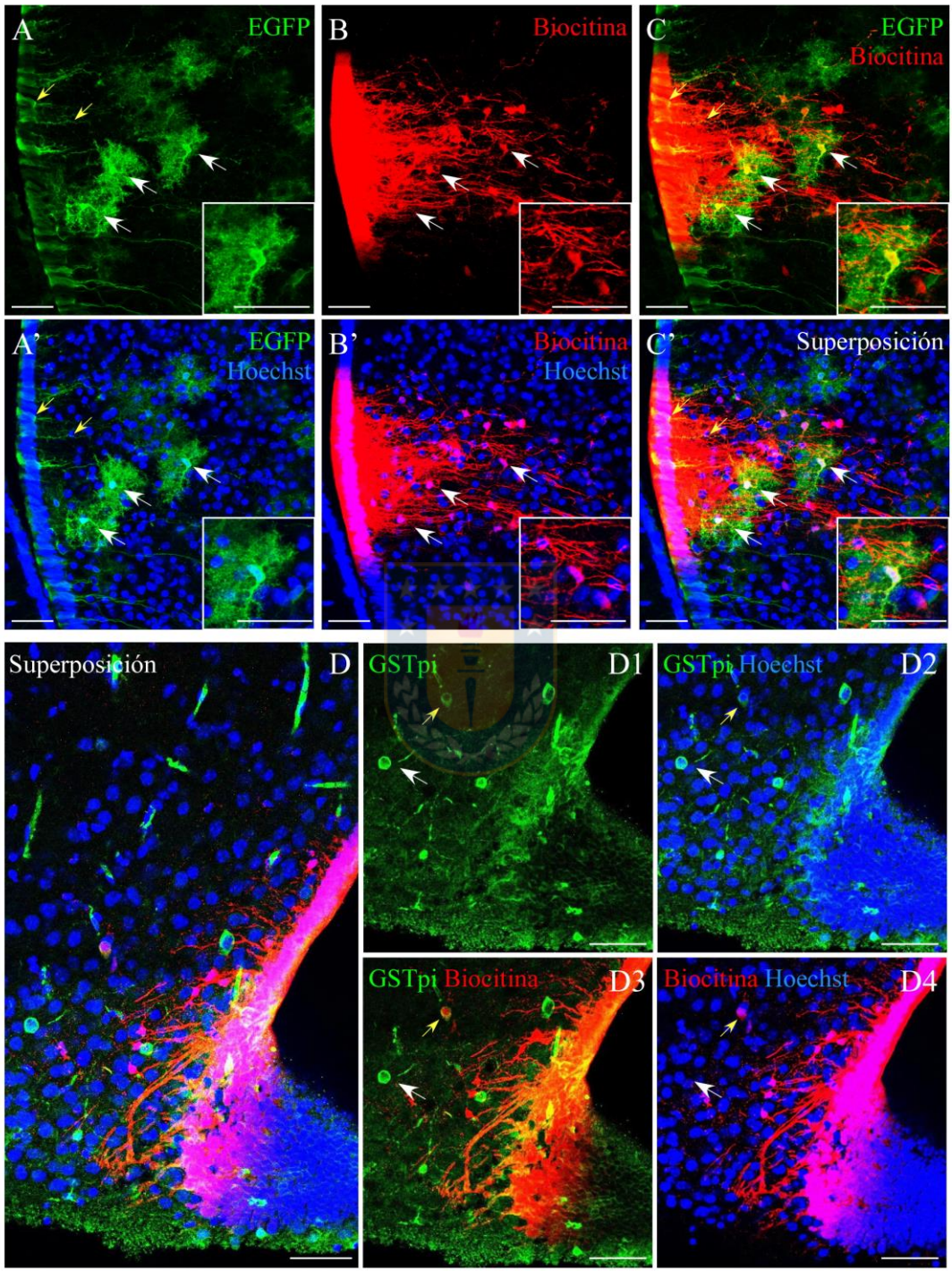


Figura 24. Análisis del acoplamiento panglial mediado por α -tanicitos

α -Tanicitos de ratones hGFAP-EGFP fueron llenados con biocitina para evaluar el acoplamiento panglial entre tanicitos y astrocitos. (A) Se realizó inmunohistoquímica contra EGFP para potenciar la señal. Las flechas amarillas señalan el soma y procesos de tanicitos que también son EGFP positivos. (B) La biocitina se propaga a los tanicitos vecinos y co-localiza con algunas células parenquimales EGFP-positivas, indicando su transmisión a astrocitos (C; flechas blancas). (A'-C') muestra las respectivas imágenes fundidas con el marcador nuclear Hoechst. En el recuadro inferior derecho se muestra una magnificación de cada imagen (A-C') de uno de los astrocitos a los cuales se propagó la biocitina. (D-D4) Ocasionalmente (en este caso, en un ratón Cx30 ko), se observó acoplamiento panglial con oligodendrocitos. (D) La inmunoreacción contra GSTpi mostró oligodendrocitos en cercanía a la parte ventral del hipotálamo. Las imágenes superpuestas (D-D4) muestran GSTpi (en verde), biocitina (en rojo) y el marcador nuclear Hoechst (en azul). Oligodendrocitos acoplados y no acoplados, se indican con una flecha amarilla y blanca, respectivamente. (D1-D4) Mayor magnificación de D, mostrando GSTpi en verde (D1), su superposición con el marcador nuclear Hoechst en azul (D2) y con biocitina en rojo (D3) y la superposición de todos los canales (D4). Barra de escala (A-D4): 50 μ m.

En consecuencia, los tanicitos pueden establecer comunicación panglial a través de uniones comunicantes con astrocitos y oligodendrocitos localizados en el parénquima hipotalámico.

16. La pérdida de red de acoplamiento altera el flujo iónico en α -tanicitos *in vivo*

Se monitorearon parámetros electrofisiológicos, como el potencial de reposo y la resistencia de la membrana, en α -tanicitos de ratones silvestres, Cx30 ko y dko a través de la obtención de rebanadas hipotalámicas vivas. En adición, el patrón de corrientes de la célula completa se midió como se describió en la figura 21A, el cual fue similar entre los ejemplares silvestres y Cx30 ko (Fig. 25A y B, respectivamente). Sin embargo, los α tanicitos de rebanadas originadas en ratones dko, presentaron una significativa reducción en el patrón de corrientes transmembrana (Fig. 25C), reflejando un incremento significativo en la resistencia de entrada (20.8 ± 2.5 MOhm, 22.1 ± 11.1 MOhm y 274.7 ± 89.7 MOhm, para ratones de tipo silvestre, Cx30 ko y dko, respectivamente). Cabe mencionar que el potencial de reposo de las tres líneas germinales no varió significativamente, siendo éstos -74.1 ± 0.7 mV, -74.7 ± 0.5 mV y -71.2 ± 3.7 mV para ratones de tipo silvestre, Cx30 ko y dko, respectivamente (Fig. 25E; n= al menos 12 rebanadas, N= 5 animales por genotipo).

Para confirmar a través de una aproximación farmacológica que la disminución de las corrientes transmembrana de los tanicitos se debía

específicamente a la pérdida de uniones comunicantes, se aplicó el inhibidor general de uniones comunicantes carbenoxelona (CBX) a rebanadas de tipo silvestre como se indica en la figura 25F. De hecho, la aplicación de CBX en la solución de perfusión (100 μ M por 15 minutos) provoca un aumento de la resistencia de entrada de α tanicitos en 2.3 veces (Fig. 25G-I; desde 22.3 ± 5.4 a 50.5 ± 16.9 MOhm, n= 12 rebanadas y N= 4 animales). Las mediciones del potencial de reposo antes y después de la aplicación de CBX tampoco variaron significativamente (Fig. 25J) (-78.0 ± 1.7 mV y -76.33 ± 3.0 mV, respectivamente).

En conjunto, estos resultados indican que una proporción significativa de las corrientes transmembrana de α tanicitos se debe a las uniones comunicantes conformadas por Cx43.



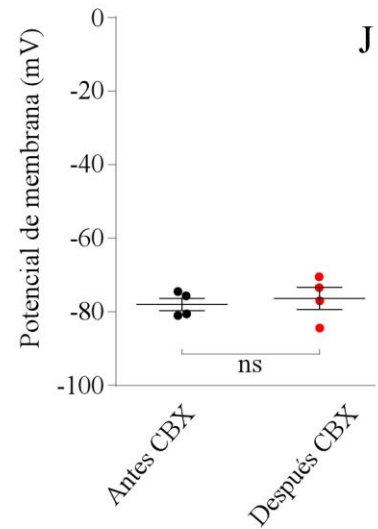
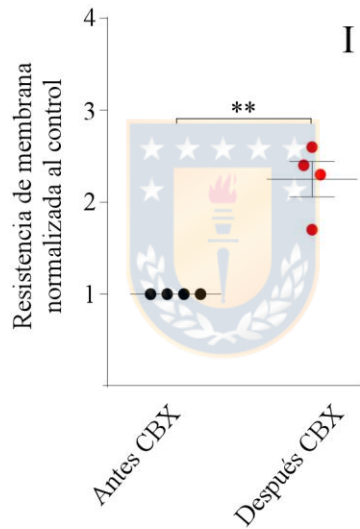
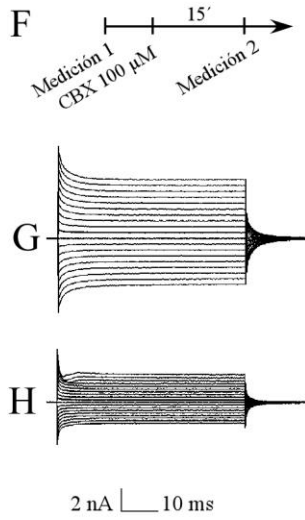
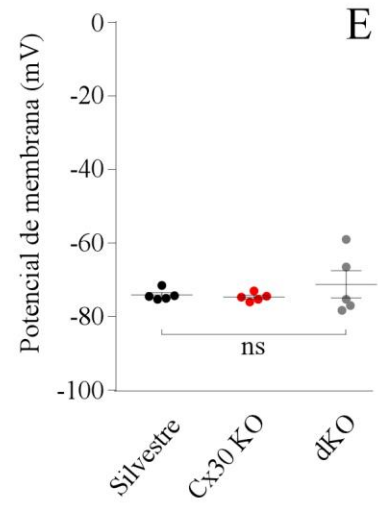
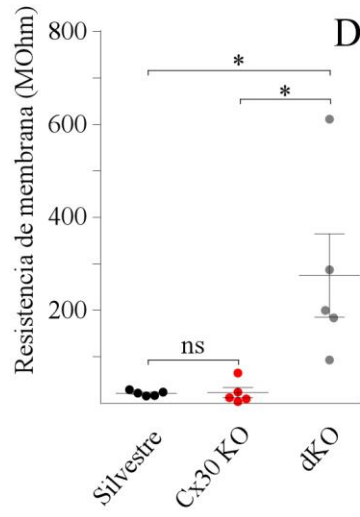
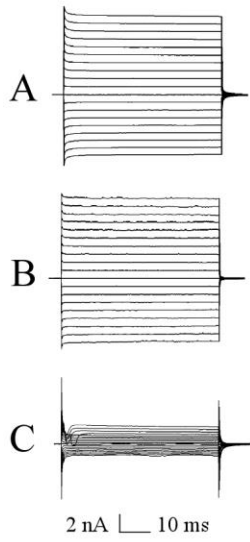


Figura 25. La pérdida de acoplamiento por uniones comunicantes afecta el patrón de corriente de α -tanicitos.

(A-D) Las corrientes de membrana fueron activadas en los α -tanicitos por corrientes de- e hiperpolarizantes como se describió anteriormente. Comparado con las células de tipo silvestre (A), la ausencia de Cx30 no afecta la resistencia de entrada de α -tanicitos (determinada de -80 a 70 mV; B, D), mientras que la ausencia conjunta de Cx43 y Cx30 (dko) conlleva a un aumento significativo en la resistencia (C, D). (E-H) La inhibición farmacológica del acoplamiento también conlleva a un incremento en la resistencia de entrada. Carbenoxelona (CBX), un inhibidor de uniones comunicantes no selectivo fue aplicado como se indica en (F). Tras registros control en solución LCRa normal, CBX (100 μ M) fue añadido durante 15 minutos, provocando un incremento significativo en la resistencia de entrada (G, H, I). (E-J) El potencial de reposo de los α -tanicitos no varió para los distintos genotipos (E), ni tras la presencia de CBX (J). (N=4 animales y 12 rebanadas; la data es representada como el promedio \pm error estándar de la media; P<0.01; test t-Student).



17. La pérdida de uniones comunicantes afecta la proliferación hipotalámica

Ya que los tanicitos puede actuar como precursores neuronales, se evaluó si la incorporación de BrdU era afectada por la ausencia de acoplamiento intercelular. Ratones de tipo silvestre y dko fueron inyectados con BrdU como se muestra en la figura 26A, después de lo cual y a través de inmunohistoquímica de secciones hipotalámicas frontales, las células BrdU positivas fueron detectadas tanto en la lejanía como cercanía al 3V (Fig. 26C, flechas y cabezas de flecha, respectivamente). Se detectó la co-localización de BrdU con el marcador nuclear Hoechst (Fig. 26C'-D', recuadros superiores).

Ensayos de inmunolocalización mostraron que los animales dko presentaron menos células BrdU positivas (Fig. 26D-D') que los animales de tipo silvestre (Fig. 26C-C'). La cuantificación del número de células BrdU positivas relativa al área parenquimal se llevó a cabo utilizando la herramienta *ROI manager* del programa computacional *Image J* y reveló 7.3 ± 0.7 y 4.6 ± 0.9 células BrdU positivas (6.8×10^{-3} y 3.3×10^{-3} células/ μm^2) en el animal de tipo silvestre (n=23 rebanadas y N=4 animales) y dko (n=13 rebanadas y N=3 animales), respectivamente. Estos resultados indicaron que la pérdida de Cx43 disminuye significativamente la capacidad de auto-renovación de células hipotalámicas.

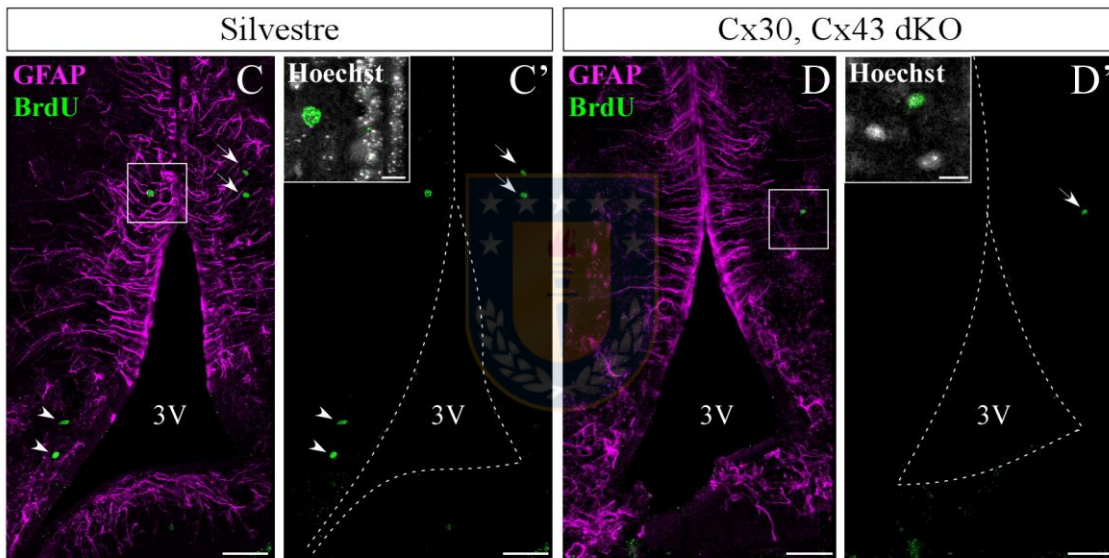
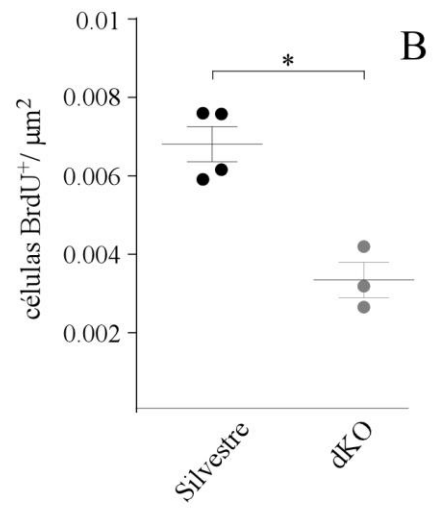
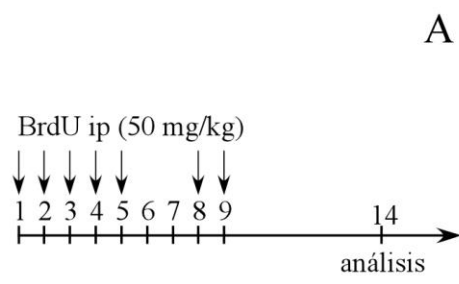


Figura 26. La pérdida de acoplamiento por uniones comunicantes afecta la proliferación celular hipotalámica

Las inyecciones intraperitoneales de BrdU se llevaron a cabo como se describe en A. (B) El número de células BrdU positivas en el parénquima fue cuantificado en 3 dKO (13 rebanadas) y 4 ratones de tipo silvestre (23 rebanadas) y los resultados fueron normalizados al área analizada (μm), usando la herramienta *ROI manager* del software image-J. El análisis estadístico se llevó a cabo usando la prueba no paramétrica Mann Whitney de una cola, $*P < 0.05$. (C-D') Inmunohistoquímicas representativas usando anticuerpos anti-BrdU (en verde) y anti-GFAP (en magenta) en secciones hipotalámicas frontales de ratones silvestres (C-C') y dKO (D-D'). Los recuadros en C'-D' indican la co-localización de anti-BrdU con el marcador nuclear Hoechst. Las cabezas de flecha señalan el BrdU en cercanía con el 3V, mientras que las flechas señalan células BrdU positivas distantes al 3V. 3V, tercer ventrículo. Barra de escala (C, C', D, D'): 50 μm , barra de escala (recuadros Hoechst): 10 μm .



Cx43 mostró ser importante para mantener la proliferación de células hipotalámicas, a pesar de que la identidad de las nuevas células generadas, que pudieron verse afectadas por la ausencia de Cx43, no pudo ser completamente dilucidada a través del protocolo de administración de BrdU. En consecuencia, era probable que la ausencia de Cx43 afectara no sólo el acoplamiento entre los tanicitos, sino que también su tasa de auto-renovación.

V. DISCUSIÓN

Efecto de la glucosa en la dieta sobre la proliferación de células hipotalámicas

Diversos estudios han demostrado la presencia de neurogénesis hipotalámica adulta en murinos y su aceleración tras la exposición del individuo a diferentes estados metabólicos (Severi *et al.* 2013), especialmente a una dieta rica en grasas (Lee *et al.* 2012; Kokoeva *et al.* 2005; Bless *et al.* 2016; Safahani *et al.* 2019). Puesto que las neuronas incorporadas adquieren mayoritariamente un fenotipo anorexigénico, se ha postulado que son parte de un mecanismo compensatorio en respuesta a un alza calórica (Gouaze *et al.* 2013; Czupryn *et al.* 2011). No obstante, se desconoce si este evento es transversal a otros tipos de dietas hipercalóricas. En el presente trabajo, se demostró que la ingesta de una dieta rica en sacarosa gatilla la proliferación de β 2-tanicitos, los cuales han sido controversialmente propuestos como PNs del hipotálamo adulto (Lee *et al.* 2012; Kano *et al.* 2019). La respuesta proliferativa parece ser exclusiva de este subtipo celular frente al alza de sacarosa, ya que las células parenquimales de los núcleos neuronales hipotalámicos, de la EM y α -tanicitos expuestos a una dieta rica en sacarosa no mostraron diferencias en la incorporación de BrdU en comparación al régimen control. La invariabilidad en el estado proliferativo de las células parenquimales en el ARC tras HFD ha sido observada en investigaciones previas (Safahani *et al.* 2019), apoyando nuestros resultados. La dieta de referencia utilizada en nuestros ensayos contiene la misma proporción de calorías, pero

almacenadas en forma de polisacáridos ramificados de glucosa, de lenta degradación. La diferencia en la composición de ambas dietas generó curvas de glicemia distintas en el tiempo, permitiendo sugerir que la división celular de los β 2-tanicitos fue sensible a la concentración de glucosa plasmática, la cual pudo ser detectada debido a la posición privilegiada de los mismos contactando la EM. Los ciclos de ayuno-alimentación inducen una constante remodelación estructural en la EM como, por ejemplo, una extendida angiogénesis hacia áreas hipotalámicas laterales y desarrollo de uniones estrechas en α -tanicitos durante el ayuno, y su restablecimiento tras la alimentación (Langlet *et al.* 2013a). Estos antecedentes apoyan la concepción plástica de las células que residen en la EM frente a cambios en el estado metabólico del individuo. Un ejemplo claro de esto es la plasticidad morfológica de la zona externa de la EM para facilitar la liberación de la hormona liberadora de gonadotropina a la circulación portal durante el ciclo estral, la cual consiste en un acercamiento de la lámina basal parenquimatosa a los terminales neuronales (Prevot *et al.* 1999). Concordante con esto, ratas hembras tratadas con una dieta rica en grasas demuestran una aumentada proliferación y neurogénesis específicamente en la EM que no se observa en machos (Lee *et al.* 2014). El mismo grupo de investigación utilizando ratones PN18, dilucidó previamente el origen de las neuronas nacientes, atribuyéndolo a los β 2-tanicitos (Lee *et al.* 2012). No obstante, nuestros estudios no pueden descartar que la propagación de β -tanicitos: (i) responda a un dimorfismo sexual ya que solo se utilizó ratas machos (Lee *et al.* 2014), (ii) anteceda al microambiente inflamatorio fomentado en la pre-diabetes y pre-obesidad (Li *et al.* 2012; Moraes *et al.* 2009; Lemes *et al.* 2018; McNay *et al.* 2012; Safahani *et al.*

2019) y/o (iii) se deba a un mecanismo glucosensor dependiente del receptor del sabor dulce Tas1r2 (y no del metabolismo de la glucosa), el cual puede de igual modo, evocar incrementos de calcio transmisibles entre tanicitos (Benford *et al.* 2017). Estudios futuros podrían considerar especificar el fenotipo adquirido por los β -tanicitos una vez inducida su proliferación con la dieta rica en sacarosa con el fin de dilucidar su diferenciación a células gliales (astrocitos) o neuronales (AgRP o POMC, entre otros).

Cx43 en la proliferación de tanicitos

Las vías específicas a través de las cuales es administrado el BrdU resultan en distintos patrones de señal ya que reflejan diferente disponibilidad de esta molécula a diferentes tipos celulares. Por ejemplo, su administración periférica marca preferencialmente tanicitos de la EM porque están próximos al suministro de sangre periférica, mientras que el BrdU icv es incorporado fácilmente por células de las paredes del 3V y parénquima (Sousa-Ferreira *et al.* 2014). Para conseguir un acceso equivalente y continuo a todas las subpoblaciones de tanicitos, se recurrió a la implantación de bombas osmóticas conectadas a una cánula en el 3V. Las bombas fueron cargadas de BrdU e inhibidores farmacológicos que permitieron elucidar parte del mecanismo molecular que participa del proceso proliferativo de los tanicitos. Se demostró *in vivo*, que Cx43 juega un rol crucial no sólo en la detección de glucosa por tanicitos (Orellana *et al.* 2012; Frayling *et al.* 2011a), sino también en la auto-renovación de éstos, evidenciando la versatilidad de esta proteína. La administración icv del inhibidor

farmacológico de Cx43, Gap27, fue capaz de impedir la proliferación mediada por FGF2 específicamente en β -tanicitos y, además, la infusión conjunta de ambas moléculas alteró la ingesta alimentaria. Anteriormente, FGF2 se catalogó como una molécula anorexigénica, la cual aumenta fisiológicamente su concentración en el LCR postprandialmente en ratas (Oomura *et al.* 1992). Posterior y contradictoriamente, la inhibición farmacológica de FGFR1c, receptor de FGF2 expresado por tanicitos, indujo una disminución de la ingesta alimenticia y peso corporal que se mantuvo días después de la infusión icv o la administración periférica del fármaco a hamsters siberianos (Samms *et al.* 2015). Por otro lado, la expresión hipotalámica de Cx43 ha demostrado ser variable entre los ciclos de ayuno-realimentación y su inhibición afecta la secreción de insulina tras inyecciones de glucosa (Allard *et al.* 2014). Los resultados del trabajo expuesto señalan que al cuarto día de infusión de FGF2, existe una tendencia (aunque no significativa) a la reducción de la ingesta alimenticia, coincidiendo con los estudios realizados por Oomura (Oomura *et al.* 1992). Contrariamente, la infusión conjunta de FGF2 y Gap27, indujo un incremento significativo y sostenido en el tiempo de la ingesta, sugiriendo que la inhibición de Cx43 fue suficiente para atenuar el efecto anorexigénico de FGF2 y alterar la detección de nutrientes (Allard *et al.* 2014). Estos cambios metabólicos pueden ser atribuidos al impacto inmediato de FGF2/Gap27 sobre los tanicitos, que son las células que contactan directamente al LCR, pero también sobre otros tipos celulares altamente proliferativos que expresan Cx43, como lo son las células endoteliales (Morita *et al.* 2013; Arshad *et al.* 2018). Aunque se ha sugerido que la angiogénesis tiene poca ocurrencia en el cerebro adulto bajo condiciones fisiológicas, BrdU también es incorporado por

células de la EM que además expresan el marcador de endotelio CD31, y los marcadores de vasculatura en desarrollo; NG2, PDGFRB, DLL4, indicando que la EM remodela constantemente su vasculatura (Morita *et al.* 2013). Es probable que la multiplicación de tanicitos, así como los cambios en el comportamiento alimenticio, dependan de la concentración de FGF2 y Gap27 alcanzada en el LCR, la cual pudo haber sido insuficiente o excesiva para lograr respuestas notorias en, por ejemplo, la incorporación de BrdU por α -tanicitos.

FGF2 modula la apertura de HCs-Cx43 en tanicitos

La inhibición de Cx43 en tanicitos afectó la proliferación de tanicitos inducida por FGF2 *in vivo* e *in vitro*, sugiriendo la participación de ambas proteínas en una vía común. En células de glioma C6 (De Vuyst *et al.* 2007) y Hela (Schalper *et al.* 2008) transfectadas con Cx43, así como en astrocitos espinales (Garre *et al.* 2010), FGF1 o FGF2 induce una apertura transitoria de los hemicanales conformados por Cx43, por donde es liberado el ATP. Los ensayos de incorporación de etidio por tanicitos en cultivo realizados en este trabajo, demostraron que FGF2 induce la apertura de hemicanales conformados por Cx43 (Fig. 27, pasos 1-2), los que en parte son sensibles a Gap27, sugiriendo que esta conexina es primariamente responsable de la captación. No obstante, no se puede descartar la participación de otras conexinas (como Cx45, altamente expresada en cultivo de tanicitos) y panexinas (especialmente panx1 y panx2), que permiten el flujo indistinto de moléculas entre el medio intra con el extracelular. La apertura de HCs-Cx43 inducida por FGF2 en tanicitos llevó a la liberación de 6.3 veces más

ATP en comparación al control (Fig. 27, paso 3). Si bien estos valores se encuentran muy por debajo de alrededor de las 45 veces que aumenta la liberación del nucleótido tras su inducción con 10 mM de glucosa en tanicitos (Orellana *et al.* 2012), es importante considerar el tiempo de exposición a los inductores requerido para alcanzar las concentraciones medidas (1 minuto vs 7 horas en presencia de glucosa y FGF2 glucosa, respectivamente). La salida de ATP fue significativa, pero parcialmente inhibida por Gap27, sugiriendo que además de HCs-Cx43, otras vías pudieran estar involucradas. Al respecto, se sabe que la permeabilización de ATP inducida tras la activación de FGFRs puede deberse a: (i) su liberación vesicular (Fig. 27), (ii) activación de los receptores P2X7, los que estimulan a su vez, la apertura de canales conformados por Panx1 y (iii) HCs-Cx43 (Garre *et al.* 2010). Sin embargo, Panx1 no es responsable de la liberación de ATP tras la administración de 10 mM de glucosa en tanicitos (Orellana *et al.* 2012).

FGF2 favoreció la configuración abierta de los HCs-Cx43 en tanicitos, evaluada mediante ensayos de incorporación de etidio además de liberación de ATP. Evidencias previas en células Hela transfectadas con Cx43 muestran que FGF1 induce un incremento en el estado de apertura de los HCs y cambios en su distribución, movilizándose hacia la membrana celular, sin variaciones consistentes en la expresión de la proteína (De Vuyst *et al.* 2007; Schalper *et al.* 2008). En tanicitos, la inducción con 10 mM de glucosa aumentó el flujo de corriente a través de HCs-Cx43, pero no afectó los niveles de Cx43 en la superficie celular (Orellana *et al.* 2012). Las modificaciones señaladas son

atribuibles a la extensa probabilidad de fosforilación de la porción C-terminal de Cx43 por diversas quinasas, incluida MAPK, lo que subyace a la regulación de su apertura, distribución y degradación (Pogoda *et al.* 2016). Nuestro trabajo demostró que 7 horas de exposición a FGF2 dobló la expresión de Cx43 en tanicitos, suceso que pudo deberse a mecanismos moleculares que subyacen a la relación inversa entre expresión de esta conexina y la fosforilación de ERK1/2 a lo largo del tiempo de tratamiento; a medida que aumenta la fosforilación de la quinasa, disminuye la expresión de la conexina. Se conoce la participación de ERK1/2 en la regulación de Cx43 en células endoteliales (Zhao *et al.* 2011), pero los estudios se contraponen a los nuestros en cuanto a la dependencia directa entre ambas proteínas (Arshad *et al.* 2018). El mecanismo molecular por el cual FGF2 regula la expresión y apertura de Cx43 hacia el medio extracelular en tanicitos requiere de futuros estudios.

La liberación de ATP puede ejercer efectos de largo plazo como proliferación, diferenciación, migración y apoptosis en variados tipos celulares, especialmente en astrocitos (Neary *et al.* 1998) y PNs embrionarias (Weissman *et al.* 2004). En la presente tesis, se demostró que tanicitos en cultivo aumentaron su división celular cuando fueron expuestos a concentraciones de ATP de 10 y 50 μM (Fig. 27, paso 5), no teniendo efectos significativos concentraciones superiores a 100 μM . La importancia de la dosis-respuesta coincide con estudios en astrocitos (Neary *et al.* 2008) y PNs de la ZSV adulta (Mishra *et al.* 2006), donde ~30-50 μM de este nucleótido potencian la proliferación inducida por FGF2, mientras que 300 y 1000 μM la inhiben (Neary *et al.* 2008). Bajas y altas

concentraciones de ATP activan receptores P2Y y P2X, respectivamente, desencadenando efectos opuestos en la célula; mientras P2Y promueve la síntesis de ADN, P2X7 induce el arresto del ciclo celular de astrocitos en un estado no-proliferativo (Neary *et al.* 2008). Por otro lado, la expresión de P2X4 (un receptor ionotrópico de ATP) hipotalámico está limitada a neuronas orexigénicas NPY y tanicitos (Xu *et al.* 2016). La función de este receptor en neuronas NPY, una vez activado por ATP, es facilitar la liberación de GABA desde el terminal presináptico sobre los dos blancos postsinápticos; neuronas POMC del ARC y neuronas del núcleo paraventricular (Xu *et al.* 2016). La funcionalidad de P2X4 en tanicitos está inexplorada, a pesar que su activa señalización purinérgica (por ejemplo, en presencia de glucosa) es conocida (Frayling *et al.* 2011b). Es factible que la liberación de ATP mediada por FGF2 en tanicitos tenga un impacto no tan solo autocrino/proliferativo a través de los receptores P2Y1, sino también paracrinamente activando neuronas NPY a través de P2X4 (Fig. 27, paso 4b y 5b).

Los ocho subtipos de receptores P2Y pueden ser activados por ATP, ADP, UTP, UDP y nucleosidos, y están acoplados a diferentes cascadas de señalización (Zimmermann 2006). La presencia de enzimas ectonucleotidasas, cuyo sitio catalítico se encuentra enfrentando el exterior celular, controla la funcionalidad de los nucleótidos extracelulares. Específicamente, la enzima nucleósido trifosfato difosfohidrolasa 2 (ENTPDasa2) es altamente expresada por PNs de la ZSV y ZSG adulta, y cataliza la hidrólisis de nucleósidos trifosfato, transformándolos en di y subsecuentemente, monofosfato (Gampe *et al.* 2015; Mishra *et al.* 2006). Nuestros estudios de ARNseq de tanicitos en cultivo indicaron que los transcritos

de ENTPDasa2 están altamente representados, sugiriendo que la proliferación observada tras su exposición a ATP pudo ser consecuencia de la interacción de las moléculas que resultan de su degradación (ADP, AMP y adenosina) con los receptores P2Y_{1,2,4,11,12,13} y P1 (Zimmermann 2006). Para sortear la inespecificidad de las posibles interacciones, se recurrió al uso de un análogo no hidrolizable de ATP, ATP γ S y un inhibidor específico de P2Y₁, MRS2179. 10 mM de ATP γ S fue suficiente para inducir un aumento de la incorporación de BrdU por tanicitos comparado con el control, la cual fue sensible a MRS2179, insinuando que la hidrólisis de ATP por ectonucleotidasas no fue indispensable para alcanzar el efecto proliferativo, posiblemente a través del receptor P2Y₁ (Fig. 27, paso 4a). No obstante, debido a que la cuantificación de la BrdU incorporada a 10 mM de ATP fue levemente mayor que a la misma concentración de ATP γ S, no es posible descartar la participación de ADP y adenosina activando otros receptores purinérgicos.

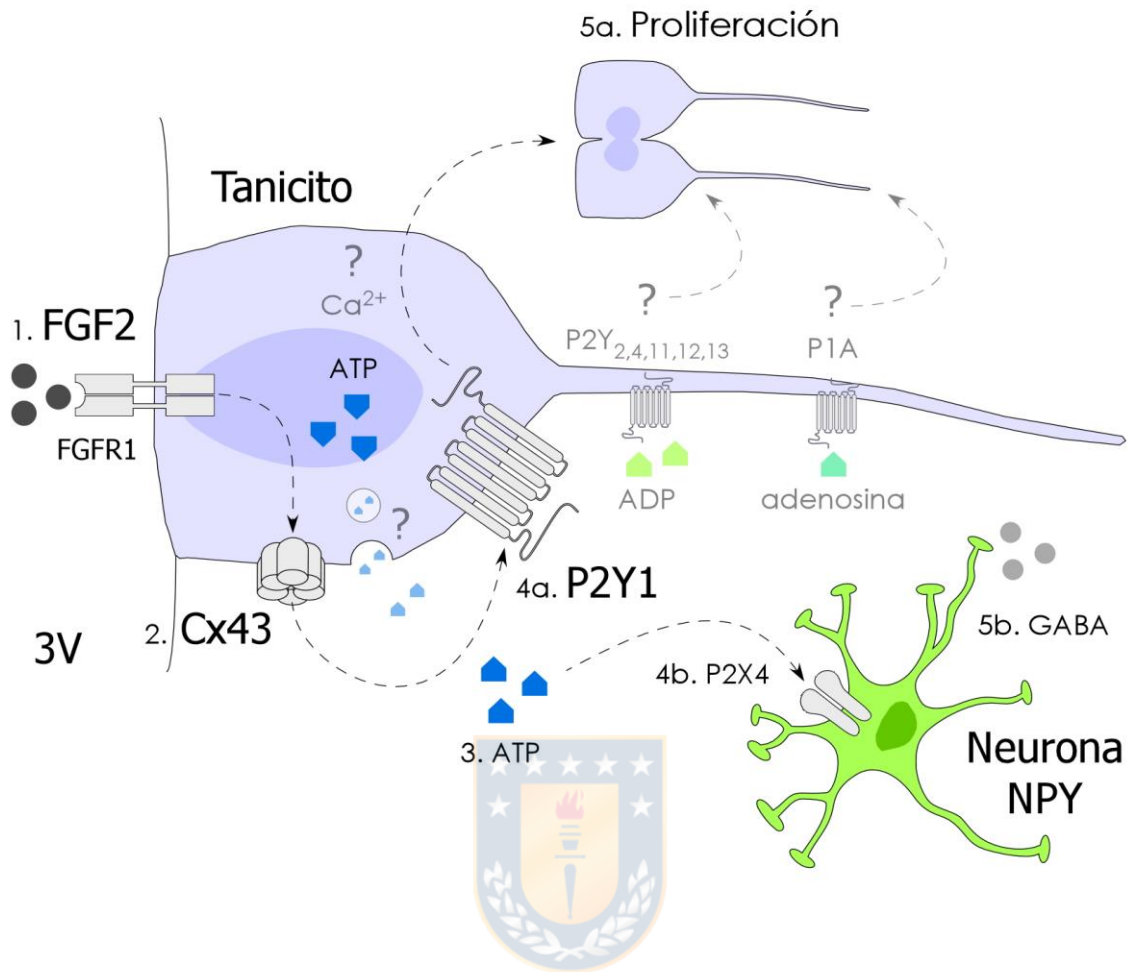


Figura 27. Modelo propuesto.

Tanicitos en cultivo expuestos por 7 horas a FGF2 (1) aumentan la probabilidad de apertura de HCs-Cx43 (2), por donde es liberado el ATP al medio extracelular (3). El ATP extracelular actúa como señal autocrina activando receptores P2Y1 (4a) y promoviendo la proliferación celular (5a), posiblemente, a través de ondas de calcio. La potencial presencia de ectonucleotidasas llevaría a cabo la hidrólisis de ATP a ADP y finalmente, a adenosina; productos que también pueden promover la proliferación a través de los receptores purinérgicos P2Y_{2,4,11,12,13} y P1A. El ATP extracelular puede, además, impactar directamente a las neuronas del ARC, NPY, a través de receptores P2X4 (4b) y promover la liberación de GABA (5b) (Xu *et al.* 2016).

Nuestros datos coinciden con los otorgados por la literatura para otras PNs, en los que el ATP se moviliza hacia el exterior celular a través de canales conformados por conexina 43 e interacciona con receptores purinérgicos. La inhibición de al menos una de estas dos vías afectó la proliferación celular en tanicitos.

Rol de Cx43 en la red de acoplamiento

Las uniones comunicantes están conformadas por dos hemicanales, cada uno contribuido por las células que comparten esta comunicación. Estos canales son de alta conductancia y permiten el traspaso de moléculas paracrinas como ATP, NAD, glutamato y prostaglandinas (Schalper *et al.* 2008). Los resultados obtenidos a partir de la inyección de *Lucifer Yellow* a una célula individual indicaron que los tanicitos están acoplados *in vitro*, conformando grupos de alrededor de 9 células comunicadas bajo condiciones normales. No obstante, 7 horas de tratamiento con FGF2 indujo una disminución evidente en el número de células que conformaron la red acoplada, lo que sugiere una regulación opuesta entre hemicanales y uniones comunicantes en respuesta a FGF2. Al respecto, se sabe que los lipopolisacáridos y FGF2 gatillan la producción de ácido araquidónico, molécula que inhibe las uniones comunicantes y estimula la apertura de hemicanales y liberación de ATP en algunas líneas celulares (De Vuyst *et al.* 2007). De todos modos, las conexinas responsables del acoplamiento de tanicitos *in vitro* e *in vivo* no se conocían hasta este trabajo de tesis.

In vivo, los tanicitos son células tipo glía radial que pueden ejercer un rol como “porteros”, regulando el acceso parenquimal y la disponibilidad de hormonas y nutrientes (Balland *et al.* 2014; Collden *et al.* 2015; Langlet *et al.* 2013a), pero también como PNs del hipotálamo adulto (Robins *et al.* 2013; Haan *et al.* 2013; Jourdon *et al.* 2016; Lee *et al.* 2012). En el presente trabajo, los datos transcripcionales, RT-PCR en tiempo real y ARN seq, mostraron que Cx43 fue la conexina más expresada en el hipotálamo. Es importante notar que Cx45, Panx1 y Panx2 (los últimos dos siendo homólogos de conexinas que no forman uniones comunicantes) también son robustamente expresados en tanicitos. A pesar de que los niveles transcripcionales de Cx43 fueron alrededor de mil veces más abundantes que Cx26 y Cx30 en cultivos enriquecidos de tanicitos, la diferencia es menor en los extractos hipotalámicos totales, probablemente debido a la presencia de otros tipos celulares. Por ejemplo, los astrocitos del hipocampo y del neocórtex forman uniones comunicantes a través de Cx30 y Cx43, mientras que los oligodendrocitos lo hacen mediante Cx32 y Cx47 (Griemsmann *et al.* 2015) (Fig. 28). No obstante, en el tálamo, la mayoría de las uniones comunicantes entre astrocitos están conformadas mayoritariamente de Cx30 en vez de Cx43, sugiriendo que la constitución de las uniones comunicantes varía entre las distintas regiones del cerebro y subpoblaciones celulares. En el hipotálamo murino, ensayos inmunohistoquímicos mostraron una clara señal para Cx43 en las paredes del 3V y una inmunorreactividad tenue en piso del receso infundibular, donde los β -tanicitos contactan la EM. Como diferentes patrones de expresión de mRNA fueron observados entre los subtipos de tanicitos por RNAseq (Campbell *et al.* 2017; Chen *et al.* 2017), es posible que Cx43 conforme la mayoría de las

uniones comunicantes en α -tanicitos, mientras que otras conexinas participen en las uniones comunicantes de β -tanicitos, entre las cuales Cx45 podría estar involucrada. Esta sugerencia estaría de acuerdo con nuestros datos de ARNseq.

Utilizando ratones carentes genéticamente de Cx30 y Cx43, confirmamos que el acoplamiento entre α -tanicitos y células gliales localizadas en el parénquima era dependiente de Cx43 (Fig. 28). Es importante notar que la ausencia de Cx43 previno la comunicación entre los tanicitos y células parenquimales. Sin embargo, no eliminó completamente la capacidad de formar canales entre los mismos α -tanicitos, ya que en algunas rebanadas notamos un acoplamiento residual. Una posibilidad es que, en la línea germinal, algunos tanicitos deficientes regularon la expresión de otras conexinas para compensar la falta de Cx43. Por ejemplo, Cx45, que también estuvo altamente expresada en tanicitos *in vitro*, pudo proporcionar cierta redundancia en este contexto.

Luego evaluamos si las células acopladas en el parénquima tenían un fenotipo glial. Para facilitar la co-localización de biocitina en diferentes tipos de células, utilizamos la línea de ratones transgénicos hGFAP-EGFP e identificamos que casi la mitad de las células parenquimatosas acopladas a α -tanicitos fueron astrocitos (Fig. 28). Sin embargo, este valor pudo ser subestimado ya que no todos los astrocitos en esta línea son positivos para EGFP (Liebmann *et al.* 2013). No sólo astrocitos sino también oligodendrocitos estuvieron acoplados a los tanicitos (Fig. 28). Si bien, esta es la primera vez que se describe una red de acoplamiento panglial en el hipotálamo, las redes de acoplamiento panglial han sido previamente caracterizadas en otras áreas cerebrales, como el tálamo,

hipocampo, neocórtex (Griemsmann *et al.* 2015; Wasseff & Scherer 2011) y cuerpo calloso (Maglione *et al.* 2010; Meyer *et al.* 2018), las cuales difieren en la proporción de astrocitos/oligodendrocitos e isoformas de las conexinas expresadas (Griemsmann *et al.* 2015). No obstante, el impacto fisiológico de la red de acoplamiento panglial hipotalámica identificada en el presente estudio aún no ha sido aclarado. En el cuerpo calloso por ejemplo, una red panglial recientemente descrita coopera para transferir glucosa y lactato a través de GLUT1 y el transportador de monocarboxilato 1 (MCT1) para mantener el apoyo metabólico a los axones (Meyer *et al.* 2018). Como parte del mecanismo sensor de glucosa, los tanicitos expresan GLUT2 (Garcia *et al.* 2003), MCT1 y MCT4 (Elizondo-Vega *et al.* 2016), cuya inhibición individual *in vivo* fue suficiente para interrumpir la comunicación entre el estado metabólico del organismo y la respuesta de neuronas orexigénicas/anorexigénicas, alterando así el comportamiento alimenticio (Elizondo-Vega *et al.* 2016; Barahona *et al.* 2018). Se desconoce si la red panglial descubierta aquí es un camino adicional para transmitir señales (originadas desde el LCR o capilares fenestrados de la EM) a neuronas de núcleos adyacentes. Las moléculas transmitidas podrían ser metabólicas, como glucosa y lactato, o de señalización, como ATP (Fig. 28). Además, la red acoplada de tanicitos y astrocitos podría funcionar como un sincicio glial para coordinar y amplificar la información proveniente de LCR (a través de tanicitos) y circulación periférica (a través de astrocitos), transmitiendo así una respuesta de consenso. Esto puede ayudar a compensar las limitaciones estructurales impuestas por la barrera hematoencefálica, ya que se ha informado que la barrera estructural formada por uniones ocluyentes de β -tanicitos entre el LCR y EM puede ser

modificada por el estado metabólico del organismo (Langlet *et al.* 2013a), siendo probable que las condiciones metabólicas también afecten la extensión de la red acoplada. De hecho, los cambios en el estado metabólico como el ayuno alteraron la expresión de Cx43 hipotalámica mediobasal, pero no los niveles de Cx30 (Allard *et al.* 2014). La inhibición transitoria de Cx43 en el hipotálamo mediobasal alteró la insulinemia en respuesta a inyecciones intracarótideas de glucosa (Allard *et al.* 2014). Este hecho ejemplifica el requerimiento de la conexina para la detección hipotalámica de glucosa. Estudios previos encontraron que Lucifer Yellow pudo ser disperso fácilmente por uniones comunicantes a α y β -tanicitos, aunque estos estudios no detectaron un acoplamiento panglial (Jarvis & Andrew 1988) y en cambio, mencionaron acoplamiento de tanicitos a axones neuronales hipofisiotrópicos (Szilvasy-Szabo *et al.* 2017). Los resultados obtenidos en este estudio no pueden excluir la posibilidad de que la red acoplada se extienda más que a los astrocitos y oligodendrocitos, pero el posible acoplamiento a otros tipos de células permanece por dilucidar.

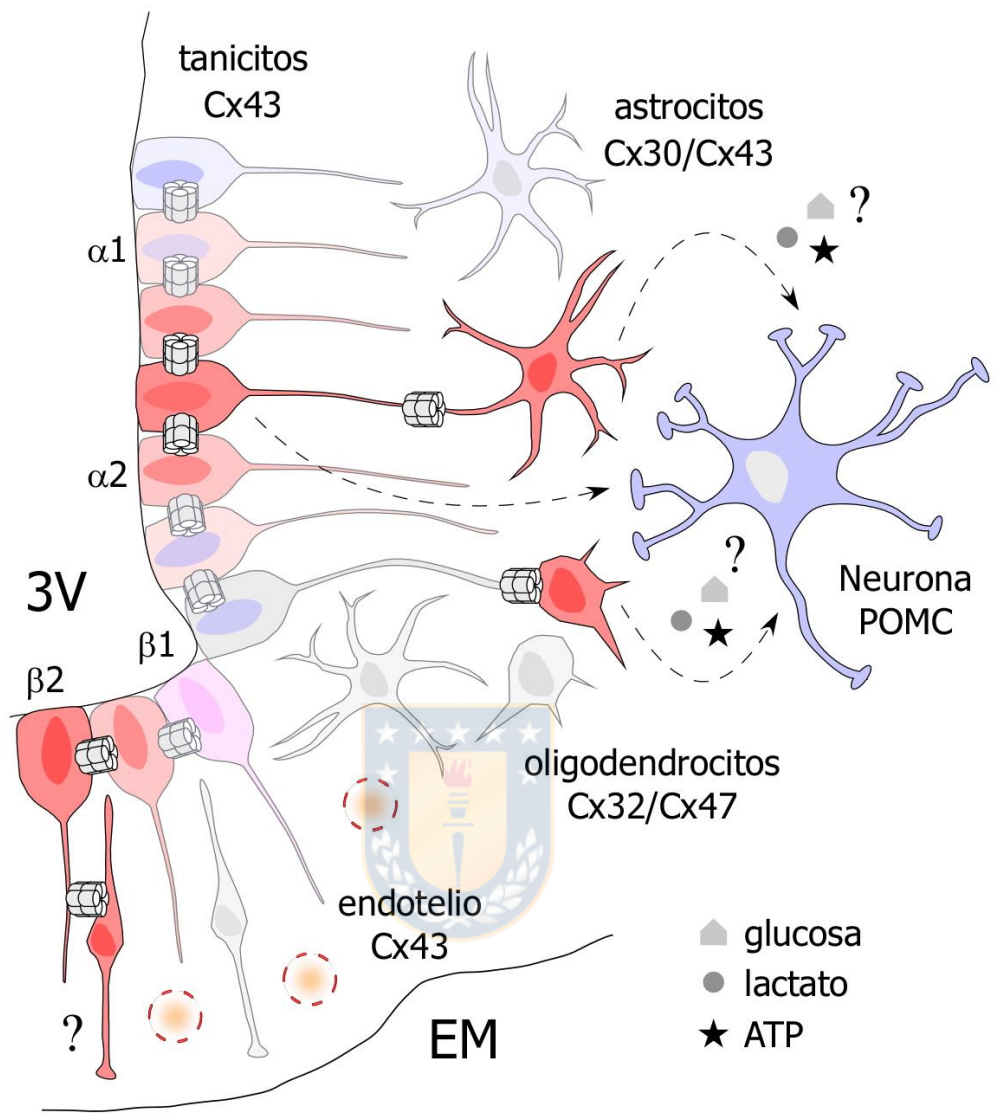


Figura 28. Red de acoplamiento establecida por los tanicitos.

Los tanicitos de la pared lateral ($\alpha 12$ y $\beta 1$) están robustamente acoplados entre sí y con algunos astrocitos y oligodendrocitos parenquimales (mostrados en rojo) a través de uniones comunicantes conformadas de Cx43. Las posibles conexinas aportadas por los astrocitos y oligodendrocitos en la red de acoplamiento panglial son Cx30/Cx43 y Cx32/Cx47, respectivamente. Los tanicitos del piso ventricular ($\beta 2$) también están conectados entre sí y con células de la EM a través de uniones comunicantes. No obstante, el fenotipo de estas células parenquimales no fue dilucidado. La red panglial podría servir para amplificar señales metabólicas originadas en el LCR o circulación periférica, modulando la actividad de neuronas del ARC (como POMC) a través de moléculas como glucosa, lactato y/o ATP, entre otras. Estudios futuros podrían considerar evaluar el acoplamiento entre tanicitos y microglía y/o células endoteliales, las cuales también expresan Cx43. 3V, tercer ventrículo. EM, eminencia media.

En el estudio previo, la inadvertencia de las células parenquimatosas acopladas a los tanicitos pudo deberse a la aproximación experimental; aunque todas las conexinas son permeables a pequeñas moléculas, *Lucifer Yellow* y biocitina (los dos marcadores más utilizados para medir el acoplamiento) difieren en su capacidad de permear las uniones comunicantes. Por ejemplo, las cargas positivas de la neurobiotina le permiten pasar a través de uniones comunicantes formadas de Cx30, mientras que las cargas negativas de *Lucifer Yellow* se lo impiden (Yum *et al.* 2007).

Todas las células analizadas en el presente estudio presentaron patrones de corriente pasivos cuando se aplicó cambios de- e hiperpolarizantes en el voltaje. La ausencia genética de las conexinas o la inhibición farmacológica del acoplamiento por uniones comunicantes se asociaron a un drástico incremento en

la resistencia de membrana, confirmando descubrimientos previos (Russo *et al.* 2008; Wallraff *et al.* 2006; Blomstrand *et al.* 2004). Curiosamente, el tratamiento con CBX aumentó la resistencia de entrada de las membranas de tancitos en 2 veces, similar a lo que se ha observado en los astrocitos del hipocampo (Blomstrand *et al.* 2004). Este aumento fue menor comparado con los cambios observados entre las células de tipo silvestre y ratones dKO, lo que podría indicar un bloqueo farmacológico mediado por CBX insuficiente. Alternativamente, es posible que la carencia permanente del gen de Cx43 en el ratón dKO conllevara a alteraciones compensatorias en la expresión de otros canales de membrana.

En ratones adultos de tipo silvestre, el análisis de incorporación de BrdU mostró pocos sino ningún tancito proliferativo, lo cual se correlaciona con la baja tasa de renovación celular reportada para estas PNs adultas (Hendrickson *et al.* 2018) o con la baja tasa de neurogénesis hipotalámica comparada con otros nichos neurogénicos (Lledo *et al.* 2006; Migaud *et al.* 2010). Por otra parte, el protocolo usado aquí para detectar el estado proliferativo de las células incluye una semana de descanso después de las inyecciones de BrdU, dejando tiempo suficiente a las precursoras neuronales para migrar hacia el parénquima. A pesar de que el fenotipo de las células no fue dilucidado, es presumible que la ausencia de Cx43 afectara no sólo el acoplamiento de tancitos sino también su capacidad de auto-renovación, entre otras funciones celulares. Tal como se ha demostrado en la neurogénesis hipocampal, la ausencia de Cx43 perjudica la incorporación de BrdU por PNs (Kunze *et al.* 2009). Finalmente, el rol fisiológico de las uniones comunicantes conformadas por Cx43 entre tancitos y células gliales localizadas

cerca del ARC pueden incluir la regulación del ciclo celular de las PNs a través de la transmisión de las ondas de calcio (Weissman *et al.* 2004; Frayling *et al.* 2011b), transmisión de señales metabólicas a neuronas hipotalámicas, amortiguación de iones y regulación homeostática de metabolitos presentes en el parenquima del ARC, LCR y sangre periférica.

Se concluye que la proliferación específicamente de β -tanicitos es sensible a la concentración de glucosa en la sangre y que el mecanismo que subyace a este fenómeno pudiera estar relacionado directa o indirectamente a la señalización purinérgica mediada por hemicanales-Cx43. Por otro lado, Cx43 juega un rol crucial en la proliferación y comunicación de los tanicitos, ya sea sirviendo como ruta para la liberación de ATP y la activación de la señalización purinérgica tras la inducción con FGF2, o como canales comunicantes que permiten la formación de una red de acoplamiento panglial que se extiende hasta el parénquima. Las futuras proyecciones de este trabajo pueden incluir: (i) dilucidar el/los mecanismo/s explícito/s que asocian la detección de cambios en la dieta por tanicitos con su división celular, (ii) estudiar otros fenotipos celulares que pudieran formar parte de la red de acoplamiento, como por ejemplo, microglías y células endoteliales y cómo esta red de acoplamiento pudiera ser modulada por oscilaciones en el estado metabólico del organismo y (iii) evaluar cambios en el comportamiento alimenticio tras la inhibición aguda de Cx43 específicamente en los tanicitos.

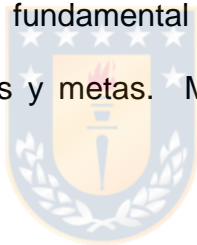
VI. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por los proyectos FONDECYT 1140677 y 1180871 a cargo de la Dra. María de los Ángeles García Robles y por la Beca de Doctorado Nacional CONICYT 21150430.

Mis agradecimientos se extienden inicialmente al Departamento de Biología Celular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción, al Director del Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas Área Biología Celular y Molecular, Dr. Juan Pablo Henríquez, y a los profesores que hicieron posible la realización de este proyecto. En primera instancia me gustaría agradecer a la profesora María de los Ángeles por su constante orientación tanto en el área científica como cotidiana, por su comprensión, apoyo y confianza en mis ideas. También a la profesora Teresa Caprile por las discusiones científicas, ordenar mis ideas, orientarme en momentos de incertidumbre y siempre promover mi vocación científica; la labor de ambas se extiende más allá de lo académico. Adicionalmente, agradezco a los colaboradores Juan Carlos Sáez y Christian Steinhäuser y sus respectivos alumnos, por acogerme gratamente en sus laboratorios, dedicar tiempo en instruirme y recursos en mis experimentos. A cada uno de mis compañeros y amigos de laboratorio, especialmente a Sergio López, Magdiel Salgado y Patricio Órdenes, y a Don Jorge, que estuvieron día a día durante todo mi proceso de formación, trabajando en equipo, instruyéndome y alegrando la rutina; sin duda nada de mi trabajo hubiese sido posible sin cada uno de ellos. Agradezco a mis amigos, en especial a Hans Besser, Francisca

Fernández, Natalia Saldivia, Francisca Espinoza y Francisco Fuentes, los que siempre estuvieron a mi lado, más de alguna vez salvaron mis experimentos, fueron un gran soporte y me otorgaron gratos momentos de distracción.

Por último, quisiera agradecer a mi familia y destacar el apoyo incondicional de mi prima Andrea Beyer, quien ha sido mi compañera y pilar fundamental en mi carrera como científica, ayudándome en la teoría y práctica. Valoro profundamente su experiencia y consecuencia. A quien admiro considerablemente, mi compañero y amigo Carlos Farkas, por compartirme mucho más que saberes científicos, motivarme en los momentos de extenuación, regalarme sonrisas y el inicio de una vida juntos. Finalmente, dedico este trabajo a mis padres y hermana; las tres personas que conforman el pilar fundamental de mi vida, disipan mis penas y derrotas y consolidan mis sueños y metas. Mis logros son suyos, gracias por tanto.



VII. BIBLIOGRAFÍA

- Acarin, L., Vela, J. M., Gonzalez, B. and Castellano, B. (1994) Demonstration of poly-N-acetyl lactosamine residues in amoeboid and ramified microglial cells in rat brain by tomato lectin binding. *J Histochem Cytochem* **42**, 1033-1041.
- Altman, J. and Das, G. D. (1965) Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* **124**, 319-335.
- Allard, C., Carneiro, L., Grall, S. et al. (2014) Hypothalamic astroglial connexins are required for brain glucose sensing-induced insulin secretion. *J Cereb Blood Flow Metab* **34**, 339-346.
- Arshad, M., Conzelmann, C., Riaz, M. A., Noll, T. and Gunduz, D. (2018) Inhibition of Cx43 attenuates ERK1/2 activation, enhances the expression of Cav1 and suppresses cell proliferation. *Int J Mol Med* **42**, 2811-2818.
- Axelsen, L. N., Calloe, K., Holstein-Rathlou, N. H. and Nielsen, M. S. (2013) Managing the complexity of communication: regulation of gap junctions by post-translational modification. *Front Pharmacol* **4**, 130.
- Balland, E., Dam, J., Langlet, F. et al. (2014) Hypothalamic tanycytes are an ERK-gated conduit for leptin into the brain. *Cell Metab* **19**, 293-301.
- Bao, X., Reuss, L. and Altenberg, G. A. (2004) Regulation of purified and reconstituted connexin 43 hemichannels by protein kinase C-mediated phosphorylation of Serine 368. *J Biol Chem* **279**, 20058-20066.
- Barahona, M. J., Llanos, P., Recabal, A. et al. (2018) Glial hypothalamic inhibition of GLUT2 expression alters satiety, impacting eating behavior. *Glia* **66**, 592-605.
- Batailler, M., Droguerre, M., Baroncini, M., Fontaine, C., Prevot, V. and Migaud, M. (2014) DCX-expressing cells in the vicinity of the hypothalamic neurogenic niche: a comparative study between mouse, sheep, and human tissues. *J Comp Neurol* **522**, 1966-1985.
- Batra, N., Riquelme, M. A., Burra, S., Kar, R., Gu, S. and Jiang, J. X. (2014) Direct regulation of osteocytic connexin 43 hemichannels through AKT kinase activated by mechanical stimulation. *J Biol Chem* **289**, 10582-10591.
- Bauer, S., Hay, M., Amilhon, B., Jean, A. and Moyses, E. (2005) In vivo neurogenesis in the dorsal vagal complex of the adult rat brainstem. *Neuroscience* **130**, 75-90.
- Benford, H., Bolborea, M., Pollatzek, E., Lossow, K., Hermans-Borgmeyer, I., Liu, B., Meyerhof, W., Kasparov, S. and Dale, N. (2017) A sweet taste receptor-dependent mechanism of glucosensing in hypothalamic tanycytes. *Glia* **65**, 773-789.
- Berridge, M. J. (1995) Calcium signalling and cell proliferation. *Bioessays* **17**, 491-500.
- Bittman, K., Owens, D. F., Kriegstein, A. R. and LoTurco, J. J. (1997) Cell coupling and uncoupling in the ventricular zone of developing neocortex. *J Neurosci* **17**, 7037-7044.
- Bittman, K. S. and LoTurco, J. J. (1999) Differential regulation of connexin 26 and 43 in murine neocortical precursors. *Cereb Cortex* **9**, 188-195.
- Bless, E. P., Yang, J., Acharya, K. D., Nettles, S. A., Vassoler, F. M., Byrnes, E. M. and Tetel, M. J. (2016) Adult Neurogenesis in the Female Mouse

- Hypothalamus: Estradiol and High-Fat Diet Alter the Generation of Newborn Neurons Expressing Estrogen Receptor alpha. *eNeuro* **3**.
- Blomstrand, F., Venance, L., Siren, A. L., Ezan, P., Hanse, E., Glowinski, J., Ehrenreich, H. and Giaume, C. (2004) Endothelins regulate astrocyte gap junctions in rat hippocampal slices. *Eur J Neurosci* **19**, 1005-1015.
- Bolborea, M. and Dale, N. (2013) Hypothalamic tanycytes: potential roles in the control of feeding and energy balance. *Trends Neurosci* **36**, 91-100.
- Boldrini, M., Fulmore, C. A., Tartt, A. N. et al. (2018) Human Hippocampal Neurogenesis Persists throughout Aging. *Cell Stem Cell* **22**, 589-599 e585.
- Bonfanti, L., Olive, S., Poulain, D. A. and Theodosis, D. T. (1992) Mapping of the distribution of polysialylated neural cell adhesion molecule throughout the central nervous system of the adult rat: an immunohistochemical study. *Neuroscience* **49**, 419-436.
- Burnstock, G. (2007) Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci* **64**, 1471-1483.
- Burnstock, G. and Kennedy, C. (1985) Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *Gen Pharmacol* **16**, 433-440.
- Campbell, J. N., Macosko, E. Z., Fenselau, H. et al. (2017) A molecular census of arcuate hypothalamus and median eminence cell types. *Nat Neurosci* **20**, 484-496.
- Colden, G., Balland, E., Parkash, J., Caron, E., Langlet, F., Prevot, V. and Bouret, S. G. (2015) Neonatal overnutrition causes early alterations in the central response to peripheral ghrelin. *Mol Metab* **4**, 15-24.
- Cortes-Campos, C., Elizondo, R., Llanos, P., Uranga, R. M., Nualart, F. and Garcia, M. A. (2011) MCT expression and lactate influx/efflux in tanycytes involved in glia-neuron metabolic interaction. *PLoS One* **6**, e16411.
- Cotrina, M. L., Lin, J. H., Alves-Rodrigues, A., Liu, S., Li, J., Azmi-Ghadimi, H., Kang, J., Naus, C. C. and Nedergaard, M. (1998) Connexins regulate calcium signaling by controlling ATP release. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 15735-15740.
- Czupryn, A., Zhou, Y. D., Chen, X., McNay, D., Anderson, M. P., Flier, J. S. and Macklis, J. D. (2011) Transplanted hypothalamic neurons restore leptin signaling and ameliorate obesity in db/db mice. *Science* **334**, 1133-1137.
- Chaker, Z., George, C., Petrovska, M., Caron, J. B., Lacube, P., Caille, I. and Holzenberger, M. (2016) Hypothalamic neurogenesis persists in the aging brain and is controlled by energy-sensing IGF-I pathway. *Neurobiol Aging* **41**, 64-72.
- Chang, G. Q., Gaysinskaya, V., Karatayev, O. and Leibowitz, S. F. (2008) Maternal high-fat diet and fetal programming: increased proliferation of hypothalamic peptide-producing neurons that increase risk for overeating and obesity. *J Neurosci* **28**, 12107-12119.
- Chen, R., Wu, X., Jiang, L. and Zhang, Y. (2017) Single-Cell RNA-Seq Reveals Hypothalamic Cell Diversity. *Cell Rep* **18**, 3227-3241.
- Cheng, M. F. (2013) Hypothalamic neurogenesis in the adult brain. *Front Neuroendocrinol* **34**, 167-178.

- Choubey, L., Collette, J. C. and Smith, K. M. (2017) Quantitative assessment of fibroblast growth factor receptor 1 expression in neurons and glia. *PeerJ* **5**, e3173.
- De Vuyst, E., Decrock, E., De Bock, M., Yamasaki, H., Naus, C. C., Evans, W. H. and Leybaert, L. (2007) Connexin hemichannels and gap junction channels are differentially influenced by lipopolysaccharide and basic fibroblast growth factor. *Mol Biol Cell* **18**, 34-46.
- Dermietzel, R., Hwang, T. K. and Spray, D. S. (1990) The gap junction family: structure, function and chemistry. *Anat Embryol (Berl)* **182**, 517-528.
- Doetsch, F., Caille, I., Lim, D. A., Garcia-Verdugo, J. M. and Alvarez-Buylla, A. (1999) Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* **97**, 703-716.
- Elizondo-Vega, R., Cortes-Campos, C., Barahona, M. J., Carril, C., Ordenes, P., Salgado, M., Oyarce, K. and Garcia-Robles, M. L. (2016) Inhibition of hypothalamic MCT1 expression increases food intake and alters orexigenic and anorexigenic neuropeptide expression. *Sci Rep* **6**, 33606.
- Elizondo-Vega, R., Cortes-Campos, C., Barahona, M. J., Oyarce, K. A., Carril, C. A. and Garcia-Robles, M. A. (2015) The role of tanycytes in hypothalamic glucosensing. *J Cell Mol Med* **19**, 1471-1482.
- Eriksson, P. S., Perfilieva, E., Bjork-Eriksson, T., Alborn, A. M., Nordborg, C., Peterson, D. A. and Gage, F. H. (1998) Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* **4**, 1313-1317.
- Flament-Durand, J. and Brion, J. P. (1985) Tanycytes: morphology and functions: a review. *Int Rev Cytol* **96**, 121-155.
- Frayling, C., Britton, R. and Dale, N. (2011a) ATP-mediated glucosensing by hypothalamic tanycytes. *J Physiol* **589**, 2275-2286.
- Frayling, C., Britton, R. and Dale, N. (2011b) ATP-mediated glucosensing by hypothalamic tanycytes. *The Journal of Physiology* **589**, 2275-2286.
- Freitas, A. S., Xavier, A. L., Furtado, C. M., Hedin-Pereira, C., Froes, M. M. and Menezes, J. R. (2012) Dye coupling and connexin expression by cortical radial glia in the early postnatal subventricular zone. *Dev Neurobiol* **72**, 1482-1497.
- Gampe, K., Stefani, J., Hammer, K. et al. (2015) NTPDase2 and purinergic signaling control progenitor cell proliferation in neurogenic niches of the adult mouse brain. *Stem Cells* **33**, 253-264.
- Garcia, M., Millan, C., Balmaceda-Aguilera, C. et al. (2003) Hypothalamic ependymal-glia cells express the glucose transporter GLUT2, a protein involved in glucose sensing. *J Neurochem* **86**, 709-724.
- Garre, J. M., Retamal, M. A., Cassina, P., Barbeito, L., Bukauskas, F. F., Saez, J. C., Bennett, M. V. and Abudara, V. (2010) FGF-1 induces ATP release from spinal astrocytes in culture and opens pannexin and connexin hemichannels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 22659-22664.
- Geller, S., Arribat, Y., Netzahualcoyotzi, C., Lagarrigue, S., Carneiro, L., Zhang, L., Amati, F., Lopez-Mejia, I. C. and Pellerin, L. (2019) Tanycytes Regulate Lipid Homeostasis by Sensing Free Fatty Acids and Signaling to Key Hypothalamic Neuronal Populations via FGF21 Secretion. *Cell Metab*.

- Gotz, M. and Barde, Y. A. (2005) Radial glial cells defined and major intermediates between embryonic stem cells and CNS neurons. *Neuron* **46**, 369-372.
- Gouaze, A., Brenachot, X., Rigault, C. et al. (2013) Cerebral cell renewal in adult mice controls the onset of obesity. *PLoS One* **8**, e72029.
- Griemsmann, S., Hoft, S. P., Bedner, P. et al. (2015) Characterization of Panglial Gap Junction Networks in the Thalamus, Neocortex, and Hippocampus Reveals a Unique Population of Glial Cells. *Cereb Cortex* **25**, 3420-3433.
- Haan, N., Goodman, T., Najdi-Samiei, A., Stratford, C. M., Rice, R., El Agha, E., Bellusci, S. and Hajihosseini, M. K. (2013) Fgf10-expressing tanycytes add new neurons to the appetite/energy-balance regulating centers of the postnatal and adult hypothalamus. *J Neurosci* **33**, 6170-6180.
- Hajihosseini, M. K., De Langhe, S., Lana-Elola, E., Morrison, H., Sparshott, N., Kelly, R., Sharpe, J., Rice, D. and Bellusci, S. (2008) Localization and fate of Fgf10-expressing cells in the adult mouse brain implicate Fgf10 in control of neurogenesis. *Mol Cell Neurosci* **37**, 857-868.
- Hendrickson, M. L., Zutshi, I., Wield, A. and Kalil, R. E. (2018) Nestin expression and in vivo proliferative potential of tanycytes and ependymal cells lining the walls of the third ventricle in the adult rat brain. *Eur J Neurosci* **47**, 284-293.
- Hourai, A. and Miyata, S. (2013) Neurogenesis in the circumventricular organs of adult mouse brains. *J Neurosci Res* **91**, 757-770.
- Itoh, N. and Ornitz, D. M. (2004) Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. *Trends Genet* **20**, 563-569.
- Jarvis, C. R. and Andrew, R. D. (1988) Correlated electrophysiology and morphology of the ependyma in rat hypothalamus. *J Neurosci* **8**, 3691-3702.
- Jhaveri, D. J., Tedoldi, A., Hunt, S., Sullivan, R., Watts, N. R., Power, J. M., Bartlett, P. F. and Sah, P. (2018) Evidence for newly generated interneurons in the basolateral amygdala of adult mice. *Mol Psychiatry* **23**, 521-532.
- Jourdon, A., Gresset, A., Spassky, N., Charnay, P., Topilko, P. and Santos, R. (2016) Prss56, a novel marker of adult neurogenesis in the mouse brain. *Brain Struct Funct* **221**, 4411-4427.
- Kaminskas, B., Goodman, T., Hagan, A., Bellusci, S., Ornitz, D. M. and Hajihosseini, M. K. Characterization of endogenous players in Fibroblast Growth Factor-regulated functions of hypothalamic tanycytes and energy-balance nuclei. *Journal of Neuroendocrinology* **0**, e12750.
- Kaminskas, B., Goodman, T., Hagan, A., Bellusci, S., Ornitz, D. M. and Hajihosseini, M. K. (2019) Characterisation of endogenous players in fibroblast growth factor-regulated functions of hypothalamic tanycytes and energy-balance nuclei. *J Neuroendocrinol* **31**, e12750.
- Kano, M., Suga, H., Ishihara, T. et al. (2019) Tanycyte-Like Cells Derived From Mouse Embryonic Stem Culture Show Hypothalamic Neural Stem/Progenitor Cell Functions. *Endocrinology* **160**, 1701-1718.
- Khodosevich, K., Zuccotti, A., Kreuzberg, M. M., Le Magueresse, C., Frank, M., Willecke, K. and Monyer, H. (2012) Connexin45 modulates the proliferation of transit-amplifying precursor cells in the mouse subventricular zone. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 20107-20112.
- Kokoeva, M. V., Yin, H. and Flier, J. S. (2005) Neurogenesis in the hypothalamus of adult mice: potential role in energy balance. *Science* **310**, 679-683.

- Kokoeva, M. V., Yin, H. and Flier, J. S. (2007) Evidence for constitutive neural cell proliferation in the adult murine hypothalamus. *J Comp Neurol* **505**, 209-220.
- Kriegstein, A. and Alvarez-Buylla, A. (2009) The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci* **32**, 149-184.
- Kumar, N. M. and Gilula, N. B. (1996) The gap junction communication channel. *Cell* **84**, 381-388.
- Kunze, A., Congreso, M. R., Hartmann, C. et al. (2009) Connexin expression by radial glia-like cells is required for neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 11336-11341.
- Lacar, B., Young, S. Z., Platel, J. C. and Bordey, A. (2011) Gap junction-mediated calcium waves define communication networks among murine postnatal neural progenitor cells. *Eur J Neurosci* **34**, 1895-1905.
- Langlet, F., Levin, B. E., Luquet, S. et al. (2013a) Tanycytic VEGF-A boosts blood-hypothalamus barrier plasticity and access of metabolic signals to the arcuate nucleus in response to fasting. *Cell Metab* **17**, 607-617.
- Langlet, F., Mullier, A., Bouret, S. G., Prevot, V. and Dehouck, B. (2013b) Tanycyte-like cells form a blood-cerebrospinal fluid barrier in the circumventricular organs of the mouse brain. *J Comp Neurol* **521**, 3389-3405.
- Lee, D. A., Bedont, J. L., Pak, T. et al. (2012) Tanycytes of the hypothalamic median eminence form a diet-responsive neurogenic niche. *Nat Neurosci* **15**, 700-702.
- Lee, D. A. and Blackshaw, S. (2012) Functional implications of hypothalamic neurogenesis in the adult mammalian brain. *Int J Dev Neurosci* **30**, 615-621.
- Lee, D. A., Yoo, S., Pak, T., Salvatierra, J., Velarde, E., Aja, S. and Blackshaw, S. (2014) Dietary and sex-specific factors regulate hypothalamic neurogenesis in young adult mice. *Front Neurosci* **8**, 157.
- Lemes, S. F., de Souza, A. C. P., Payolla, T. B. et al. (2018) Maternal Consumption of High-fat Diet in Mice Alters Hypothalamic Notch Pathway, NPY Cell Population and Food Intake in Offspring. *Neuroscience* **371**, 1-15.
- Li, H., Liu, T. F., Lazrak, A., Peracchia, C., Goldberg, G. S., Lampe, P. D. and Johnson, R. G. (1996) Properties and regulation of gap junctional hemichannels in the plasma membranes of cultured cells. *J Cell Biol* **134**, 1019-1030.
- Li, J., Tang, Y. and Cai, D. (2012) IKKbeta/NF-kappaB disrupts adult hypothalamic neural stem cells to mediate a neurodegenerative mechanism of dietary obesity and pre-diabetes. *Nat Cell Biol* **14**, 999-1012.
- Liebmann, M., Stahr, A., Guenther, M., Witte, O. W. and Frahm, C. (2013) Astrocytic Cx43 and Cx30 differentially modulate adult neurogenesis in mice. *Neurosci Lett* **545**, 40-45.
- Lin, J. H., Takano, T., Arcuino, G., Wang, X., Hu, F., Darzynkiewicz, Z., Nunes, M., Goldman, S. A. and Nedergaard, M. (2007) Purinergic signaling regulates neural progenitor cell expansion and neurogenesis. *Dev Biol* **302**, 356-366.
- LoTurco, J. J., Blanton, M. G. and Kriegstein, A. R. (1991) Initial expression and endogenous activation of NMDA channels in early neocortical development. *J Neurosci* **11**, 792-799.

- Lledo, P. M., Alonso, M. and Grubb, M. S. (2006) Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat Rev Neurosci* **7**, 179-193.
- Ma, D. K., Ponnusamy, K., Song, M. R., Ming, G. L. and Song, H. (2009) Molecular genetic analysis of FGFR1 signalling reveals distinct roles of MAPK and PLCgamma1 activation for self-renewal of adult neural stem cells. *Mol Brain* **2**, 16.
- Maglione, M., Tress, O., Haas, B., Karram, K., Trotter, J., Willecke, K. and Kettenmann, H. (2010) Oligodendrocytes in mouse corpus callosum are coupled via gap junction channels formed by connexin47 and connexin32. *Glia* **58**, 1104-1117.
- Masse, K., Bhamra, S., Eason, R., Dale, N. and Jones, E. A. (2007) Purine-mediated signalling triggers eye development. *Nature* **449**, 1058-1062.
- Mathew, T. C. and Singh, D. N. (1989) Morphology and distribution of tanycytes in the third ventricle of the adult rat. A study using semithin methacrylate sections. *Acta Anat (Basel)* **134**, 319-321.
- Matsuzaki, K., Katakura, M., Hara, T., Li, G., Hashimoto, M. and Shido, O. (2009) Proliferation of neuronal progenitor cells and neuronal differentiation in the hypothalamus are enhanced in heat-acclimated rats. *Pflugers Arch* **458**, 661-673.
- McNay, D. E., Briancon, N., Kokoeva, M. V., Maratos-Flier, E. and Flier, J. S. (2012) Remodeling of the arcuate nucleus energy-balance circuit is inhibited in obese mice. *J Clin Invest* **122**, 142-152.
- Meyer, N., Richter, N., Fan, Z. et al. (2018) Oligodendrocytes in the Mouse Corpus Callosum Maintain Axonal Function by Delivery of Glucose. *Cell Rep* **22**, 2383-2394.
- Migaud, M., Batailler, M., Segura, S., Duittoz, A., Franceschini, I. and Pilon, D. (2010) Emerging new sites for adult neurogenesis in the mammalian brain: a comparative study between the hypothalamus and the classical neurogenic zones. *Eur J Neurosci* **32**, 2042-2052.
- Millan, C., Martinez, F., Cortes-Campos, C. et al. (2010) Glial glucokinase expression in adult and post-natal development of the hypothalamic region. *ASN Neuro* **2**, e00035.
- Miragall, F., Albiez, P., Bartels, H., de Vries, U. and Dermietzel, R. (1997) Expression of the gap junction protein connexin43 in the subependymal layer and the rostral migratory stream of the mouse: evidence for an inverse correlation between intensity of connexin43 expression and cell proliferation activity. *Cell Tissue Res* **287**, 243-253.
- Mishra, S. K., Braun, N., Shukla, V. et al. (2006) Extracellular nucleotide signaling in adult neural stem cells: synergism with growth factor-mediated cellular proliferation. *Development* **133**, 675-684.
- Moraes, J. C., Coope, A., Morari, J. et al. (2009) High-fat diet induces apoptosis of hypothalamic neurons. *PLoS One* **4**, e5045.
- Morita, S., Ukai, S. and Miyata, S. (2013) VEGF-dependent continuous angiogenesis in the median eminence of adult mice. *Eur J Neurosci* **37**, 508-518.
- Nagy, J. I. and Rash, J. E. (2000) Connexins and gap junctions of astrocytes and oligodendrocytes in the CNS. *Brain Res Brain Res Rev* **32**, 29-44.

- Nascimento, L. F., Souza, G. F., Morari, J. et al. (2016) n-3 Fatty Acids Induce Neurogenesis of Predominantly POMC-Expressing Cells in the Hypothalamus. *Diabetes* **65**, 673-686.
- Neary, J. T., Lenz, G., Kang, Y., Rodnight, R. and Avruch, J. (2001) Role of mitogen-activated protein kinase cascades in P2Y receptor-mediated trophic activation of astroglial cells. *Drug Development Research* **53**, 158-165.
- Neary, J. T., McCarthy, M., Kang, Y. and Zuniga, S. (1998) Mitogenic signaling from P1 and P2 purinergic receptors to mitogen-activated protein kinase in human fetal astrocyte cultures. *Neurosci Lett* **242**, 159-162.
- Neary, J. T., Shi, Y. F., Kang, Y. and Tran, M. D. (2008) Opposing effects of P2X(7) and P2Y purine/pyrimidine-preferring receptors on proliferation of astrocytes induced by fibroblast growth factor-2: implications for CNS development, injury, and repair. *J Neurosci Res* **86**, 3096-3105.
- Niwa, A., Nishibori, M., Hamasaki, S., Kobori, T., Liu, K., Wake, H., Mori, S., Yoshino, T. and Takahashi, H. (2016) Voluntary exercise induces neurogenesis in the hypothalamus and ependymal lining of the third ventricle. *Brain Struct Funct* **221**, 1653-1666.
- Nolte, C., Matyash, M., Pivneva, T., Schipke, C. G., Ohlemeyer, C., Hanisch, U. K., Kirchhoff, F. and Kettenmann, H. (2001) GFAP promoter-controlled EGFP-expressing transgenic mice: a tool to visualize astrocytes and astrogliosis in living brain tissue. *Glia* **33**, 72-86.
- Oomura, Y., Sasaki, K., Suzuki, K. et al. (1992) A new brain glucosensor and its physiological significance. *Am J Clin Nutr* **55**, 278S-282S.
- Orellana, J. A., Saez, P. J., Cortes-Campos, C. et al. (2012) Glucose increases intracellular free Ca(2+) in tanycytes via ATP released through connexin 43 hemichannels. *Glia* **60**, 53-68.
- Panchin, Y., Kelmanson, I., Matz, M., Lukyanov, K., Usman, N. and Lukyanov, S. (2000) A ubiquitous family of putative gap junction molecules. *Curr Biol* **10**, R473-474.
- Pellegrino, G., Trubert, C., Terrien, J. et al. (2018) A comparative study of the neural stem cell niche in the adult hypothalamus of human, mouse, rat and gray mouse lemur (*Microcebus murinus*). *J Comp Neurol* **526**, 1419-1443.
- Pencea, V., Bingaman, K. D., Freedman, L. J. and Luskin, M. B. (2001) Neurogenesis in the subventricular zone and rostral migratory stream of the neonatal and adult primate forebrain. *Exp Neurol* **172**, 1-16.
- Penuela, S., Gehi, R. and Laird, D. W. (2013) The biochemistry and function of pannexin channels. *Biochim Biophys Acta* **1828**, 15-22.
- Perez-Martin, M., Cifuentes, M., Grondona, J. M., Lopez-Avalos, M. D., Gomez-Pinedo, U., Garcia-Verdugo, J. M. and Fernandez-Llebrez, P. (2010) IGF-I stimulates neurogenesis in the hypothalamus of adult rats. *Eur J Neurosci* **31**, 1533-1548.
- Pierce, A. A. and Xu, A. W. (2010) De novo neurogenesis in adult hypothalamus as a compensatory mechanism to regulate energy balance. *J Neurosci* **30**, 723-730.
- Pogoda, K., Kameritsch, P., Retamal, M. A. and Vega, J. L. (2016) Regulation of gap junction channels and hemichannels by phosphorylation and redox changes: a revision. *BMC Cell Biol* **17 Suppl 1**, 11.

- Prevot, V. (2002) Glial-neuronal-endothelial interactions are involved in the control of GnRH secretion. *J Neuroendocrinol* **14**, 247-255.
- Prevot, V., Croix, D., Bouret, S., Dutoit, S., Tramu, G., Stefano, G. B. and Beauvillain, J. C. (1999) Definitive evidence for the existence of morphological plasticity in the external zone of the median eminence during the rat estrous cycle: implication of neuro-glio-endothelial interactions in gonadotropin-releasing hormone release. *Neuroscience* **94**, 809-819.
- Rash, B. G., Ackman, J. B. and Rakic, P. (2016) Bidirectional radial Ca²⁺ activity regulates neurogenesis and migration during early cortical column formation. *Sci Adv* **2**, e1501733.
- Recabal, A., Caprile, T. and Garcia-Robles, M. L. A. (2017) Hypothalamic Neurogenesis as an Adaptive Metabolic Mechanism. *Front Neurosci* **11**, 190.
- Robins, S. C., Stewart, I., McNay, D. E. et al. (2013) alpha-Tanycytes of the adult hypothalamic third ventricle include distinct populations of FGF-responsive neural progenitors. *Nat Commun* **4**, 2049.
- Rodriguez, E. M., Blazquez, J. L., Pastor, F. E., Pelaez, B., Pena, P., Peruzzo, B. and Amat, P. (2005) Hypothalamic tanycytes: a key component of brain-endocrine interaction. *Int Rev Cytol* **247**, 89-164.
- Rubini, P., Milosevic, J., Engelhardt, J. et al. (2009) Increase of intracellular Ca²⁺ by adenine and uracil nucleotides in human midbrain-derived neuronal progenitor cells. *Cell Calcium* **45**, 485-498.
- Russo, R. E., Reali, C., Radmilovich, M., Fernandez, A. and Trujillo-Cenoz, O. (2008) Connexin 43 delimits functional domains of neurogenic precursors in the spinal cord. *J Neurosci* **28**, 3298-3309.
- Saez, J. C., Retamal, M. A., Basilio, D., Bukauskas, F. F. and Bennett, M. V. (2005) Connexin-based gap junction hemichannels: gating mechanisms. *Biochim Biophys Acta* **1711**, 215-224.
- Safahani, M., Aligholi, H., Noorbakhsh, F., Djalali, M., Pishva, H., Modarres Mousavi, S. M., Alizadeh, L., Gorji, A. and Koohdani, F. (2019) Switching from high-fat diet to foods containing resveratrol as a calorie restriction mimetic changes the architecture of arcuate nucleus to produce more newborn anorexigenic neurons. *Eur J Nutr* **58**, 1687-1701.
- Salas, D., Puebla, C., Lampe, P. D., Lavandero, S. and Saez, J. C. (2015) Role of Akt and Ca²⁺ on cell permeabilization via connexin43 hemichannels induced by metabolic inhibition. *Biochim Biophys Acta* **1852**, 1268-1277.
- Samms, R. J., Lewis, J. E., Lory, A. et al. (2015) Antibody-Mediated Inhibition of the FGFR1c Isoform Induces a Catabolic Lean State in Siberian Hamsters. *Curr Biol* **25**, 2997-3003.
- Scemes, E., Duval, N. and Meda, P. (2003) Reduced expression of P2Y1 receptors in connexin43-null mice alters calcium signaling and migration of neural progenitor cells. *J Neurosci* **23**, 11444-11452.
- Schalper, K. A., Palacios-Prado, N., Retamal, M. A., Shoji, K. F., Martinez, A. D. and Saez, J. C. (2008) Connexin hemichannel composition determines the FGF-1-induced membrane permeability and free [Ca²⁺]_i responses. *Mol Biol Cell* **19**, 3501-3513.

- Schwartz, M. W., Woods, S. C., Porte, D., Jr., Seeley, R. J. and Baskin, D. G. (2000) Central nervous system control of food intake. *Nature* **404**, 661-671.
- Severi, I., Perugini, J., Mondini, E., Smorlesi, A., Frontini, A., Cinti, S. and Giordano, A. (2013) Opposite effects of a high-fat diet and calorie restriction on ciliary neurotrophic factor signaling in the mouse hypothalamus. *Front Neurosci* **7**, 263.
- Sousa-Ferreira, L., de Almeida, L. P. and Cavadas, C. (2014) Role of hypothalamic neurogenesis in feeding regulation. *Trends Endocrinol Metab* **25**, 80-88.
- Stewart, W. W. (1981) Lucifer dyes--highly fluorescent dyes for biological tracing. *Nature* **292**, 17-21.
- Suyama, S., Sunabori, T., Kanki, H., Sawamoto, K., Gachet, C., Koizumi, S. and Okano, H. (2012) Purinergic signaling promotes proliferation of adult mouse subventricular zone cells. *J Neurosci* **32**, 9238-9247.
- Szilvasy-Szabo, A., Varga, E., Beliczai, Z., Lechan, R. M. and Fekete, C. (2017) Localization of connexin 43 gap junctions and hemichannels in tanycytes of adult mice. *Brain Res* **1673**, 64-71.
- Talaveron, R., Fernandez, P., Escamilla, R., Pastor, A. M., Matarredona, E. R. and Saez, J. C. (2015) Neural progenitor cells isolated from the subventricular zone present hemichannel activity and form functional gap junctions with glial cells. *Front Cell Neurosci* **9**, 411.
- Trexler, E. B., Bennett, M. V., Bargiello, T. A. and Verselis, V. K. (1996) Voltage gating and permeation in a gap junction hemichannel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 5836-5841.
- Vergara, L., Bao, X., Cooper, M., Bello-Reuss, E. and Reuss, L. (2003) Gap-junctional hemichannels are activated by ATP depletion in human renal proximal tubule cells. *J Membr Biol* **196**, 173-184.
- Wallraff, A., Kohling, R., Heinemann, U., Theis, M., Willecke, K. and Steinhauser, C. (2006) The impact of astrocytic gap junctional coupling on potassium buffering in the hippocampus. *J Neurosci* **26**, 5438-5447.
- Wasseff, S. K. and Scherer, S. S. (2011) Cx32 and Cx47 mediate oligodendrocyte:astrocyte and oligodendrocyte:oligodendrocyte gap junction coupling. *Neurobiol Dis* **42**, 506-513.
- Weissman, T. A., Riquelme, P. A., Ivic, L., Flint, A. C. and Kriegstein, A. R. (2004) Calcium waves propagate through radial glial cells and modulate proliferation in the developing neocortex. *Neuron* **43**, 647-661.
- Willecke, K., Eiberger, J., Degen, J., Eckardt, D., Romualdi, A., Guldenagel, M., Deutsch, U. and Sohl, G. (2002) Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol Chem* **383**, 725-737.
- Wojtowicz, J. M. and Kee, N. (2006) BrdU assay for neurogenesis in rodents. *Nat Protoc* **1**, 1399-1405.
- Xu, J., Bernstein, A. M., Wong, A. et al. (2016) P2X4 Receptor Reporter Mice: Sparse Brain Expression and Feeding-Related Presynaptic Facilitation in the Arcuate Nucleus. *J Neurosci* **36**, 8902-8920.
- Xu, Y., Tamamaki, N., Noda, T., Kimura, K., Itokazu, Y., Matsumoto, N., Dezawa, M. and Ide, C. (2005) Neurogenesis in the ependymal layer of the adult rat 3rd ventricle. *Exp Neurol* **192**, 251-264.

- Yoo, S., Cha, D., Kim, D. W., Hoang, T. V. and Blackshaw, S. (2019) Tanycyte-Independent Control of Hypothalamic Leptin Signaling. *Front Neurosci* **13**, 240.
- Yum, S. W., Zhang, J., Valiunas, V., Kanaporis, G., Brink, P. R., White, T. W. and Scherer, S. S. (2007) Human connexin26 and connexin30 form functional heteromeric and heterotypic channels. *Am J Physiol Cell Physiol* **293**, C1032-1048.
- Zhang, J., Dublin, P., Griemsmann, S., Klein, A., Brehm, R., Bedner, P., Fleischmann, B. K., Steinhauser, C. and Theis, M. (2013) Germ-line recombination activity of the widely used hGFAP-Cre and nestin-Cre transgenes. *PLoS One* **8**, e82818.
- Zhao, Y., Yu, L., Xu, S., Qiu, F., Fan, Y. and Fu, G. (2011) Down-regulation of connexin43 gap junction by serum deprivation in human endothelial cells was improved by (-)-Epigallocatechin gallate via ERK MAP kinase pathway. *Biochem Biophys Res Commun* **404**, 217-222.
- Zheng, W., Nowakowski, R. S. and Vaccarino, F. M. (2004) Fibroblast growth factor 2 is required for maintaining the neural stem cell pool in the mouse brain subventricular zone. *Dev Neurosci* **26**, 181-196.
- Zimmermann, H. (2006) Nucleotide signaling in nervous system development. *Pflugers Arch* **452**, 573-588.



VIII. ANEXOS

Tabla 2: Contenido nutricional de la dieta rica en sacarosa (HSD)

AIN-76A w/ 11% Fat Energy/Sucrose/Blue

58R1

DESCRIPTION

AIN-76A Semi-Purified Diet 5800-B Surwit Diet with 11% Fat Energy, Sucrose and Dyed Blue. Originally manufactured as "D12329".

Storage conditions are particularly critical to TestDiet® products, due to the absence of antioxidants or preservative agents. To provide maximum protection against possible changes during storage, store in a dry, cool location. Storage under refrigeration (2° C) is recommended. Maximum shelf life is six months. (If long term studies are involved, storing the diet at -20° C or colder may prolong shelf life.) Be certain to keep in air tight containers.

Product Forms Available* Catalog

1/2" Pellet	58862
1/2" Pellet, Irradiated	1812067

*Other Forms Available On Request

INGREDIENTS (%)

Sucrose	61.0580
Casein - Vitamin Tested	16.6837
Maltodextrin	12.4396
AIN-76 Mineral Mix	2.9270
Hydrogenated Coconut Oil	2.9270
Soybean Oil	1.8294
Sodium Bicarbonate	0.7683
AIN-76A Vitamin Mix	0.7317
Potassium Citrate, Tribasic Monohydrate	0.2927
DL-Methionine	0.1463
Choline Bitartrate	0.1463
FD&C Blue 1-5516 Lake	0.0500

FEEDING DIRECTIONS

Feed ad libitum. Plenty of fresh, clean water should be available at all times.

CAUTION:
Perishable - store properly upon receipt.
For laboratory animal use only; NOT for human consumption.

NUTRITIONAL PROFILE ¹

Protein, %	14.8	Minerals	
Arginine, %	0.58	Calcium, %	0.45
Histidine, %	0.43	Phosphorus, %	0.47
Isoleucine, %	0.80	Potassium, %	0.41
Leucine, %	1.44	Magnesium, %	0.04
Lysine, %	1.21	Sodium, %	0.31
Methionine, %	0.58	Chloride, %	0.20
Cystine, %	0.06	Fluorine, ppm	0.0
Phenylalanine, %	0.80	Iron, ppm	31
Tyrosine, %	0.84	Zinc, ppm	30
Threonine, %	0.64	Manganese, ppm	49
Tryptophan, %	0.18	Copper, ppm	5.0
Valine, %	0.95	Cobalt, ppm	0.0
Alanine, %	0.46	Iodine, ppm	0.17
Aspartic Acid, %	1.07	Chromium, ppm	1.7
Glutamic Acid, %	3.41	Molybdenum, ppm	0.00
Glycine, %	0.32	Selenium, ppm	0.14
Proline, %	1.97		
Serine, %	0.92	Vitamins	
Taurine, %	0.00	Vitamin A, IU/g	2.9
		Vitamin D-3 (added), IU/g	0.7
Fat, %	4.8	Vitamin E, IU/kg	38.1
Cholesterol, ppm	0	Vitamin K, ppm	0.37
Linoleic Acid, %	0.93	Thiamin Hydrochloride, ppm	4.4
Linolenic Acid, %	0.14	Riboflavin, ppm	5.0
Arachidonic Acid, %	0.00	Niacin, ppm	22
Omega-3 Fatty Acids, %	0.14	Pantothenic Acid, ppm	12
Total Saturated Fatty A	3.01	Folic Acid, ppm	1.6
Total Monounsaturated Fatty Acids, %	0.39	Pyridoxine, ppm	4.2
Polyunsaturated Fatty Acids, %	1.08	Biotin, ppm	0.2
		Vitamin B-12, mcg/kg	10
Fiber (max), %	0.0	Choline Chloride, ppm	732
		Ascorbic Acid, ppm	0.0
Carbohydrates, %	73.9		
Energy (kcal/g) ²	3.98		
From:	kcal	%	
Protein	0.593	14.9	
Fat (ether extract)	0.428	10.8	
Carbohydrates	2.955	74.3	

1. Formulation based on calculated values from the latest ingredient analysis information. Since nutrient composition of natural ingredients varies and some nutrient loss will occur due to manufacturing processes, analysis will differ accordingly. Nutrients expressed as percent of ration on an As-Fed basis except where otherwise indicated.
2. Energy (kcal/gm) - Sum of decimal fractions of protein, fat and carbohydrate x 4,9,4 kcal/gm respectively.



Tabla 4. Detalle del número de células BrdU positivas tras ND y HSD

	ND	HSD
Eminencia Media (N° células BrdU+)	60,57 ± 6,31	58,65 ± 7,30
Parénquima (N° células BrdU+)	34,26 ± 6,09	42,46 ± 7,97
Tanicitos (N° células BrdU+/30 µm)	6,27 ± 1,12	5,79 ± 0,52
Tanicitos α1/2 (N° células BrdU+/30 µm)	4,78 ± 1,02	3,35 ± 0,46
Tanicitos β2 (N° células BrdU+/30 µm)	1,45 ± 0,21	2,598 ± 0,37

Los valores se muestran como promedio ± error estándar

Tabla 5. Detalle del número de células BrdU positivas tras FGF2 y/o Gap27

	Control	FGF2	Gap27	FGF2/Gap27
Parénquima dorsal /volumen	4,71x10 ⁻⁵ ± 1,13x10 ⁻⁵	5,31x10 ⁻⁵ ± 1,18x10 ⁻⁵	5,54x10 ⁻⁵ ± 1,72x10 ⁻⁵	5,73x10 ⁻⁵ ± 4,84x10 ⁻⁵
Parénquima ventral /volumen	4,53x10 ⁻⁵ ± 4,55x10 ⁻⁶	4,00x10 ⁻⁵ ± 2,83x10 ⁻⁶	4,83x10 ⁻⁵ ± 4,86x10 ⁻⁶	5,74x10 ⁻⁵ ± 1,75x10 ⁻⁵
Eminencia Media /volumen	6,64x10 ⁻⁵ ± 9,14x10 ⁻⁶	5,46x10 ⁻⁵ ± 7,42x10 ⁻⁶	5,29x10 ⁻⁵ ± 6,65x10 ⁻⁶	3,22x10 ⁻⁵ ± 8,52x10 ⁻⁶
α1-Tanicitos y epéndimo/30µm	69,73 ± 3,02	127,3 ± 31,4	79,09 ± 31,51	131,4 ± 31,9
α2-Tanicitos/30µm	8,72 ± 5,56	31,69 ± 8,48	11,8 ± 3,38	48,55 ± 27,83
β2-Tanicitos/30µm	9,69 ± 2,25	22,96 ± 4,39	14,93 ± 0,81	7,022 ± 0,15

Los valores se muestran como promedio ± error estándar