



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Biológicas
Magíster en Bioquímica y Bioinformática

Proliferación celular en nichos neurogénicos involucrados en la regulación de la ingesta alimenticia



Tesis para optar al grado de Magíster en Bioquímica y Bioinformática

SERGIO AUGUSTO LÓPEZ FONSECA
CONCEPCIÓN, CHILE
2020

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

Profesor co-guía de tesis: Dra. Teresa Caprile Elola-Olaso
Dpto. 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 de la 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



Dra. Estefanía Tarifeño Saldivia
Profesor evaluador interno
Universidad de Concepción

Dra. Carola Millán Giovanetti
Profesor evaluador externo
Universidad Adolfo Ibáñez

Dra. Amparo Uribe Pérez
Director
Magíster Bioquímica y Bioinformática
Universidad de Concepción

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de investigación fue financiado por el proyecto FONDECYT 1180871, a cargo de la Dra. María de los Ángeles García.

Inicialmente quiero extender mis agradecimientos a la Dirección de Postgrados de la Universidad de Concepción, por la beca de arancel asignada para el desarrollo del magíster y las extensiones de esta, durante el año 2020. Igualmente, al programa de Magíster en Bioquímica y Bioinformática, a los profesores que impartieron clases y a la directora, Dra. Amparo Uribe, por ser una persona dedicada e interesada no solo en mejorar las condiciones académicas, sino también en el bienestar de los estudiantes en esta instancia.

De manera especial agradezco a la profesora María de los Ángeles, por confiar en mi capacidad de trabajo; por su constante preocupación y orientación académica, pero principalmente por ser una excelente persona con sus estudiantes. También a la profesora Teresa, por su orientación y acompañamiento en este proceso, además de sus comentarios y recomendaciones con sentido crítico.

Al Dr. Roberto Elizondo y la Dra. Karina Oyarce, quienes me instruyeron y enseñaron en momentos críticos del desarrollo de la tesis y unidades de investigación, y contribuyeron en mi formación, no solo con su conocimiento sino también con su apoyo personal.

A mis compañeros de laboratorio, Antonia Recabal, Magdiel Salgado, Patricio Órdenes y María José Barahona, quienes me acompañaron en esta etapa de vida y la hicieron un poco más sencilla y digna de recordar. Gracias por su aporte científico, pero, ante todo, por la amistad y buenos momentos que me brindaron desde el primer día.

Agradezco también a mis compañeros del magíster, Yenifer, Matías, Belén, Héctor y Brian, por haber formado un grupo diverso de estudio, intercambio de experiencias y celebraciones. Adicionalmente a José Nicolás por brindarme su ayuda en la parte bioinformática.

A Mariana Tovar, con quien decidimos desde hace algunos años, emprender juntos el camino de la vida y ahora en la ciencia; por ser mi compañera y mi apoyo en los momentos más difíciles de este proceso y ahora, con quien puedo compartir los frutos de ese esfuerzo.

Finalmente, pero no menos importante, agradezco a mi familia y mis amigos en Colombia, que siempre me han dado su apoyo incondicional y me han recargado de energía y motivación, hasta culminar este proceso. En especial agradezco a mis papás y mi hermano por ser mi inspiración y fuerza en la vida. Adicionalmente, agradezco a Blanca Bustos y Pablo del Campo, las personas que me acogieron en su hogar en Chile y me hicieron sentir como un miembro más de su familia, en el día a día y en cada celebración especial.



TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	III
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
ÍNDICE DE TABLAS	IX
ABREVIATURAS.....	X
RESUMEN	XIII
ABSTRACT	XV
I. INTRODUCCIÓN	1
1. Nichos neurogénicos convencionales en cerebro adulto	1
2. Nichos neurogénicos en zonas no convencionales.....	7
2.1 Hipotálamo como nicho neurogénico en cerebro adulto.....	8
2.2 Complejo dorsal vagal como nicho neurogénico.....	12
3. Neurogénesis adulta como respuesta a factores de la dieta en hipotálamo y CDV	15
II. Hipótesis y objetivos.....	20
Hipótesis	20
Objetivo general	20
Objetivos específicos	20
III. MATERIALES Y MÉTODOS	21
1. Declaración bioética para trabajo con animales experimentales.....	21
2. Exposición de los animales a dieta rica en sacarosa.....	21
3. Determinación de glicemia	22
4. Preparación y administración de BrdU.....	22
5. Procesamiento histológico e inmunohistoquímica	23
6. Obtención y procesamiento de imágenes.....	23
7. Cuantificación de células BrdU positivas.....	24

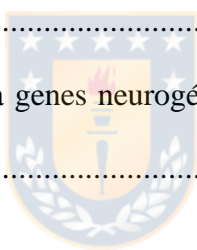
8. Cultivos celulares	24
8.1 Cultivo primario de tanicitos	24
8.2 Cultivo de células HEK-293A	25
8.3 Cultivo de células HEK-293T	25
9. RT-PCR y RT-PCR en tiempo real	26
9.1 Extracción ARN total.....	26
9.2 Transcripción reversa del ARN total (RT)	26
9.3 Amplificación del ADNc por PCR	27
9.4 Electroforesis en gel de agarosa.....	27
9.5 RT-qPCR.....	28
10. Generación de adenovirus.....	29
10.1 Amplificación de vectores adenovirales.....	29
10.2 Ensamble y titulación de adenovirus.....	29
11. Transducción <i>in vivo</i> y aislamiento de tanicitos y vagliocitos.....	30
11.1 Inyección del adenovirus.....	30
11.2 Disgregación de tejidos	30
11.3 Aislamiento de células por fluorescencia	31
11.4 Extracción de ARN total de células sorteadas	31
12. Análisis bioinformático de datos transcriptómicos	32
12.1 Obtención de datos transcriptómicos	32
12.2 Procesamiento bioinformático de datos de <i>scRNA-seq</i>	32
13. Análisis estadístico	33
IV. RESULTADOS.....	34
1. Caracterización histológica del Complejo Dorsal Vagal.....	34
2. Evaluación de parámetros fisiológicos tras exposición a una dieta rica en sacarosa ...	37

3. HSD favorece la proliferación de tanicitos $\beta 2$	40
4. HSD favorece la proliferación en AP	44
5. Tanicitos y células del AP comparten genes de células PN.....	49
6. Ad off-tdTomato puede ser titulado por la identificación de la proteína reportera.....	51
7. Ad OFF-tdTomato transduce con eficiencia células endimarias en hipotálamo y CDV	53
8. La inyección icv de Ad OFF-tdTomato permite el aislamiento de células endimarias por FACS	55
9. El riguroso preprocesamiento de <i>reads</i> permite la selección de poblaciones celulares aptas para el análisis transcriptómico	59
10. El análisis de componentes principales permite identificar y agrupar poblaciones y subpoblaciones de tanicitos	61
11. El análisis de expresión diferencial permite identificar genes de tanicitos que alteran su expresión frente al aumento de grasas en la dieta.....	67
12. Valores de expresión diferencial de tanicitos permiten identificar genes clave en respuesta a cambios en la dieta	75
V. DISCUSIÓN.....	83
1. Efecto del incremento de glucosa en la dieta sobre la proliferación en hipotálamo y complejo dorsal vagal.....	83
2. Expresión de marcadores y genes neurogénicos en hipotálamo y CDV	86
3. Transducción de células endimarias utilizando un vector adenoviral	89
4. Identificación de genes diferencialmente expresados en tanicitos de ratones sometidos a diferentes condiciones alimenticias mediante datos de <i>single cell RNAseq</i>	92
5. Expresión de genes gluco- <i>sensores</i> y neurogénicos en tanicitos ante un incremento en el consumo de grasas	97
VI. BIBLIOGRAFÍA.....	102

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Células precursoras neurales (PN) en desarrollo y en adulto.	3
Figura 2. Neurogénesis adulta y relación de marcadores específicos en diferentes tipos celulares.....	6
Figura 3. Representación esquemática del hipotálamo basal.	11
Figura 4. Representación esquemática del complejo dorsal vagal (CDV).....	13
Figura 5. Expresión y localización de vimentina en el complejo dorsal vagal.	37
Figura 6. Comparación de factores fisiológicos relacionados con el metabolismo de una dieta control y una alta en sacarosa.	39
Figura 7. Efecto de la dieta rica en sacarosa sobre la proliferación celular hipotalámica. ..	41
Figura 8. Cuantificación del efecto de la dieta rica en sacarosa sobre la proliferación celular hipotalámica.	43
Figura 9. Efecto de la dieta rica en sacarosa sobre la proliferación celular en CDV.	47
Figura 10. Cuantificación del efecto de la dieta rica en sacarosa sobre la proliferación celular en CDV.....	48
Figura 11. Identificación y cuantificación de la expresión de genes neurogénicos en cultivo primario de tanicitos y células del AP.	50
Figura 12. Aumento de la capacidad de transfección del Ad OFF-tdTomato.....	52
Figura 13. Capacidad de transducción del Ad OFF-tdTomato en hipotálamo y CDV.....	54
Figura 14. Sorteo de células transfectadas con Ad OFF-tdTomato.....	57
Figura 15. Distribución y agrupación de tanicitos en distintas condiciones experimentales de acuerdo con sus componentes principales.....	64

Figura 16. Distribución y agrupación de subpoblaciones de tanicitos con respecto a una misma condición experimental de acuerdo con sus componentes principales.....	67
Figura 17. Dispersión de valores obtenidos del análisis de expresión diferencial para tanicitos en diferentes condiciones alimenticias.....	68
Figura 18. Dispersión de valores obtenidos en el análisis de expresión diferencial para subpoblaciones de tanicitos en diferentes condiciones alimenticias.	73
Figura 19. Respuesta génica de tanicitos frente a dieta baja y alta en grasa.	74
Figura 20. Genes mayormente afectados en tanicitos como respuesta al consumo de dietas con mayor contenido de grasas.....	77
Figura 21. Genes mayormente afectados en tanicitos $\beta 2$ como respuesta al consumo de dietas con mayor contenido de grasas.....	78
Figura 22. Análisis de expresión para genes neurogénicos y de importancia metabólica en tanicitos.	82



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Partidores utilizados en RT-PCR convencional y cuantitativo.....	28
Tabla 2. Parámetros analizados en el control de calidad a reads provenientes de animales sometidos a diferentes condiciones alimenticias.	60
Tabla 3. Células identificadas por cada condición luego del control de calidad y filtrado..	60
Tabla 4. Genes diferencialmente expresados en tanicitos frente a dietas con mayor contenido de grasas respecto a una dieta control.	79

ABREVIATURAS

AAV	:	Adenovirus asociado
Ad	:	Adenovirus
ADN	:	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	:	ADN complementario
AgRP	:	Proteína relacionada-agouti
AMPC	:	Adenosin monofosfato cíclico
AP	:	Área postrema
AraC	:	Citosina arabinosa
ARN	:	Ácido ribonucleico
ARNm	:	ARN mensajero
Ascl1	:	<i>Achaete-scute family bHLH transcription factor</i>
ATP	:	Adenosin trifosfato
BDNF	:	Factor neurotrófico derivado del cerebro
BHE	:	Barrera hematoencefálica
BLBP	:	Proteína de unión a lípidos en cerebro
BrdU	:	5-Bromodeoxiuridina
BSA	:	Albúmina sérica bovina
CC	:	Canal central
CDV	:	Complejo dorsal vagal
Chow	:	Dieta estándar rata-ratón
Chow10	:	Dieta baja en grasas
Clef	:	Factor citoquina tipo cardiotrofina
CNTF	:	Factor neurotrófico ciliar
CO ₂	:	Dióxido de carbono
cols	:	Colaboradores
Cx43	:	Conexina 43
Dcx	:	Doblecortina
DMV	:	Núcleo dorsomotor del vago

ED	:	Expresión diferencial
EDTA	:	Ácido Etilendiamin tetracético
EGF	:	Factor de crecimiento epidérmico
EGFP	:	Proteína fluorescente verde mejorada
EM	:	Eminencia media
FACS	:	Selección de células activada por fluorescencia
FDR	:	<i>False discovery rate</i>
FGF	:	Factor de crecimiento fibroblástico
Fig	:	Figura
Foxn4	:	<i>Forkhead box N4</i>
GEO	:	<i>Gen expression omnibus</i>
GFAP	:	Proteína ácida fibrilar de glía
GFP	:	Proteína fluorescente verde
GHRH	:	Hormona liberadora de la hormona de crecimiento
GK	:	Gloququinasa
GKRP	:	Proteína reguladora de gloququinasa
GLAST	:	Transportador astrogliar de glutamato
GLUT	:	Transportador de glucosa
GR	:	Glía radial
HEK	:	Células embrionarias de riñón
HFD	:	Dieta rica en grasas
HSD	:	Dieta rica en sacarosa
icv	:	Intra cerebroventricular
ip	:	intraperitoneal
LCR	:	Líquido cefalorraquídeo
MCT	:	Transportador de mono carboxilatos
mm	:	Milímetros
NA	:	Núcleo arqueado
ND	:	Dieta control
NDM	:	Núcleo dorsomedial
NGS	:	Secuenciación de siguiente generación

NPY	:	Neuropéptido Y
NTS	:	Núcleo del tracto solitario
NVM	:	Núcleo ventromedial
OCV	:	Órgano circunventricular
Pax6	:	<i>Paired box 6</i>
PBS	:	Solución tampón de fosfatos
PCA	:	Análisis de componentes principales
PCR	:	Reacción en cadena de la polimerasa
PFA	:	Para-formaldehído
PI	:	Precusores intermedios
PN	:	Precursor neural
POMC	:	Péptido pro-opiomelanocortina
PSA-NCAM	:	Forma poliácilada de la molécula de adhesión neural
qRT-PCR	:	PCR cuantitativo
Rax	:	<i>Retina and anterior neural fold homeobox</i>
Rcor2	:	<i>REST corepresor 2</i>
RNA-seq	:	Secuenciación del ARN
RT-PCR	:	Transcripción reversa PCR
SBF	:	Suero fetal bovino
scRNA-seq	:	Secuenciación de ARN de célula simple (<i>Single cell RNA-seq</i>)
SEM	:	Error estándar de la media
Sox2	:	Determinante del sexo en región Y
UMI	:	Identificador de moléculas únicas
UV	:	Ultravioleta
YPF	:	Proteína fluorescente amarilla
ZSG	:	Zona subgranular del hipocampo
ZSV	:	Zona subventricular
%GC	:	Porcentaje de guanina y citosina
µm	:	Micrómetros
3V	:	Tercer ventrículo
4V	:	Cuarto ventrículo

RESUMEN

En organismos adultos, los nichos neurogénicos han sido bien caracterizados en cercanía a los ventrículos laterales y en la zona subgranular del hipocampo, donde precursores neuronales comparten marcadores de la glía radial y células astrogliales (vimentina, Sox2, nestina, Pax6, entre otros). Sin embargo, existe evidencia actual que demuestra la generación de nuevas neuronas en otras áreas como el hipotálamo y el complejo dorsal vagal (CDV), ambas estructuras localizadas en cercanía a órganos circunventriculares [OCVs; eminencia media y área postrema (AP), respectivamente]. Se ha demostrado que la neurogénesis en el hipotálamo es acelerada tras la exposición a factores como BDNF, FGF2 y dietas hipercalóricas como las ricas en grasas, pero se desconocen efectos de estos factores u otro tipo de dieta en CDV. No se ha comprobado aún, si células principalmente en AP como vagliocitos, o glías de tipo radial en cercanía al canal central, podrían postularse como precursoras neuronales (tal como son los tanicitos en el tercer ventrículo del hipotálamo), en respuesta a otra dieta hipercalórica como la rica en sacarosa (HSD).

En conjunto, lo descrito anteriormente fundamenta la hipótesis de que una dieta alta en sacarosa incrementa la proliferación de tanicitos, vagliocitos y células del canal central. Para ello se evaluó, en ratas macho P46 alimentadas con dieta control y HSD, la incorporación de 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) como marcador de proliferación, en secciones de hipotálamo y CDV, a través de inmunohistoquímica. Además, se detectó y cuantificó la expresión de algunos genes neurogénicos, mediante RT-PCR convencional y cuantitativo, en las mismas zonas cerebrales. Finalmente se realizó el análisis bioinformático de expresión diferencial de genes en subpoblaciones de tanicitos, de ratones en diferentes condiciones alimenticias, con un variado contenido de grasas; haciendo énfasis en genes neurogénicos y

gluco-*sensores*. Como resultado, se evidenció un aumento en la proliferación basal de tanicitos $\beta 2$ y células del AP en ratas alimentadas con HSD, sugiriendo una alta sensibilidad ante el aumento de glucosa, por parte de estas células en OCVs; además de encontrar expresión de algunos marcadores y genes neurogénicos como nestina, vimentina y Pax6, en ambas poblaciones celulares. Adicionalmente, el análisis transcriptómico permitió identificar cambios en la expresión de genes gluco-*sensores* y neurogénicos, posibilitando el reconocimiento de tanicitos $\alpha 2$ y $\beta 2$ como los más sensibles ante cambios en el contenido de grasas provenientes de la dieta. De esta forma, es importante destacar los resultados obtenidos en esta tesis, a partir de una mezcla de técnicas celulares, moleculares y bioinformáticas, pues son los primeros obtenidos con HSD, en el contexto proliferativo y neurogénico adulto; así como la primera vez que se aborda la neurogénesis promovida por la dieta en CDV.



ABSTRACT

In adult organisms, neurogenic niches have been well characterized in proximity to the lateral ventricles and in the subgranular zone of the hippocampus, where neuronal precursors share markers of radial glia and astroglial cells (vimentin, Sox2, nestin, Pax6, among others). However, there is current evidence that shows the generation of new neurons in other areas such as the hypothalamus and the dorsal vagal complex (DVC), both structures located close to circumventricular organs (CVOs) such as median eminence (ME) and area postrema (AP), respectively. It has been shown that hypothalamic neurogenesis is accelerated after exposure to factors such as BDNF, FGF2, and high-calorie diets such as high fat diet, but the effects of these factors or other types of diet on DVC are unknown. It has not yet been proven whether AP-cells such as vagliocytes, or radial like-glia near the central canal, could be postulated as neuronal precursors in response to another hypercaloric diet high in sucrose (HSD), similar as has been demonstrated that hypothalamic tanycytes can do it. Altogether, what has been described above supports the hypothesis that a diet high in sucrose increases the proliferation of tanycytes, vagliocytes, and central channel cells. To this end, the incorporation of 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) as a proliferation marker was evaluated in hypothalamic and DVC sections, through immunohistochemistry; also, the expression of some neurogenic genes were detected and quantified, using conventional and quantitative RT-PCR, in the same brain areas. Finally, the bioinformatic analysis of differential expression of genes in tanycytic subpopulations, of mice in different feeding conditions, with a varied fat content was carried out; emphasizing neurogenic and gluco-sensors genes. As a result, an increase in the basal proliferation of $\beta 2$ tanycytes and AP cells was evidenced in rats fed HSD, suggesting a high sensitivity to increased glucose by these cells in OCVs; in addition to finding expression of some neurogenic markers and genes such as nestin,

vimentin and Pax6, in both cell populations. Additionally, the transcriptomic analysis allowed to identify changes in the expression of glucosensor and neurogenic genes, allowing the recognition of $\alpha 2$ and $\beta 2$ tanycytes as the most sensitive to changes in the fat content from the diet. In this way, it is important to highlight the results obtained in this thesis, from a mixture of cellular, molecular and bioinformatics techniques, since they are the first obtained with HSD, in the proliferative and adult neurogenic context; as well as the first time that diet-promoted neurogenesis is addressed in CDV.



I. INTRODUCCIÓN

1. Nichos neurogénicos convencionales en cerebro adulto

La neurogénesis posnatal puede definirse como la serie de eventos que desencadena la producción de neuronas nuevas en un cerebro adulto. Se originan a partir de un progenitor o precursor neuronal (PN), el cual se divide y posteriormente madura, estableciéndose así el nacimiento de una nueva neurona dentro de una determinada red neuronal (Lledo et al., 2006). Estas células expresan marcadores proteicos característicos como nestina, vimentina, GLAST (transportador astroglial de glutamato), BLBP (proteína de unión a lípidos en cerebro), Sox2 (determinante del sexo en región Y) y GFAP (proteína ácida fibrilar de glía), bajo los cuales pueden distinguirse como células PN (Kriegstein & Alvarez-Buylla, 2009). Las neuronas en su estado inmaduro se denominan neuroblastos, los cuales como característica expresan la proteína de unión a microtúbulos doble cortina (Dcx) y existe evidencia de que éstas pueden migrar hacia distintas zonas cerebrales, como el bulbo olfatorio y el giro dentado del hipocampo, donde se integran y finalmente maduran en cuanto a tamaño, características y función específica (Lledo et al., 2006).

La neurogénesis en cerebros adultos es un evento conservado entre especies, esencialmente en mamíferos y se encuentra restringida a ciertas regiones encefálicas. En roedores se ha identificado algunos nichos neurogénicos principalmente en la zona subgranular del hipocampo (ZSG) (Altman & Das, 1965) y la zona subventricular de los ventrículos laterales (ZSV) (Doetsch et al., 1999), donde células de origen glial pueden proliferar dando origen a neuronas y otros tipos de células gliales. Las poblaciones neurogénicas en estas zonas, son consideradas como una subpoblación de astrocitos (Kriegstein & Alvarez-Buylla, 2009).

En el hipocampo, la ZSG es la fuente de nuevas neuronas que se integrarán al giro dentado y se han relacionado principalmente con procesos cognitivos como aprendizaje y memoria (Shors et al., 2002). En la ZSG existe una subpoblación de astrocitos radiales con función de precursores neurales, también llamados progenitores tipo I, los cuales tienen características morfológicas importantes como largos procesos, capaces de atravesar la capa granular y se localizan alrededor de nichos vasculares (Palmer et al., 2000). Estos progenitores expresan GFAP, nestina y Sox2 (Seri et al., 2004; Steiner et al., 2006).

En las paredes de los ventrículos laterales se encuentra la zona con mayor neurogénesis en mamíferos adultos, la ZSV, caracterizada por albergar una población de PN quiescentes conocidos como células B (Doetsch et al., 1999). Estos PN son un tipo de astrocitos que pueden proliferar y a su vez convertirse en células C o precursoras, con la particularidad de poder convertirse en neuroblastos inmaduros, también llamados células A, los cuales migran en cadena hacia el bulbo olfatorio (Figura 1). Allí finalmente pueden madurar y acoplarse a una red neuronal (Belluzzi et al., 2003). Las células B comparten marcadores de células PN como nestina, Sox2, GFAP y GLAST (Doetsch et al., 1999). Similar a lo descrito en la ZSG, células B en ZSV se encuentran en cercanía a vasos sanguíneos, sugiriendo así una relación favorable entre factores presentes en el flujo sanguíneo con la presencia de PN (Shen et al., 2008).

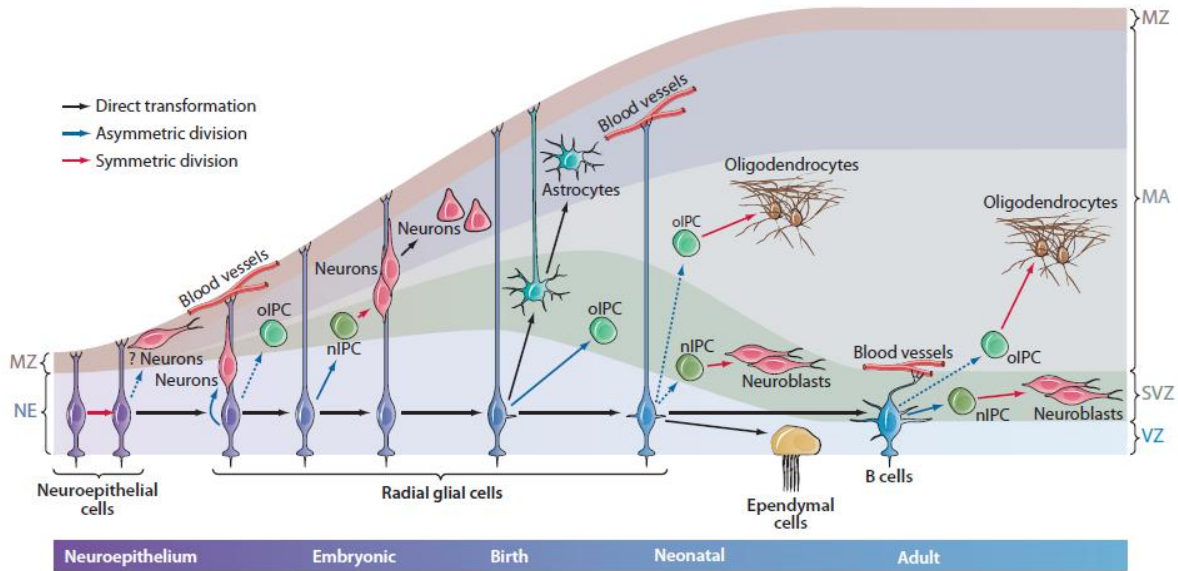


Figura 1. Células precursoras neurales (PN) en desarrollo y en adulto.

En desarrollo temprano, células neuroepiteliales proliferan para generar más células del mismo tipo, pero algunas pueden generar neuronas. Las células neuroepiteliales pueden elongar y convertirse en glía radial (GR). GR puede dividirse y generar neuronas directa o indirectamente a través de células precursoras intermedias neurales (nIPC); también GR puede originar oligodendrocitos a través de otras células precursoras intermedias (oIPC). Se generan astrocitos cuando GR mantiene contacto de procesos solo en su parte basal (arriba) con meninges y vasos sanguíneos, mientras que si mantienen procesos en la parte apical (abajo) en contacto con el ventrículo, continuarán funcionando como PN en neonatos. Esta GR puede generar células endimarias o astrocitos PN (Células B), los cuales continuarán siendo PN en la adultez, originando neuronas y oligodendrocitos. Tomado de (Kriegstein & Alvarez-Buylla, 2009).

Durante la neurogénesis adulta, células ubicadas en ZSG y ZSV, presentan características como la capacidad de proliferación, autorrenovación y generación de distintos tipos celulares, las cuales son esenciales para ser consideradas como células PNs (Imayoshi et al., 2009). Las PNs pasan por diferentes etapas (Figura 1), primero como precursores intermedios (PIs), luego como neuroblastos y finalmente en estado maduro como neurona e incluso como oligodendrocito o astrocito, dependiendo del tipo de PIs (De Filippis et al., 2007). Dado lo anterior, es importante conocer grupos de marcadores moleculares que permitan identificar y diferenciar los distintos tipos celulares en diferentes etapas como proliferación, diferenciación, migración e incluso en estado quiescente, así como entre grupos celulares (Figura 2).

Estudios realizados principalmente en hipocampo, han permitido elucidar los marcadores moleculares que distinguen entre grupos celulares y estado de cada célula en el proceso de neurogénesis; este último se ha dividido en seis etapas (Figura 2) (Zhang & Jiao, 2015).

En la etapa 1 se encuentran las células B o tipo I, las cuales son PN de tipo glía radial, con morfología distinta, pero en común poseen la expresión de proteínas fibrilares como nestina y GFAP, así como de factores de transcripción como Sox2 y Pax6 (Fukuda et al., 2003).

En las etapas 2, 3 y 4 se encuentran subpoblaciones de células con características morfológicas y capacidad de proliferación similar, todas identificadas como PIs. Estas PIs tienen un origen común, a partir de la división asimétrica de células B y pertenecen al subgrupo de células C y A (tipo II y III, respectivamente), que además son GFAP negativas, lo que da indicios de su avance gradual hacia la diferenciación neuronal (Fukuda et al., 2003). Existen dos tipos de células C; C1 y C2, siendo ambas nestina y Dcx positivas, mientras que las células A son nestina negativas y positivas para Dcx y la forma poliacilada de la molécula

de adhesión neural (PSA-NCAM; (Kronenberg et al., 2003). Puesto que células A y C son Dcx positivas, son consideradas como parte del linaje neuronal. La capacidad proliferativa de estas IPs fue identificada mediante la inyección *in vivo* del nucleótido 5-bromodeoxiuridina (BrdU), el cual se incorpora a las células que se encuentran en división, permitiendo así su detección (Holmes et al., 2004).

En la etapa 5 las células A y C salen del ciclo celular e inician un desarrollo neuronal temprano, generando neuronas inmaduras que mantienen la expresión de Dcx, pero además presentan NeuN y calretinina (Jessberger & Kempermann, 2003).

Finalmente, en la etapa 6 se obtienen células maduras que expresan calbindina en lugar de calretinina. Esta etapa puede ocurrir dos o tres semanas después de la etapa 5 (Jessberger & Kempermann, 2003).

En humanos, han sido limitados los estudios de neurogénesis en adultos y se han reducido a análisis *post mortem*. Se ha encontrado nuevas neuronas en el hipocampo incluso en etapa adulta (Boldrini et al., 2018), pero al parecer, en ZSV la neurogénesis es restringida hasta los 8 meses de edad (Eriksson et al., 1998).

Como se indicó anteriormente, existen diversos tipos de marcadores moleculares que pueden ser utilizados en técnicas inmunohistológicas con el fin de identificar y caracterizar poblaciones celulares específicas, en una etapa o estado determinado. Gracias a lo anterior, se han reconocido otras zonas como nichos neurogénicos en cerebro adulto principalmente en roedores y humanos.

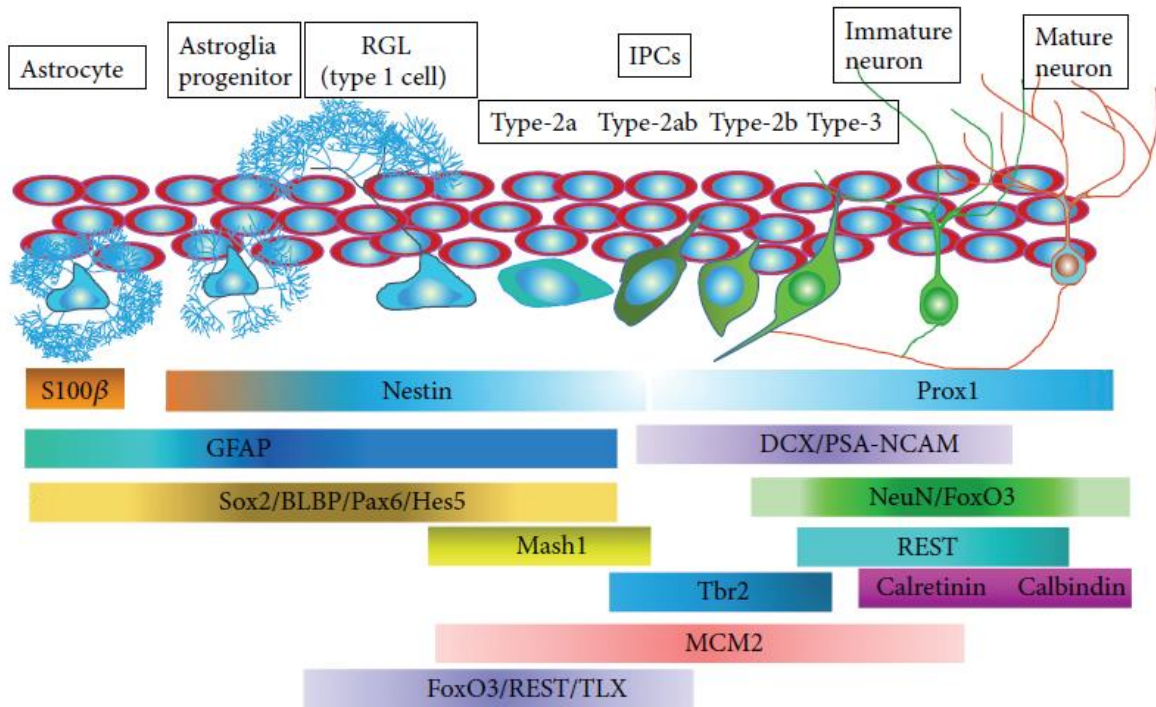


Figura 2. Neurogénesis adulta y relación de marcadores específicos en diferentes tipos celulares.

El proceso de neurogénesis adulta se origina desde células tipo glía radial activas (células B o de tipo 1), las cuales generan células precursoras intermedias (células C o tipo 2), posteriormente se generan neuronas inmaduras (células A o de tipo 3) que con el tiempo alcanzan la madurez completa. De cada etapa descrita, se han identificado diferentes grupos de marcadores que permiten caracterizar una célula en una determinada etapa. Tomado de (Zhang & Jiao, 2015).

2. Nichos neurogénicos en zonas no convencionales

Recientemente, en distintas zonas del cerebro adulto, se ha identificado tipos celulares con características similares a las evidenciadas en ZSG y ZSV y por lo tanto catalogadas con potencial proliferativo y neurogénico. En roedores se ha descrito la presencia de posibles PNs en amígdala (Jhaveri et al., 2018), complejo dorsal vagal (Bauer et al., 2005) e hipotálamo (Kokoeva et al., 2005); también en hipotálamo humano (Pellegrino et al., 2018). Las zonas mencionadas anteriormente poseen una característica esencial en común, su cercanía a órganos circunventriculares (OCVs; (Hourai & Miyata, 2013).

Los OCVs son un grupo único de estructuras que carecen de barrera hematoencefálica (BHE) y por tanto se encuentran en una posición ideal para detectar el contenido de la circulación sistémica (OCV sensoriales) o bien para secretar moléculas directamente a la circulación (OCV secretores) (Miyata, 2015). Los OCVs se encuentran en cercanía a los ventrículos cerebrales, a la fecha se han descrito siete OCVs; órgano subfornical, órgano vasculoso de la lámina terminalis, área postrema, neurohipófisis, eminencia media, glándula pineal y plexos coroideos (Kiecker, 2018; McKinley et al., 1990). En conjunto, se reconoce que estas estructuras desempeñan roles integradores importantes en la regulación del equilibrio de fluidos y metabolitos, detectando concentraciones circulantes de los iones sodio y calcio, así como de neurohormonas como las producidas en el hipotálamo (Ganong, 2000) y en la detección de glucosa por parte del hipotálamo y el órgano subfornical (Medeiros et al., 2012).

La BHE es una estructura vascular especializada, que protege principalmente las neuronas de los cambios en la concentración de diferentes moléculas en el flujo sanguíneo. Está formada por células endoteliales que se encuentran estrechamente ligadas por complejos de proteínas intercelulares, las cuales se denominan uniones estrechas u ocluyentes (*Tight*

junctions en inglés; (Wolburg et al., 2003). Los OCVs son zonas con presencia específica de capilares fenestrados, los cuales no poseen estas uniones ocluyentes y por tanto son altamente permeables a diferentes moléculas provenientes del flujo sanguíneo, que de esta manera pueden difundir directamente al parénquima cerebral (Price et al., 2008). Gracias a lo anterior, los OCVs están directamente asociados a funciones esenciales como el intercambio de información entre la sangre y el cerebro, homeostasis térmica, balance energético, equilibrio hídrico y neuroinflamación (Miyata, 2015).

Estas propiedades y características únicas de los OCVs indican que son sitios novedosos donde gracias al intercambio de estímulos metabólicos y hormonales, puede existir un efecto directo en la división celular basal, lo cual es clave en la generación de nuevas neuronas en cerebro adulto.

2.1 Hipotálamo como nicho neurogénico en cerebro adulto

Durante las últimas dos décadas se ha encontrado evidencia de que la neurogénesis adulta no está restringida a ZSV y ZSG; siendo el hipotálamo adulto uno de los nuevos nichos neurogénicos descritos (Kokoeva et al., 2005, 2007; Xu et al., 2005).

El hipotálamo es una pequeña área del cerebro ubicado en la base del diencefalo, bajo el tálamo, en torno al tercer ventrículo (3V), sobre la hipófisis y en estrecho contacto con la eminencia media (EM), su OCV. Es considerado como un centro integrador, participa en la regulación de la temperatura, control de la saciedad alimenticia e hidratación y hace parte del control del sistema cardiovascular, regulando la presión sanguínea y la respuesta vasodilatadora como mecanismo de defensa (Jenkins, 1972). En torno al 3V, se encuentran agrupaciones neuronales con funciones específicas que son parte del control integrativo del hipotálamo; entre ellas el núcleo ventromedial (NVM), relacionado con el comportamiento

sexual y alimenticio (Jenkins, 1972), y el núcleo arqueado (NA), el cual presenta diferentes tipos neuronales que expresan neuropéptidos orexigénicos y anorexigénicos, y por lo tanto controla sensaciones de hambre y saciedad (Schwartz et al., 2000).

En el hipotálamo basal se encuentra un tipo de glía radial denominados tanicitos, son células endoteliales especializadas que recubren las paredes del 3V; son células polarizadas con una parte proximal en la pared del ventrículo y una parte distal que contacta vasos sanguíneos o el parénquima de los núcleos de localización más basal como el núcleo dorsomedial (NDM), NVM y NA (Horstmann, 1954). Los tanicitos que recubren el piso del tercer ventrículo contactan con el parénquima de la EM (Fig. 3). Los tanicitos tienen forma elongada con un único y extendido proceso, el cual se proyecta hacia distintas zonas del hipotálamo, lo que hace posible un intercambio y transporte de moléculas entre el líquido cefalorraquídeo (LCR) y núcleos neuronales en el parénquima. De acuerdo con su ubicación en el eje dorso-ventral y la expresión de marcadores característicos, los tanicitos se han clasificado en cuatro grupos; α_1 , α_2 , β_1 y β_2 (Robins et al., 2013; Rodríguez et al., 2005). Tanicitos α_1 se encuentran en la parte más dorsal, extienden sus procesos hacia el NVM y NDM, mientras que tanicitos α_2 lo hacen en dirección al NA; tanto α_1 como α_2 establecen un puente entre el LCR y el hipotálamo mediobasal (Rodríguez et al., 2005). Tanicitos β_1 se encuentran en la zona lateral del piso del 3V y extienden sus procesos hacia el NA, mientras que los β_2 se encuentran en el piso del ventrículo y extienden procesos hacia los capilares fenestrados presentes en la EM; tanicitos β establecen puentes desde el LCR hacia el parénquima y la EM (Rodríguez et al., 2005). Dentro de las cuatro poblaciones, solo los β_2 establecen uniones ocluyentes y comunicantes entre ellos, de esta manera forman una importante barrera entre LCR y EM (Langlet, Mullier, et al., 2013).

El rol de PNs en el hipotálamo ha sido atribuido a los tanicitos, célula con morfología y expresión génica similar a la glía radial. Estas células poseen polaridad apical-basal, pues el cuerpo celular se encuentra en una zona ventricular y su único proceso se extiende hacia el parénquima cerebral, lo cual es característica esencial de la glía radial y pueden cumplir así la función de guía y soporte para la migración de los nuevos neuroblastos generados. Con respecto a su expresión, comparten marcadores neurogénicos de la misma manera que lo hacen las células B en la ZSV y los progenitores tipo I en la ZSG (Robins et al., 2013). Estas células expresan GFAP (Lee et al., 2012), nestina (Wei et al., 2002), GLAST (Berger & Hediger, 2001), BLBP (Haan et al., 2013), y SRY-box2 o Sox2 (*sex determining region Y-box2*, en inglés; (Lee et al., 2012), siendo este un marcador de células con potencial pluripotente. Los tanicitos también expresan otros marcadores identificados en nichos con potencial neurogénico como Notch1, Notch2, Rax y Sox9 (Lee et al., 2012). Otra característica esencial de los PNs que comparten los tanicitos, es la capacidad de formar neuroesferas *in vitro*, a partir del aislamiento de células de cultivo primario, con las cuales puede evaluarse la capacidad de autorrenovación y diferenciación multipotencial (Kano et al., 2019; Robins et al., 2013)

Los primeros en identificar neurogénesis en hipotálamo adulto fueron Xu y cols (Xu et al., 2005), quienes inyectaron icv (intra-cerebroventricular) un adenovirus asociado al 3V, el cual al infectar células endimarias, expresaba una proteína reportera. Se mostró que algunas de las células marcadas migraron del ventrículo hacia el parénquima hipotalámico, donde luego de cuatro semanas se diferenciaron a neuronas maduras y se integraron a la red neuronal existente. Este efecto fue estimulado por la infusión de factores de crecimiento e identificado por la administración de BrdU, lo que demostró también un aumento en la proliferación de

los tanicitos (Xu et al., 2005). Sin embargo, aún no se ha descrito un mecanismo molecular, que permita definir el evento neurogénico, tal como se ha realizado en la ZSG, desde la etapa proliferativa hasta la generación y maduración de nuevas neuronas.

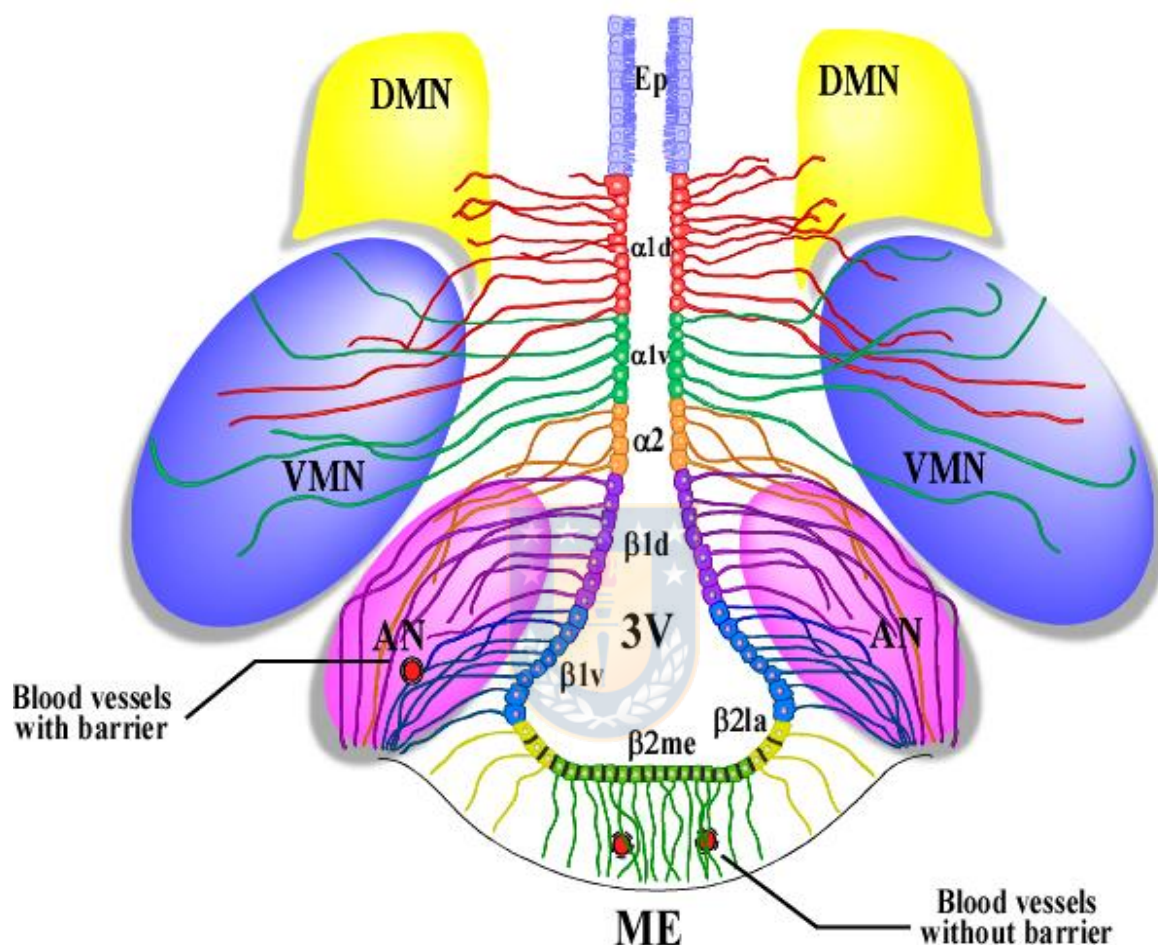


Figura 3. Representación esquemática del hipotálamo basal.

Células endimarias delimitan el tercer ventrículo (3V), en la zona dorsal lo hacen los endimocitos ciliados (Ep), mientras que, en la zona ventral, lo hacen los tanicitos. Tanicitos $\alpha 1$ extienden sus procesos hacia los núcleos dorsomedial (DMN) y ventromedial (VMN), mientras que los tanicitos $\alpha 2$ y $\beta 1$ lo hacen en dirección del núcleo arqueado (AN), donde se encuentran poblaciones de neuronas orexigénicas y anorexigénicas en cercanía a vasos sanguíneos. Por otra parte, tanicitos $\beta 2$ delimitan el piso del 3V y están estrechamente unidos entre sí, por medio de uniones ocluyentes y así forman una barrera entre eminencia media

(ME) y el líquido cefalorraquídeo del 3V. Los procesos de estas células se prolongan hacia la ME, donde establecen contacto con capilares fenestrados allí presentes. Modificado de (Elizondo-Vega et al., 2015).

2.2 Complejo dorsal vagal como nicho neurogénico

El complejo dorsal vagal (CDV) es el principal centro integrativo del sistema nervioso autónomo, se compone de un conjunto de tres núcleos ubicados en la zona caudal del tronco cerebral, en la parte más posterior del cuarto ventrículo (4V); se le atribuye control sobre funciones cardiovasculares, respiratorias y reflejos gastrointestinales (Blessing, 1997). Los núcleos anatómicos que comprende el CDV son tres (Figura 4); i) el núcleo del tracto solitario (NTS), una zona viscerosensorial que integra información de estructuras viscerales como los intestinos, el corazón y los pulmones, esta información es procedente principalmente del nervio vago; ii) el núcleo dorso motor del vago (DMV), el cual contiene neuronas motoras viscerales colinérgicas que reciben la mayor parte de su información del NTS e inerva directamente estructuras viscerales como la pared intestinal; finalmente iii) el área postrema (AP), un OCV aledaño al 4V, ubicado en la parte superior del NTS y por tanto también recibe una entrada de información desde el nervio vago (Grijalva & Novin, 1990).

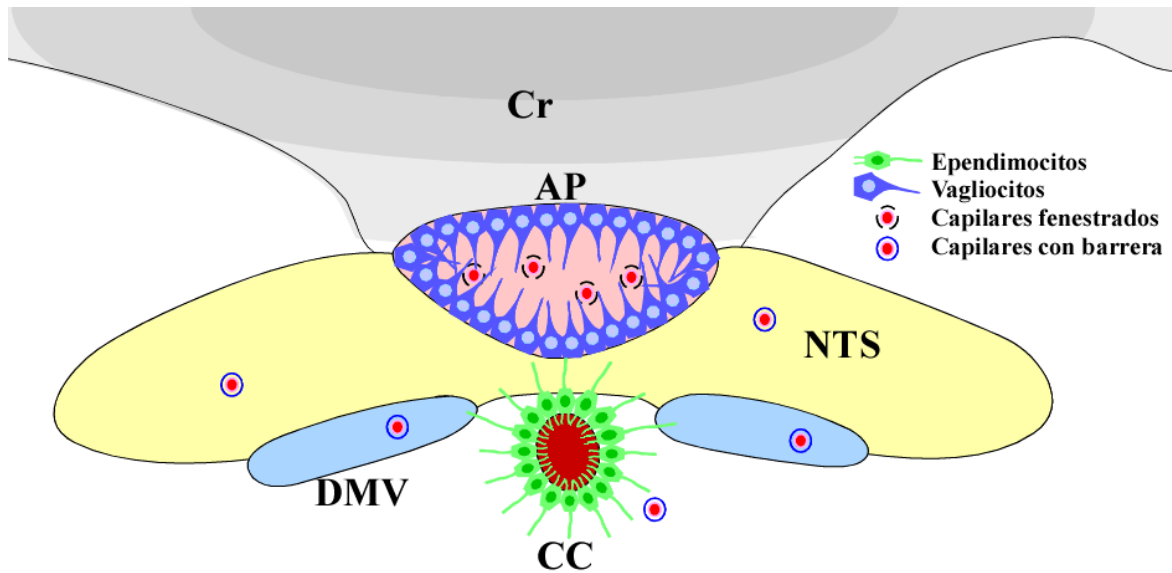


Figura 4. Representación esquemática del complejo dorsal vagal (CDV).

En la zona caudal del tronco cerebral, bajo el cerebelo (Cr), se encuentra el CDV, conformado por diferentes estructuras como el área postrema (AP), donde se encuentran los vagliocitos, quienes se encuentran estrechamente unidos por uniones ocluyentes, éstos extienden su único proceso hacia capilares fenestrados dentro del AP. Los vagliocitos forman una barrera entre AP y el núcleo del tracto solitario (NTS). El canal central (CC) está delimitado por células endimarias que toman contacto con vasos capilares o con los núcleos neuronales aledaños; NTS o el núcleo dorsomotor del vago (DMV).

El proceso de neurogénesis no ha sido ampliamente abordado en CDV como en hipotálamo o los nichos neurogénicos convencionales; sin embargo, en el AP se han identificado células de tipo glía radial denominadas vagliocitos (Guillebaud et al., 2017), similares a los tanicitos en morfología, los cuales expresan también GFAP, Sox2, nestina y vimentina, marcadores típicos de células PNs en hipotálamo, ZSV y ZSG (Pecchi et al., 2007). Los vagliocitos son células poco caracterizadas, pero se sabe que entre ellas establecen uniones ocluyentes y comunicantes, de manera que forman una barrera de difusión en el límite del AP y el parénquima del NTS (Langlet, Mullier, et al., 2013), además tienen la capacidad de formar neuroesferas (Charrier et al., 2006). En AP se ha encontrado aumento en la proliferación de PNs como respuesta a la inyección en el 4V de factores de crecimiento como bFGF y EGF, evidenciado por la presencia de células BrdU⁺ y Ki67⁺ que colocalizaron con GFAP y nestina. Se ha identificado presencia de neuronas inmaduras en NTS, gracias a la colocalización de BrdU y la proteína Dcx (Pecchi et al., 2007), así como de la molécula de adhesión neuronal PSA-NCAM (Bonfanti & Theodosis, 1994). Debido a que no se han realizado experimentos de rastreo de linaje usando animales genéticamente modificados o la inyección de un adenovirus con proteína reportera, no ha sido posible conocer con certeza la procedencia de estas nuevas neuronas; los vagliocitos al ser un tipo de glía radial, se convierten en un probable candidato para asumir el rol de PN en CDV, gracias a su cercanía e interacción con el NTS (Charrier et al., 2006; Pecchi et al., 2007).

En la zona caudal del 4V, este se reduce tras la presencia del AP y el LCR fluye a través del canal central (CC) en el CDV y la médula espinal, esta cavidad está delimitada por células endoteliales biciliadas con capacidad de proliferación, lo que es esencial para el crecimiento

de la médula espinal (Alfaro-Cervello et al., 2014). Se ha discutido sobre el papel de estas células como posible PNs en el CC; en condiciones normales estas células son vimentina positivas (Pecchi et al., 2007), pero nestina y GFAP negativas (Alfaro-Cervello et al., 2014). Sin embargo, recientemente se demostró que al recibir una inyección icv de factor de crecimiento epidérmico y el factor de crecimiento de fibroblastos (EGF y FGF2 por sus siglas en inglés, respectivamente), no solo se favorece su proliferación, sino que además algunas de estas nuevas células expresan GFAP, nestina, Sox2 y Pax6 (Furube et al., 2020). Lo anterior aporta nueva y valiosa información al campo de la neurogénesis, pues indica la presencia de un segundo nicho neurogénico en CDV. Si bien, el potencial neurogénico de células del AP y CC, ha sido comprobado, aún no se aborda desde estímulos como el consumo de diferentes dietas, ni se ha descrito un posible mecanismo en cuanto a proliferación, migración y diferenciación celular, tal como en la ZSG y ZSV.

3. Neurogénesis adulta como respuesta a factores de la dieta en hipotálamo y CDV

El hipotálamo y el CDV comparten varias características que los posicionan como centros importantes en la regulación alimenticia. Entre estas características destacan la presencia de células con receptores para leptina amilina e insulina (Wilkinson & Imran, 2019), presencia de mecanismos capaces de *sensar* los niveles de glucosa gracias a la presencia de transportadores de glucosa de alta capacidad GLUT2 (Garcia et al., 2003; Lamy et al., 2014), presencia de neuropéptidos mediadores en el restablecimiento del balance energético. Tanto en el NA como en el NTS, existen neuronas que secretan el péptido pro-opiomelanocortina (POMC) (Joseph et al., 1983), permitiendo relacionar estas dos estructuras, pues son las únicas en el cerebro que expresan esta proteína con efecto anorexigénico. Si bien, la expresión de la proteína r-agouti (AgRP), con efecto orexigénico, se restringe al NA del

hipotálamo, en CDV se ha encontrado expresión de otro péptido, secretado por el mismo tipo de neuronas orexigénicas, el cual se relaciona con el mismo efecto de sensación de hambre y es el neuropéptido Y (NPY; (Bagnol et al., 1999). De esta manera, tanto en hipotálamo como en CDV coexisten subpoblaciones neuronales que permiten generar cambios en el comportamiento alimenticio.

La existencia de neurogénesis en el hipotálamo y el CDV de roedores adultos, ha sido asociada al comportamiento alimenticio, especialmente por su relación con vías sensoriales homeostáticas, balance energético e inflamación (Bennett et al., 2009; Schwartz et al., 2000). Se ha demostrado que la neurogénesis y la capacidad de proliferación y diferenciación celular en mamíferos, se potencia con factores que favorecen la supervivencia y el crecimiento neuronal, tales como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF por su sigla en inglés, (Pencea et al., 2001), el factor neurotrófico ciliar (CNTF por su sigla en inglés, (Kokoeva et al., 2005), EGF y FGF (Reynolds & Weiss, 1992). Interesantemente, también se ha demostrado presencia de neurogénesis hipotalámica tras someter a los animales al consumo de una dieta rica en grasas (HFD, por sus siglas en inglés) durante 60 días (Kokoeva et al., 2005).

Como prueba de que ocurre neurogénesis en OCV, se ha establecido la formación de neuroesferas mediante ensayos *in vitro* (Reynolds & Weiss, 1992), lo cual es característica también de proliferación, autorrenovación y potencial de diferenciación celular. Gracias a esto es posible identificar células con potencial neurogénico, usando marcadores característicos de PNs como: nestina, vimentina, Sox2 y GFAP, en células aisladas y cultivadas *in vitro* por varias semanas hasta que forman dichas neuroesferas (Hourai & Miyata, 2013).

El efecto en la proliferación de PNs ha sido evaluado en ratas a través de pruebas de comportamiento alimenticio y en respuesta a estrés crónico, en el 3V y 4V, respectivamente. En el hipotálamo se ha demostrado que HFD aumenta la proliferación y neurogénesis (Kokoeva et al., 2005; Lee et al., 2012). En el CDV se ha demostrado que el estrés por inmovilidad, que además genera pérdida de peso y menor ingesta, disminuye la proliferación en CDV (Chigr et al., 2009). Adicionalmente, factores hormonales permiten relacionar funcionalmente estas distantes estructuras, pues existen células en el hipotálamo y el CDV que son blanco de éstos y están relacionadas con la mantención del balance energético y la neurogénesis. Péptidos como amilina y leptina son secretados por páncreas y adipocitos respectivamente, han sido identificados en CDV e hipotálamo, donde existen células con receptores específicos para estas hormonas, ligadas con la sensación de saciedad (Liberini et al., 2016), la maduración de conexiones neuronales, el control del metabolismo y el peso corporal en la adultez (Abegg et al., 2017).

La consecuencia del suministro de una dieta alimenticia específica sobre la proliferación de PN del hipotálamo, se dilucidó a partir de un protocolo que incluía un grupo de ratones sometidos a HFD, en conjunto con la infusión icv de factores que promovieron la proliferación celular, como BDNF, y un grupo de ratones sometidos a la misma dieta pero que no fueron infundidos (Gouazé et al., 2013; Lee et al., 2012). Sin embargo, no han sido realizados estudios similares que evidencien una respuesta neurogénica a factores provenientes de la dieta en CDV.

Lee y col (2012) identificaron la presencia de un nicho neurogénico en el hipotálamo adulto, células en EM que habían proliferado recientemente (BrdU+), expresaban el marcador temprano de diferenciación neuronal, Hu. La presencia de células que colocalizaban estos

marcadores fue estadísticamente mayor (para animales P45 y P75), en ratones que habían consumido HFD durante 30 días, comparado con ratones que consumieron comida control durante el mismo tiempo. Adicionalmente, con un experimento de rastreo de linaje, pudieron asociar el origen de estas nuevas neuronas a los tanicitos $\beta 2$. Para ello, utilizaron ratones transgénicos Nestina:CreER^{R26stop}YFP, con los cuales se estableció una marca específica y permanente para tanicitos y su progenie, debido a la expresión de la proteína fluorescente amarilla (YFP, de sus siglas en inglés), bajo el promotor rosa26. Neuronas Hu⁺ y nestina⁺ fueron identificadas en EM de ratones transgénicos P35, sugiriendo así que tanicitos $\beta 2$ son altamente neurogénicos (Lee et al., 2012).

En la misma línea, Gouazé y col (2013) demostraron que la neurogénesis regula el peso corporal; ellos utilizaron un grupo de ratones alimentados con HFD, a los que les fue inhibida la proliferación celular basal, al infundir icv citosina arabinosa (AraC) y un grupo alimentado con HFD sin administrar AraC. Al cabo de la tercera semana, el primer grupo presentó un incremento de peso significativamente mayor que los animales donde la proliferación no fue inhibida (Gouazé et al., 2013). Estos resultados permiten sugerir que la proliferación celular en el hipotálamo es crucial para mantener el peso corporal en respuesta a factores de la dieta (Recabal et al., 2017). Para evaluar proliferación celular se utilizó BrdU, el cual fue detectado en células positivas a este nucleótido usando anticuerpos anti-BrdU, en la pared ventricular y el parénquima. Usando marcadores característicos de distintos linajes celulares, se observó que las neuronas recientemente generadas, se derivaron de los tanicitos y además fueron positivas para la proteína Dcx, la cual se encuentra exclusivamente en neuronas en estado de migración, indicando que estas nuevas neuronas son capaces de migrar a través del hipotálamo previo a su maduración (células BrdU⁺ y NeuN⁺ en NA). También demostraron

que un gran número de estas células maduran a neuronas POMC en ratones que recibieron HFD por 3 semanas (Gouazé et al., 2013).

Las evidencias señalan que la neurogénesis postnatal forma parte de un mecanismo adaptativo que restaura el balance energético y las conexiones neuronales (Recabal et al., 2017). Sin embargo, este evento sólo ha sido comprobado exponiendo roedores a una dieta rica en grasas, excluyendo el estudio de otras dietas hipercalóricas como la rica en sacarosa. Adicionalmente, no existe asociación del efecto de un cambio de dieta y la proliferación de tanicitos o vagliocitos en estas áreas que controlan funciones fisiológicas, relacionadas principalmente con la nutrición y el comportamiento alimenticio.

El presente trabajo pretende estudiar la influencia de una dieta rica en sacarosa sobre la proliferación de tanicitos y vagliocitos. Esto fue abordado mediante inyección ip de BrdU, y análisis inmunohistoquímico en hipotálamo y CDV, además del procesamiento, análisis estadístico y comparación de expresión diferencial de genes neurogénicos, a partir de datos transcriptómicos de *single cell RNAseq*, para hipotálamo de animales en distintas condiciones alimenticias.

II. Hipótesis y objetivos

Hipótesis

La proliferación y expresión de marcadores neurogénicos aumenta por una dieta aguda, alta en sacarosa, en tanicitos, vagliocitos y células del canal central

Objetivo general

Determinar si tanicitos, vagliocitos y células del canal central comparten características de células precursoras neuronales que les permitan responder a factores de la dieta.



Objetivos específicos

Analizar el efecto de una dieta rica en sacarosa sobre el potencial proliferativo de tanicitos, vagliocitos y células del canal central.

Caracterizar la expresión de genes *gluco-sensores* y neurogénicos en tanicitos, mediante análisis transcriptómico para animales en diferentes condiciones energéticas y alimenticias.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Declaración bioética para trabajo con animales experimentales

Todos los estudios que se llevaron a cabo utilizando ratas y ratones, fueron aprobados y revisados por el Comité de Ética Animal de la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (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, INS. Los animales se mantuvieron en cajas individuales con un ciclo de 12 horas luz/oscuridad y con acceso a comida y agua *ab libitum*.

2. Exposición de los animales a dieta rica en sacarosa

Ratas Sprague Dawley (P46) fueron alimentadas por 8 días con una dieta rica en sacarosa (HSD; 58R1 AIN-76A 11 % *Fat Energy/Sucrose/Blue*, Research Diet) o con una dieta control (ND; 58R0 AIN-76A 11 % *Fat Energy/Corn Starch/Yellow*, Research Diet). La dieta rica en sacarosa entrega un 74.3 % de su energía (Kcal/g) proveniente de los carbohidratos, valor cercano al 73.7 % aportado por la dieta control, sin embargo, en la primera dieta la sacarosa representa el 61 % de los carbohidratos totales, mientras que en la segunda dieta este azúcar es reemplazado por almidón de maíz. Cada día se determinó la cantidad de alimento ingerido y se llevó registro del peso corporal.

Posteriormente, los animales fueron anestesiados con una mezcla de ketamina-xilacina (90 mg/Kg; 10 mg/Kg), una vez sedados se perfundieron intravascularmente, inicialmente con solución tampón de fosfatos (PBS) fría (17mM NaH₂PO₄, 83mM NaH₂PO₄ 2H₂O, 15mM

NaCl, pH 7.4) y luego con solución de para-formaldehído (PFA; 4 % p/v en PBS) hasta eliminar cualquier residuo de fluido sanguíneo. Finalmente, se extrajo el cerebro completo, se disecaron hipotálamo y tronco posterior y se llevaron a inmersión por 24 horas a 4°C en la misma solución de PFA. Transcurrido este tiempo se llevaron a inmersión en solución de sacarosa 30 % p/v durante 96 horas para mejorar la consistencia de los tejidos y facilitar así su posterior tratamiento.

3. Determinación de glicemia

Para evaluar cambios en la glicemia relacionados con el tratamiento de dietas a mediano 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 glicemia, inducida por la dieta rica en sacarosa, las ratas fueron sometidas a ayuno 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 a la vena de la cola. La glicemia fue determinada con glucómetro *Accu-Chek Go* (Roche).

4. Preparación y administración de BrdU

BrdU en estado sólido (Sigma Aldrich, Alemania) fue disuelto en solución salina estéril (NaCl 0.9 % p/v, pH 7.3) y alicuotado en tubos de 1.5mL, de acuerdo con el número de dosis necesarias. Las alícuotas se almacenaron a -20°C hasta el momento de la inyección. Al segundo día del cambio de dieta se inyectaron intraperitonealmente (ip) 200µL de solución de BrdU (50mg/Kg; (Wojtowicz & Kee, 2006) por 7 días consecutivos.

5. Procesamiento histológico e inmunohistoquímica

Luego de fijar tejidos de hipotálamo y CDV en PFA 4 % p/v, se generaron secciones coronales por vibrátomo (Leica VT1200), con grosor de 40µm, las cuales fueron mantenidas en PBS (pH 7.4) a 4°C hasta el momento de la inmunohistoquímica. Para esta última, las muestras seleccionadas se lavaron con solución tampón de Tris-fosfato (84mM Na₂HPO₄, 35mM KH₂PO₄, 120mM NaCl, 10mM Tris, pH 7.8) y luego se dejaron en HCl 2M a 37°C por 15 min para exponer el BrdU incorporado al ADN. Posteriormente, los cortes fueron lavados tres veces por 5 minutos con Tris-fosfato y posteriormente se incubaron con 50µL de mezcla de anticuerpos primarios anti-BrdU (Abcam, dilución 1:2000), anti-nestina (Abcam, dilución 1:2000) o anti-vimentina (Milipore, dilución 1:800) durante 16 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, los cortes se lavaron 3 veces con Tris-fosfato y se incubaron con los respectivos anticuerpos secundarios (Jackson Immunoresearch) acoplados a fluoróforos en dilución 1:200 por dos horas. Como tinción nuclear se utilizó TOPRO-3 (Life Technology, dilución 1:1000). Todos los anticuerpos fueron diluidos en solución Tris-fosfato con albúmina de suero bovino (BSA) 1% y Tritón X-100 0.2% e incubados en cámara húmeda. Las muestras fueron montadas en portaobjetos con 15µL de solución acuosa de montaje para muestras fluorescentes (Dako).

6. Obtención y procesamiento de imágenes

Tejidos de hipotálamo y CDV teñidos por inmunohistoquímica, fueron analizados por microscopía confocal (microscopio Zeiss, LSM700), el cual cuenta con tres líneas de láser para detectar tres canales distintos. Se adquirieron imágenes usando el software ZEN (Black edition, Zeiss) en diferentes planos del eje Z, de acuerdo con la intensidad de fluorescencia, y tales imágenes fueron superpuestas para generar un archivo con la proyección de máxima

intensidad. Estas últimas fueron procesadas con el software Fiji (de ImageJ), con el cual se obtuvieron las imágenes para su posterior análisis y manipulación.

7. Cuantificación de células BrdU positivas

Dos investigadores participaron en el conteo de estas células. Se consideraron células BrdU⁺ todas aquellas que colocalizaron con el marcador nuclear TOPRO-3. Se determinó el promedio de ambos recuentos y este valor se consideró para los análisis respectivos cuando el margen de error entre ellos no superó el 15 %. En este recuento, se utilizaron al menos 4 secciones coronales (tanto de hipotálamo como de CDV), por cada uno de los nueve animales en la determinada condición alimenticia.

8. Cultivos celulares

Todos los cultivos celulares fueron mantenidos en incubadora de células a 37°C, con 5 % de CO₂ y 95 % de humedad. Los procedimientos de obtención y expansión celular fueron realizados en un gabinete de seguridad biológica clase II y las líneas celulares fueron almacenadas por congelamiento con DMSO 10 % v/v en medio de cultivo con suero bovino fetal (SBF) al 10 % v/v, en nitrógeno líquido.

8.1 Cultivo primario de tanicitos

Ratas en día post natal 1 (P1) fueron rápidamente decapitadas, el cerebro fue removido y la región cercana al 3V fue diseccionada en PBS 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 % v/v de SBF, L-glutamina 2mM, penicilina 100U/mL y streptomycin 100mg/mL (Thermo Fisher Scientific). Las muestras fueron disgregadas mecánicamente y las células fueron sembradas en frascos de cultivo de 25cm² (T25) cubiertas con poli-L-lisina 0.2mg/mL (Sigma-Aldrich) a una densidad de

120000 células/cm². Las células se mantuvieron en el mismo frasco de cultivo durante dos semanas y el medio se renovó cada tercer día. Los tanicitos adheridos en monocapa fueron lavados dos veces con PBS y tratados con tripsina 0.25 % -EDTA 0.2 % p/v por 3 minutos a 37°C. Las células fueron disgregadas mecánicamente y traspasadas a un tubo de centrifuga de 15mL para posterior extracción de ARN.

8.2 Cultivo de células HEK-293A

Esta línea celular derivada de riñón humano embrionario se encuentra transfectada establemente con el gen E1 adenoviral (tipo 5), fue utilizada para la producción y amplificación del adenovirus. Las células en pasajes tempranos (3-10) fueron cultivadas en placas Petri de 10cm de diámetro (Falcon®) con 10mL de medio de cultivo DMEM 25mM de glucosa (Gibco® Invitrogen, Life Technologies) suplementado con 10% v/v de SBF, penicilina 100 U/mL, estreptomycin 100µg/mL y fungizona 2.5 µg/mL con cambio de medio de cultivo cada 2-3 días. Para los siguientes pasajes en expansión adenoviral (11-16), las células se cultivaron en placas de petri de 15cm de diámetro con 15mL del mismo medio de cultivo descrito anteriormente. Cuando las células en cultivo alcanzaron un 90% de confluencia, aproximadamente, fueron expandidas utilizando densidades de siembra de 8000 células/cm². El recuento y la estimación de la viabilidad celular fueron realizados por el método de exclusión con azul de tripán 0.2 % p/v.

8.3 Cultivo de células HEK-293T

Esta línea celular derivada de riñón humano no presenta la transfección del gen E1 adenoviral, por tanto, es incapaz de producir o amplificar el adenovirus y fue ideal para ser utilizada en la titulación del adenovirus. Las células fueron cultivadas en placas Petri de 10cm de diámetro, con adición de 10mL de medio DMEM 25mM glucosa, suplementado con SBF

10% v/v, penicilina 100 U/mL, estreptomina 100 µg/mL, glutamina 2 mM y fungizona 2.5 µg/mL, cambiando el medio de cultivo cada tercer día. Se utilizaron densidades de siembra de 8.000 células/cm², y se mantuvieron hasta alcanzar un 80-90% de confluencia. El recuento y la estimación de la viabilidad celular fueron realizados por el método de exclusión con azul de tripán 0.2 % p/v.

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

9.1 Extracción ARN total

Se obtuvo ARN total a partir de cultivo primario de tanicitos hipotalámicos y de la disección manual del área postrema, desde cortes gruesos (300µm) de CDV. El ARN se extrajo de acuerdo con el método de tiocianato de guanidina fenol/cloroformo, homogenizando las muestras en 500µL de Trizol® e incubándolas 5 min a temperatura ambiente. Luego, las muestras fueron tratadas con 200µL de cloroformo, agitadas vigorosamente por 15 segundos e incubadas a temperatura ambiente por 3 min. Las muestras fueron centrifugadas a 12000g por 15 min a 4°C para separar en fases. Se aisló la fase acuosa, a la que se agregaron 300µL de isopropanol por cada muestra, se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000g por 5 minutos a 4°C. El sobrenadante fue descartado y el pellet resultante se lavó dos veces con etanol 70 %, centrifugando a 12000g por 10 minutos cada vez. Finalmente, el pellet se resuspendió en 10µL de agua libre de ARNasa y se cuantificó su concentración, midiendo absorbancia a 260nm y se estimó su pureza de acuerdo con la relación 260nm/280nm.

9.2 Transcripción reversa del ARN total (RT)

Se describe a continuación el procedimiento para la síntesis de ADN complementario (ADNc), basado en las instrucciones del fabricante con respecto a la concentración del ARN

total extraído. Se utilizó para ello el kit de síntesis de ADNc iScript (BioRad) y termociclador Mastercycler (Eppendorf). En un tubo para PCR, se agregó el volumen de ARN total que contenía 1µg de ARN, en adición con 4µL de mezcla para reacción iScript, 1µL de enzima transcriptasa reversa iScript y el volumen necesario de agua libre de ARNasa para lograr un volumen total de 20µL. El programa de incubación consistió primero en 5 min a 25°C, luego de 20 min a 46°C, seguido de 1 min a 95°C y finalmente almacenar a 4°C.

9.3 Amplificación del ADNc por PCR

La amplificación de ADNc se llevó a cabo en un termociclador Mastercycler (Eppendorf) para una mezcla que contenía Tris-HCl 10mM (pH 8.8), KCl 50mM, MgCl₂ 1,5mM, mezcla de dNTPs (0.2mM de cada uno) set de partidores específicos (0.2µM de cada uno) (Tabla 1), Taq ADN polimerasa 0.31U (ThermoScientific) y 1µL del producto de transcripción reversa, completando a un volumen final de 11.5 µL con agua libre de ARNasa. El programa de incubación consistió 95°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 95°C por 30s, 55°C por 30s y 72°C por 30-40s, y una extensión final de 72°C por 7 min. La síntesis de todos los ADNc fue corroborada utilizando partidores específicos para β-actina. Los partidores utilizados para amplificar los distintos genes fueron diseñados utilizando el software AmplifX (versión 2.0.7), teniendo en cuenta su T_m, el porcentaje de GC, la formación de dímeros y estructuras secundarias.

9.4 Electroforesis en gel de agarosa

La separación de fragmentos de ADN obtenidos fue realizada en geles de agarosa al 1%. La solución tampón empleada para la electroforesis fue TAE (Tris-Ácido Acético EDTA; Tris-HCl 40mM, ácido acético 30mM y EDTA 1mM; 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 los diferentes productos de amplificación en el gel de agarosa, se utilizó un equipo transiluminador UV y fotodocumentador (VilberLourmat PMM9A, Francia).

9.5 RT-qPCR

La reacción para RT-PCR en tiempo real se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante con el kit *Brilliant II SYBR Green qPCR Master Mix* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). En un tubo para PCR se preparó la mezcla con un volumen total de 20 μ L, la cual contenía 2 μ L de ADNc y 500nM de los partidores correspondientes (Tabla1). Las muestras se denaturaron inicialmente a 95°C por 10 min, luego se realizaron 40 ciclos de 95°C por 30s, 60°C por 15s y 72°C por 15s, en un termociclador Mx3000P (Agilent Technologies, Inc.). La cuantificación de la expresión relativa se realizó comparando el número de ciclos requeridos para amplificar cada gen sobre el ciclo umbral (C_t) con relación al gen de referencia ciclofilina (ΔC_t).



Tabla 1. Partidores utilizados en RT-PCR convencional y cuantitativo.

Nombre	Sentido 5'-3'	Antisentido 5'-3'	Producto (pb)
Pax6	GGTATTACGAGACTGGCTCCAT	GTCTCGGATTTCCCAAGCAAAG	137
Ascl1	CCGAAGTATGATGCGCTGCAAA	AGCGTCTCCACCTTGCTCATC	199
Clcf1	AAAAGGTACAGTGGGCACCAAGAG	AACTGAGTGGTTACTGGCAAGTGG	116
FGF18	CAGTGGGAAGCACATTCAAGTCCT	TCTCTTTGCCCTTGATCCGGACTT	128
FOXN4	TCTATGCGGCCTATTCCACTGTCA	CAAAGCAGAGCAATGGGCTTGTTTC	185
Rcor2	AGCATGAAGCAGACCAACAGCA	TCCAGCGGGAGTTGAACTTGGTAT	100
β -Actina	GCTGCTCGTCGACAACGGCTC	CAAACATGATCTGGGTCATCTTCTC	353
Ciclofilina	ATAATGGCACTGGTGGCAAGTC	ATTCCTGGACCCAAAACGCTCC	239

10. Generación de adenovirus

10.1 Amplificación de vectores adenovirales

El laboratorio cuenta con bacterias químicamente competentes E.coli One Shot® TOP10 (Invitrogen), previamente transformadas con el vector adenoviral pDC311.2-OFF-tdTomato o con el plásmido pBHGloxΔE1,3Cre. Para su amplificación, cada una de estas variantes bacterianas fue inoculada en medio LB/ampicilina (50μg/mL) y luego incubados en agitación (225 rpm) a 37°C por 16 horas. Se purificó al ADN plasmidial con el kit StrataPrep Plasmid Miniprep Kit (Agilent Technologies), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

10.2 Ensamble y titulación de adenovirus

El Adenovirus Ad OFF-tdTomato fue construido a partir de la recombinación del vector adenoviral pBHGloxΔE1,3Cre con el vector pDC311.2-OFF-tdTomato. Para lo anterior, se sembraron 10000 células/cm² células HEK-293A (Invitrogen) en placas de 6 pocillos (Falcon) y se co-transfectaron los plásmidos, en relaciones molares de 1:4 (para pBHGloxΔE1,3Cre) y 1:6 (para pDC311.2-OFF-tdTomato), con lipofectamina 3000 (Invitrogen) cuando las células se encontraban en un 70% de confluencia, de acuerdo con instrucciones del fabricante. Las células se mantuvieron en cultivo por 10 días con adición de medio cada 3 días. Se seleccionaron los pocillos que presentaban mayor efecto citopático y se recolectó el adenovirus mediante lisis celular por golpe térmico. Para ello, las células fueron desprendidas de la placa y traspasadas a un tubo de 15mL, rápidamente congeladas en nitrógeno líquido y llevadas de inmediato a 37°C en baño termoregulado hasta total descongelamiento, para finalmente ser agitado en vortex; se repitió el procedimiento 2 veces. Los restos celulares fueron eliminados mediante centrifugación a 5000 g por 5 min, posteriormente se filtró el sobrenadante, con filtro de poro 0.45μm y se adicionó a células

HEK 293A, previamente cultivadas en placas de 6 pocillos a un 70% de confluencia, para ser amplificado. Al cabo de 1 semana todas las células de los pocillos presentaban efecto citopático y los virus fueron colectados y re-amplificados en placas de 10cm y finalmente en placas de 20cm de diámetro. El adenovirus fue titulado en células HEK 293T de acuerdo con el protocolo descrito para el kit Adeno-X Rapid Titer (Clontech), con base en la expresión del gen reportero tdTomato. Se determinó que el virus tenía un título aproximado de $1,2 \times 10^9$ unidades infecciosas/mL. El virus se alicuotó y almacenó a -80°C para posteriores experimentos.

11. Transducción *in vivo* y aislamiento de tanicitos y vagliocitos

11.1 Inyección del adenovirus

Ratones macho adultos C57BL6/J de 8 semanas fueron anestesiados ip con una mezcla de ketamina (90 mg/Kg), xilacina (10 mg/Kg) y Pacifor (10 mg/Kg), posteriormente, mediante operación estereotáxica se inyectaron 10 μL del adenovirus AVOFF-tdTomato al ventrículo lateral (-0.7mm anterior-posterior, 1.3mm medio-lateral y -2.1mm dorsal-ventral), a una velocidad de 2 $\mu\text{L}/\text{min}$. Luego de la cirugía, se inyectó subdérmicamente analgésico tramal (2mg/Kg) para reducir dolor y los animales se alojaron individualmente durante 96 horas, como tiempo total de recuperación y transducción, como fue estandarizado previamente en el laboratorio de Biología Celular (Barahona et al., 2018; Elizondo-Vega et al., 2020).

11.2 Disgregación de tejidos

Ratones transducidos con el adenovirus Ad OFF-tdTomato, fueron anestesiados ip con una mezcla de ketamina (90 mg/Kg), xilacina (10 mg/Kg) y azepromacina (10 mg/Kg) y luego de sedados se practicó eutanasia por dislocación cervical. El cerebro fue removido y disectado hipotálamo y CDV, los cuales se incubaron en tubos de 15mL diferentes, con 1mL

de tripsina 0,25 % - EDTA 0.2 % p/v durante 20 minutos a 37°C y, en agitación (230rpm). Posteriormente se resuspendió la solución mecánicamente para disgregar tejidos y se adicionó medio RPMI (Gibco) con 10% SBF para detener la reacción enzimática. La suspensión de células se pasó por tamiz para células para descartar tejido conectivo y la solución resultante se centrifugó a 400g por 5 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el pellet de células fue resuspendido en 3mL de solución percoll (GE Healthcare) al 40 % en medio RPMI, para luego ser agregado a una solución de percoll 70 % en medio RPMI, formando así un gradiente de densidad. La suspensión anterior se centrifugó por 30 min a 1000g y temperatura ambiente, las células fueron recolectadas de la interfase y lavadas con PBS.

11.3 Aislamiento de células por fluorescencia

La suspensión de células que se encontraba en PBS, fue examinada en un citómetro de flujo BD *FACS Aria Fusion* (USA) y analizada con la ayuda del software FlowJO 10, para realizar la selección de células activada por fluorescencia (FACS, por sus siglas en inglés). Las células fueron clasificadas por tamaño y granularidad y las poblaciones de interés en hipotálamo y CDV fueron identificadas por el filtro que detecta eventos cercanos a una longitud de onda de 581nm, asignados a la proteína tdTomato transducida previamente en estas células. La recolección de las células aisladas por el citómetro se hizo directamente en SBF filtrado sin diluir.

11.4 Extracción de ARN total de células sorteadas

La extracción de ARN total se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante y de acuerdo con el tamaño de la muestra, usando el kit RNAqueous®-Micro- Kit Micro Scale RNA Isolation Kit. Las células extraídas por FACS se centrifugaron a 400g por 5 min a temperatura

ambiente y resuspendidas vigorosamente en solución de lisis. El lisado obtenido anteriormente se mezcló con etanol 100% agitando en vortex y fue centrifugado para retirar la mezcla y así el ARN quedara unido al microfiltro. Finalmente se realizaron lavados y eluciones sucesivas con las soluciones pertenecientes al kit de extracción hasta obtener y cuantificar el ARN total resultante.

12. Análisis bioinformático de datos transcriptómicos

12.1 Obtención de datos transcriptómicos

Los datos de secuenciación de ARN para células simples (*single-cell RNA-seq*, por sus siglas en inglés) pertenecientes a Campbell y cols (Campbell et al., 2017), fueron descargados del repositorio público de datos genómicos (GEO, del inglés *The gene Expression Omnibus*), bajo el código de acceso GSE93374, utilizando el programa SRA *Toolkit* (versión 2.3.2), el cual también se utilizó para convertir los archivos en formato *fastq* con el mismo programa. Se obtuvieron datos provenientes de ratones en diferentes condiciones alimenticias; en ayuno de 24 horas, alimentados con comida estándar (4 % de grasa), comida con 10% de grasa y comida con 60% de grasa. El porcentaje es referido a la cantidad de calorías aportada por los ácidos grasos, con respecto a las calorías totales consumidas en la dieta.

12.2 Procesamiento bioinformático de datos de *scRNA-seq*

Inicialmente se realizó un análisis de control de calidad para cada archivo descargado, usando el programa FastQC (versión 11.9), de acuerdo con los resultados, se cortaron y filtraron datos con CutAdapt (versión 2.1), para luego identificar los datos que correspondían a células reales con UMI-Tools. Los datos resultantes fueron alineados contra el genoma de referencia (*Mus musculus*; GRCm38.p6, ensembl.org) con el programa STAR (versión 2.7). Finalmente, se realizaron análisis de componentes principales y de expresión diferencial de

genes en el programa R (versión 3.6), utilizando el paquete de datos DESeq2. La generación de gráficos en R fue posible usando paquetes de datos como ggplot2, gplots y pheatmap.

13. Análisis estadístico

Los valores de la cuantificación de células BrdU⁺ fueron normalizados con respecto al volumen de tejido en hipotálamo y CDV (μm^3), previo al análisis estadístico. Para cada grupo experimental, los resultados fueron expresados como el promedio \pm error estándar de la media (SEM), siendo n el número de animales utilizados. Las diferencias entre poblaciones fueron evaluadas a través del t-test o ANOVA de una vía, con test de comparación múltiple de Bonferroni. Se consideró diferencia significativa cuando el valor de $p < 0,05$, utilizando el software de análisis de datos GraphPad Prism 6.0.



IV. RESULTADOS

1. Caracterización histológica del Complejo Dorsal Vagal

Puesto que es la primera ocasión en que el laboratorio aborda una investigación en torno al CDV y teniendo en cuenta que es una región cerebral poco caracterizada, fue necesario realizar un estudio histológico inicial utilizando cortes finos ($7\mu\text{m}$ de grosor). Estas secciones coronales de ratones adultos fueron seleccionadas cada $35\mu\text{m}$ en el eje anteroposterior, dentro del rango de bregma de -6.95 a -7.67mm (Fig. 5), de acuerdo con el atlas estereotáxico del cerebro de ratón (Paxinos & Franklin, 2019). Como se muestra en la figura 5, esta región puede ser definida por la presencia del cuarto ventrículo (4V) y del canal central (CC), los que están formados, como todos los ventrículos, por células ependimarias que son vimentina positivas (Fig. 5A). Se destaca también la presencia en el techo del 4V los plexos coroideos, identificados por su estructura y organización celular característica (Fig. 5B y 5C'). Este órgano circunventricular (OCV) se encuentra en todos los ventrículos cerebrales y cumple una importante función al monitorear la síntesis, composición y circulación del líquido cefalorraquídeo (LCR) (Lehtinen et al., 2013).

Debido a la tinción nuclear (TOPRO-3 en azul) es posible reconocer agrupaciones celulares, correspondientes al NTS y DMV (Fig. 5B). En cuanto se analizan secciones cada vez más posteriores, se observa una clara reducción del 4V (Fig. 5D), hasta dar lugar al canal central (Fig. 5G); de la misma forma es llamativa la desaparición de los plexos coroideos y el surgimiento del AP (Fig. 5I), donde reside un importante número de vagliocitos, que al igual que las células ependimarias son vimentina positivos (Fig. 5J y 5M). De acuerdo con el análisis anterior, el área del tronco posterior que permite observar la completa composición del CDV se encuentra entre los bregmas -7.47 y -7.67mm para el cerebro de ratón,

principalmente por abarcar casi en su totalidad la estructura del AP. Para los análisis basados en CDV de rata, la región seleccionada se definió entre los bregmas -13.28 y -14.68mm de acuerdo con el atlas estereotáxico de cerebro de rata (Paxinos & Watson, 2013).



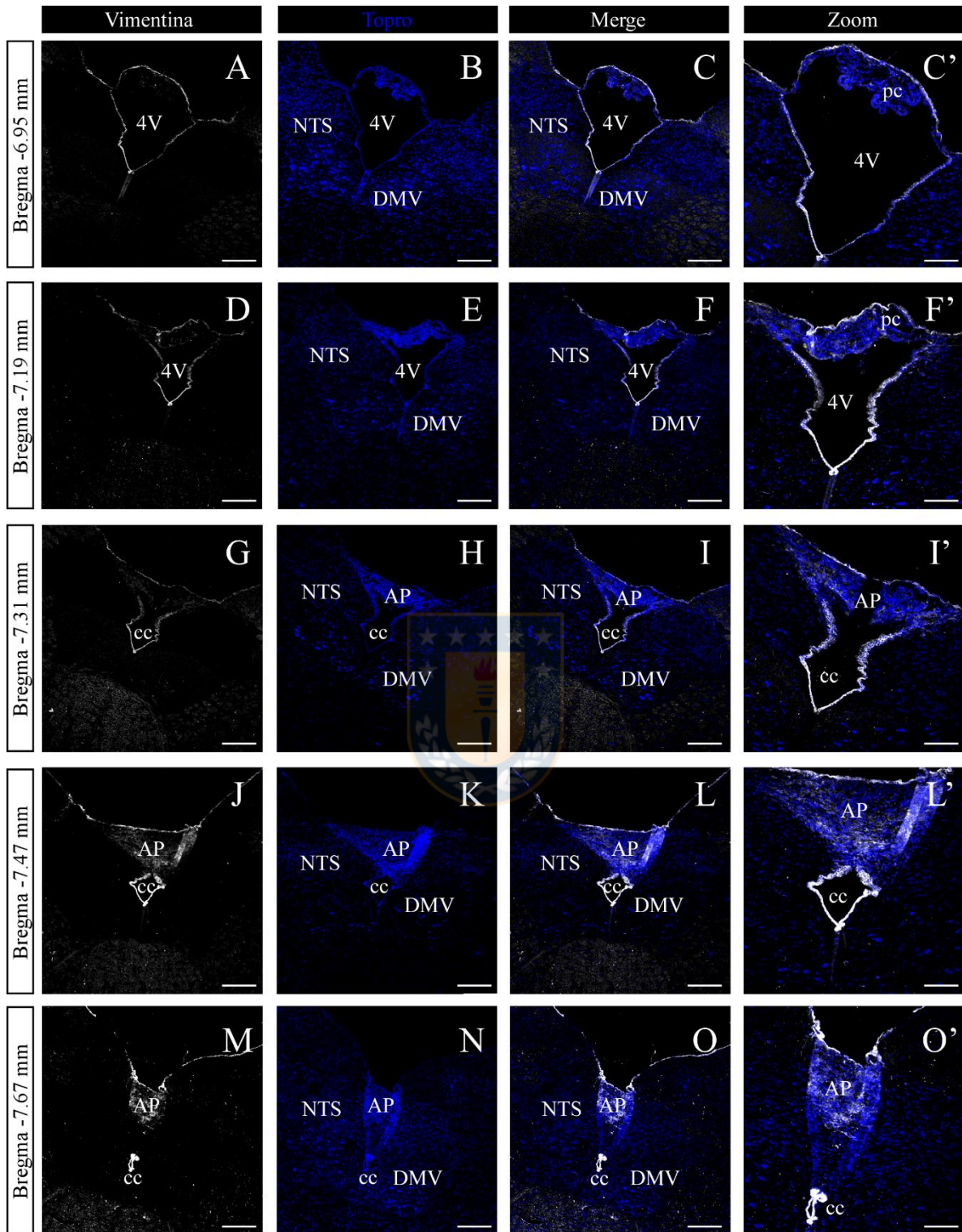


Figura 5. Expresión y localización de vimentina en el complejo dorsal vagal.

A-O'. Cortes coronales representativos del tronco posterior de ratones adultos, correspondientes a distintos bregmas en sentido anteroposterior. Los tejidos fueron procesados con anti-vimentina en color blanco (A, D, G, J, y M). Se utilizó TOPRO-3 como marcador nuclear, en azul (B, E, H y N). En C, F, I y O se muestra la existencia de células que colocalizan vimentina y TOPRO-3 desde los plexos coroideos (pc) hasta la formación del área postrema (AP), así como del cuarto ventrículo (4V) hasta formar el canal central (cc), cuya ampliación se muestra en C', F', I' y O', respectivamente. NTS, núcleo del tracto solitario. DMV, núcleo dorsomedial del vago. Barra de escala A-O 200µm. Barra de escala C', F', I', L' y O' 120µm.

2. Evaluación de parámetros fisiológicos tras exposición a una dieta rica en sacarosa

Para realizar los estudios con animales expuestos a una dieta rica en sacarosa (HSD) por un corto plazo de tiempo, se utilizó un contenido de sacarosa de 61 % con respecto a la cantidad de carbohidratos totales y una dieta control (ND), cuyo contenido en carbohidratos es la misma, pero corresponde a carbohidratos de difícil absorción. De esta manera, se pretendió determinar si los tanicitos y vagliocitos modificaban su actividad proliferativa como potenciales PNs en hipotálamo y CDV, teniendo en cuenta que estas áreas cerebrales son determinantes en el control de la ingesta alimenticia y por tanto son sensibles a cambios en la dieta.

Para lograr lo anterior, ratas macho P46 que pesaban 135g en promedio, fueron sometidas a ND o HSD durante 8 días consecutivos y se inyectó BrdU ip diariamente entre los días 2-8 (Fig. 6A). Se tomó registro diario de la cantidad de alimento ingerido (Fig. 6B), así como del peso corporal (Fig. 6C). Los animales de ambos grupos consumieron un promedio de 18g diarios, lo que es habitual para ratas de este peso y ambos grupos no mostraron cambios

significativos en ninguna de las condiciones. Para determinar si los animales sufrían cambios en la glicemia a corto plazo (2 horas), luego de la ingesta de HSD, se midió la glicemia tras un ayuno de 10 horas (entre 9 am y 7 pm; 0 min) y luego de una realimentación con la dieta respectiva, se midió a los 30, 60, 90 y 120 min (Fig. 6D). Interesantemente, se encontraron diferencias estadísticas ($p < 0.5$) en el valor de la glicemia entre las ratas alimentadas con HSD y ND, luego de 60, 90 y 120 min de la realimentación; indicando un aumento en la glicemia a corto plazo tras la exposición a HSD. Este hecho se relaciona directamente con la digestión y absorción de diferentes tipos de carbohidratos contenidos en ambas dietas. HSD contiene 61 % de sacarosa y ND contiene 61% de almidón de maíz, con respecto a los carbohidratos totales; la sacarosa es un disacárido de fácil absorción (glucosa y fructosa), mientras que el almidón es un polisacárido de glucosa con estructura compleja ramificada y, por tanto, de mayor peso molecular, así como lenta absorción. Estos resultados validan el uso de ambas dietas para generar incrementos diferenciales en la concentración de glucosa.

Adicionalmente, la glicemia se midió antes y después de la exposición a las dietas, sin presentar cambios significativos al comparar el día 0 con el día 8 de tratamiento (Fig. 6E), siendo $6.2\text{mM} \pm 0.4$ y $6.9\text{mM} \pm 0.5$, los valores iniciales de glicemia para ND y HSD, respectivamente, y $7.5\text{mM} \pm 0.4$ y 7.1 ± 0.4 , los valores finales para los mismos grupos. De la misma forma, se encontró que, al comparar el incremento en el peso corporal de las dos poblaciones experimentales, no presentaron diferencias significativas entre estas (Fig. 6E y F; $54.9\text{g} \pm 1.8$ y $47.7\text{g} \pm 3.5$ para ND y HSD, respectivamente).

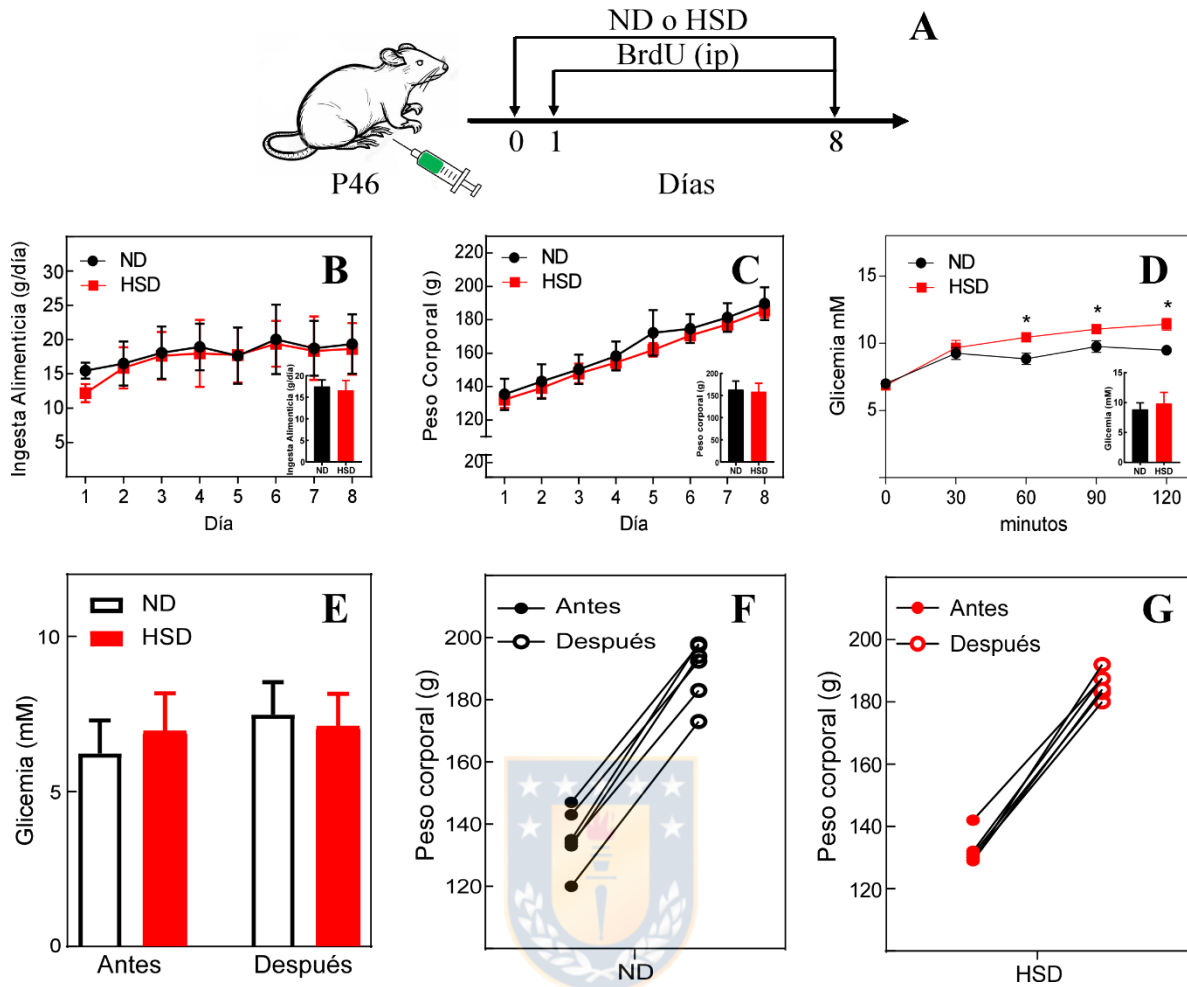


Figura 6. Comparación de factores fisiológicos relacionados con el metabolismo de una dieta control y una alta en sacarosa.

(A) Ratas macho fueron sometidas a dieta control (ND) o rica en sacarosa (HSD) durante 8 días y recibieron inyecciones ip de BrdU por 7 días. Se presentan los promedios comparativos de la cantidad de alimento ingerido (B) y peso corporal (C). Medida de glicemia a corto (D) y largo plazo (E). Comparación del peso corporal ganado para ratas tratadas con ND (F) y HSD (G) durante 8 días. N=6 en cada condición. Adicionalmente, en B-D se presentan gráficas de barras para los valores promedio de cada parámetro. Valores representados como promedio \pm SEM; (*) $p < 0.05$ (Análisis múltiple t test).

3. HSD favorece la proliferación de tunicitos $\beta 2$

Posterior a los análisis anteriores, se evaluó el efecto de HSD sobre la proliferación celular en el hipotálamo de ratas macho con un peso aproximado de 200g, los cuales fueron inyectados ip por 7 días con 50mg/Kg de BrdU. En el día 8 de exposición a HSD o ND, se disecaron los hipotálamos, que posteriormente fueron cortados histológicamente; para el análisis se seleccionaron secciones correspondientes a la región basal medial (bregma -1.92 a -3.24mm). Dichas secciones fueron procesadas a través de inmunohistoquímica, para identificar células con actividad proliferativa reciente (células BrdU+) en células nestina+ o cercanas a sus procesos (Fig. 7). Se encontraron células con estas características, en el parénquima del hipotálamo y EM (Fig. 7A), además de en las paredes laterales (Fig. 7B) y el piso del 3V (Fig. 7C), para la condición HSD y también para ND (Fig. 7D, E y F, respectivamente).

Se procedió a realizar la cuantificación de células BrdU+ en al menos 4 secciones coronales hipotalámicas por cada uno de los animales en las dos condiciones alimenticias (Fig. 8; N=9 por grupo) y los datos reportados fueron relativizados al volumen analizado en μm^3 y normalizado a la condición control ND. Se establecieron diferentes agrupaciones celulares, para facilitar el análisis separado de poblaciones y optimizar el conteo celular, así como el tratamiento estadístico. La proliferación en la región del parénquima hipotalámico se muestra en la figura 8A, siendo de 1.0 ± 0.3 células BrdU+ para ND y 1.0 ± 0.2 células BrdU+ para HSD. Los valores absolutos de proliferación en parénquima hipotalámico fueron de 36.26 ± 6.08 células para ND y 42.46 ± 7.97 células para HSD. El análisis estadístico no presentó diferencias significativas entre ambos grupos.

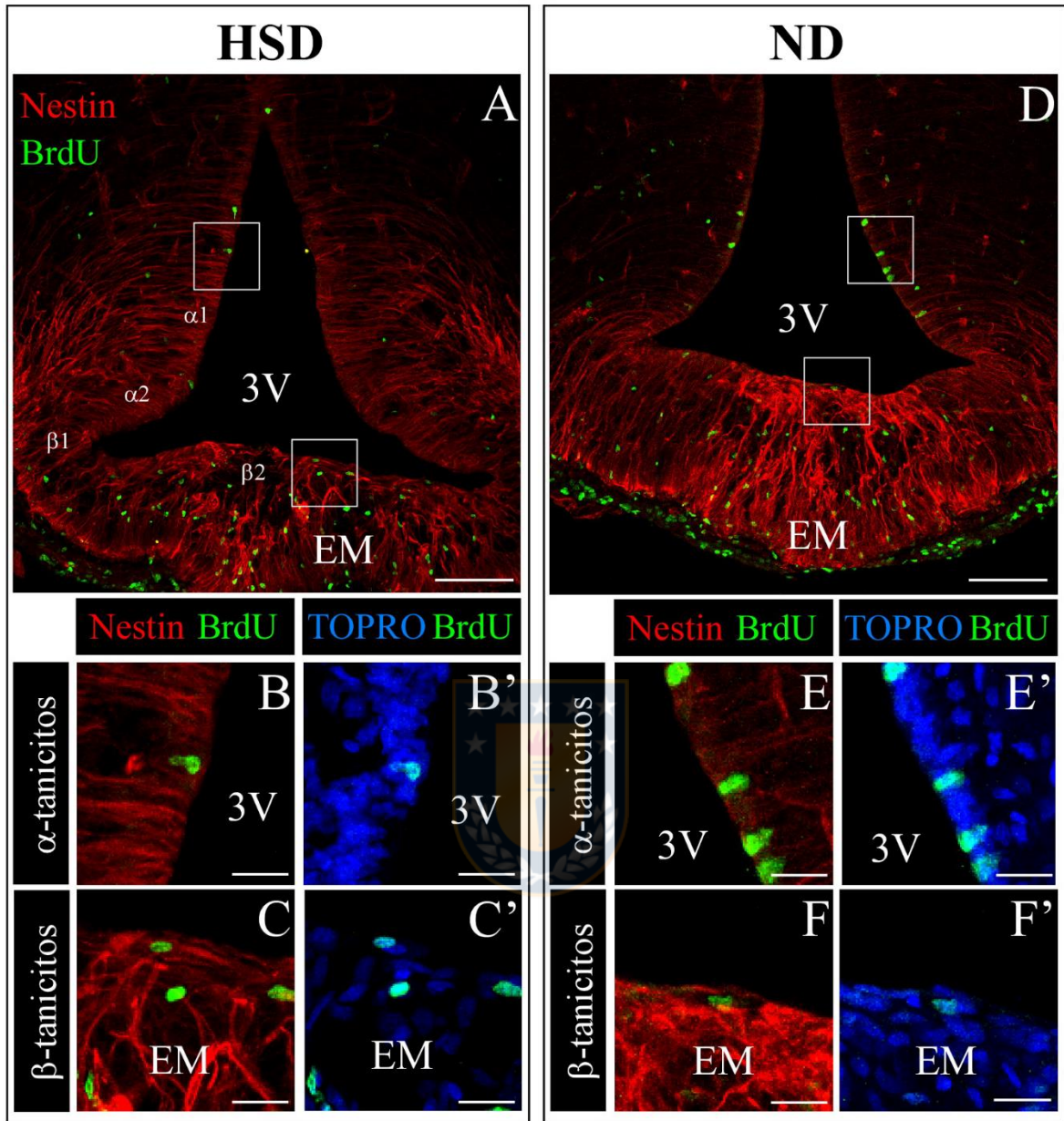


Figura 7. Efecto de la dieta rica en sacarosa sobre la proliferación celular hipotalámica.

A-F'. Secciones coronales representativas de hipotálamos de ratas sometidas a una dieta rica en sacarosa (A-C') y una dieta control (D-F'), denominadas HSD y ND, respectivamente. A y D corresponden a visualizaciones generales de hipotálamos sometidos a diferentes dietas y teñidos por inmunohistoquímica para nestina y BrdU. $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ y $\beta 2$ en A, muestran la localización de las diferentes subpoblaciones de tanicitos. 3V. Tercer ventrículo. EM. Eminencia Media. Barra de escala 100 μm . B-C'. Amplificación de los recuadros señalados en A especificando la proliferación de α -tanicitos (B-B') y $\beta 2$ -tanicitos (C-C'), tras el doble

marcaje BrdU/nestina y BrdU/TOPRO-3 para HSD. E-F'. Amplificación de los recuadros señalados en D detallando la proliferación de α -tanicitos (E-E') y β 2-tanicitos (F-F') sometidos a ND. Barra de escala 20 μ m.

De la misma forma se realizó la cuantificación en la EM (Fig. 8B), la cantidad de células BrdU+ por μ m³ para ND fue de 1.0 ± 0.2 y 0.8 ± 0.1 para HSD. Los valores de proliferación fueron 60.57 ± 6.31 y 58.65 ± 7.30 para ND y HSD, respectivamente. El análisis estadístico no presentó diferencias significativas entre ambos grupos. A continuación, se cuantificó la proliferación para el conjunto total de tanicitos, teniendo en cuenta las células ubicadas como máximo a 30 μ m desde el borde del ventrículo, sin distinguir entre subpoblaciones, donde tampoco se encontró una variación estadísticamente significativa como respuesta a HSD (Fig. 8C). Los valores normalizados a la situación control fueron de 1.16 ± 0.52 células BrdU+ para ND y 1.45 ± 1.19 para HSD, mientras que los valores absolutos de proliferación fueron de 6.27 ± 1.11 y 5.79 ± 0.52 , para ND y HSD, respectivamente. Puesto que no se encontró una variación importante en la proliferación total de tanicitos, se hizo la cuantificación separando, por una parte, tanicitos α 1 y α 2 (los cuales recubren las paredes del 3V) y, por otra parte, tanicitos β 2 (los cuales recubren el piso del 3V); es importante mencionar que la subpoblación β 1 presentó una baja o nula proliferación con respecto al cambio de dieta y por esta razón se incluye junto con los α . Los valores de proliferación de tanicitos α y β 1 fueron de 1.28 ± 0.88 células BrdU+ para ND, con respecto a 1.30 ± 0.92 células BrdU+ para HSD (Fig. 8D), esto normalizado a la dieta control; el análisis estadístico no presentó diferencias significativas entre los dos grupos. Para la subpoblación de tanicitos β 2, los valores de proliferación fueron de 1.38 ± 0.11 células nuevas para ND y 2.91 ± 0.65 células nuevas para HSD (normalizado a ND). Notablemente, el análisis estadístico arrojó

diferencias significativas entre las relaciones de proliferación de ambos grupos, las cuales corresponden a los valores de proliferación, 1.45 ± 0.20 para ND y 2.59 ± 0.37 para HSD.

Los valores totales de proliferación están consignados en la tabla de la figura 8F.

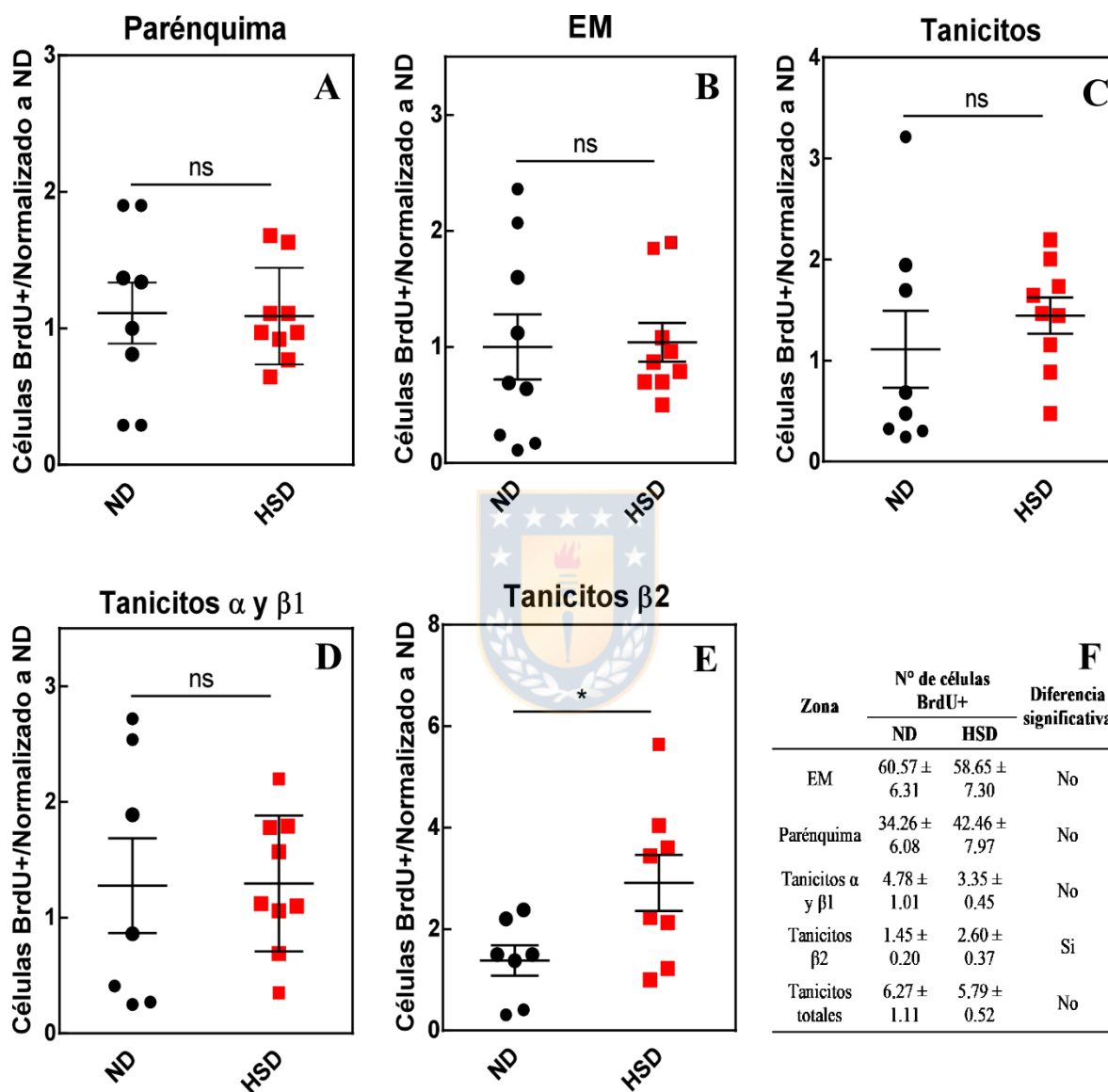


Figura 8. Cuantificación del efecto de la dieta rica en sacarosa sobre la proliferación celular hipotalámica.

A-F. Cuantificación del número de células BrdU+ en hipotálamos de individuos sometidos a cada dieta. El número de células BrdU+ fue relativizada al volumen de cada zona hipotalámica (excluyendo áreas no celulares como el ventrículo) y normalizada a la situación

de dieta control, especificándose el área del hipotálamo general (A), Eminencia Media (B), tanicitos sin distinción de su subpoblación (C), $\alpha 1$ y $\alpha 2$ -tanicitos (D) y $\beta 2$ -tanicitos (E). La proliferación de tanicitos se determinó con base en su localización y marcaje para nestina, los valores absolutos se reportan en F como promedio \pm SEM. N=9. (*) $p < 0.05$, (ns) no significativo (Test T-student).

De los resultados anteriores, es importante resaltar el aumento en la proliferación por parte de los tanicitos $\beta 2$, en animales que consumieron una dieta rica en sacarosa durante 8 días. Lo anterior corresponde a una renovación en dicha población celular en animales adultos, sin embargo, se desconoce cómo la detección de fluctuaciones en la concentración periférica o central de azúcares como glucosa y/o fructosa, inciden sobre la proliferación de esta subpoblación de tanicitos. Puesto que tras la exposición a HSD, la subpoblación de tanicitos del hipotálamo que mostró un aumento en su proliferación basal, se localiza tomando contacto con una región libre de BHE, se realizó el mismo tipo de cuantificación de células BrdU+ en CDV; otra zona cerebral que presenta una región libre de BHE y es importante en la regulación alimenticia.

4. HSD favorece la proliferación en AP

El efecto de la dieta hipercalórica rica en sacarosa sobre la proliferación celular en CDV se evaluó en los mismos animales utilizados para el análisis previamente descrito en hipotálamo. Esto es posible gracias a que ambas regiones cerebrales se localizan aproximadamente a 11mm de distancia en el cerebro de rata, y de esta forma, se cumple con una de las importantes normas del uso de animales experimentales, que es reducir el N experimental. Para esto, se disecaron los troncos posteriores (incluyendo cerebelos) y fueron cortados histológicamente; para el análisis se seleccionaron cortes entre los bregmas -13.68 y -

14.68mm. Dichas secciones fueron procesadas mediante inmunohistoquímica, para identificar células con actividad proliferativa reciente (células BrdU+) en células nestina+ o en el parénquima de los núcleos neuronales cercanos (Fig. 9). Se encontraron células con estas características, en las diferentes agrupaciones celulares en CDV (Fig. 9A), AP y NTS (Fig. 9B), así como en las células que recubren el CC (Fig. 9C), para la condición ND y también para HSD (Fig. 9D, E y F, respectivamente).

Se cuantificaron las células BrdU+ en al menos 4 secciones coronales del tronco posterior por cada uno de los animales en las dos condiciones alimenticias (Fig. 10; N=6 por grupo) y los datos reportados fueron normalizados con respecto a ND (promedio \pm SEM). El conteo inicialmente se realizó para el CDV completo, para las dos condiciones alimenticias (Fig. 10A), reportando valores de 1.00 ± 0.12 células BrdU+ para ND y 1.02 ± 0.16 células BrdU+ para HSD, cada valor fue relativizado al volumen analizado en μm^3 y normalizado a la condición control ND; el análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre ambos grupos. De la misma forma, se analizó la proliferación de las células ependimarias que delimitan el CC (Fig. 10B); los valores de proliferación fueron de 1.00 ± 0.27 para ND y 0.92 ± 0.11 para HSD, sin encontrar diferencias significativas al comparar las dos condiciones. Notoriamente, las células ependimarias que forman el CC, resultaron ser negativas para nestina, aunque estas son vimentina + (como se mostró en resultados anteriores), caso contrario de tanicitos y vagliocitos, quienes son nestina y vimentina+. Debido a que no se encontraron diferencias significativas al cuantificar la proliferación en el CDV completo, de la misma forma que se hizo en hipotálamo, se decidió realizar el conteo en subgrupos; por una parte, células del NTS y de DMV, y en un segundo grupo, las células del AP. Se encontraron valores idénticos en proliferación del grupo NTS+DMV (Fig. 10C), siendo de

0.99 ± 0.14 para ND y HSD. Por otra parte, los valores de proliferación en células pertenecientes al AP fueron de 1.36 ± 0.38 células BrdU+ para HSD y 0.97 ± 0.18 células BrdU+ para ND; mostrando así, un incremento significativo en su proliferación (Fig. 10D), cuando fueron expuestas a HSD. Los valores absolutos de proliferación en AP fueron de 33.58 ± 1.22 para ND y 41.89 ± 2.29 para HSD; estos y los demás valores absolutos de proliferación, se muestran en la tabla de la figura 10E.

De acuerdo con los datos obtenidos, es importante destacar el aumento en la proliferación de células del AP de los animales expuestos a HSD durante 8 días, con respecto a ND. Es la primera ocasión en que se obtienen resultados de proliferación tanto en AP como en CDV, derivados de cambios en factores de la dieta y el metabolismo de estos. No solo son desconocidos los mecanismos que permiten la detección de la variación de las concentraciones de estos factores por parte de las células del AP, sino también, qué tipo de células se encargan de este rol. Se sabe que en AP coexisten vagliocitos, astrocitos y neuronas, entre otras células, por tanto, no es posible atribuir directamente el aumento en la proliferación, ocasionado por un alto consumo de carbohidratos, a un solo tipo celular dentro del AP.

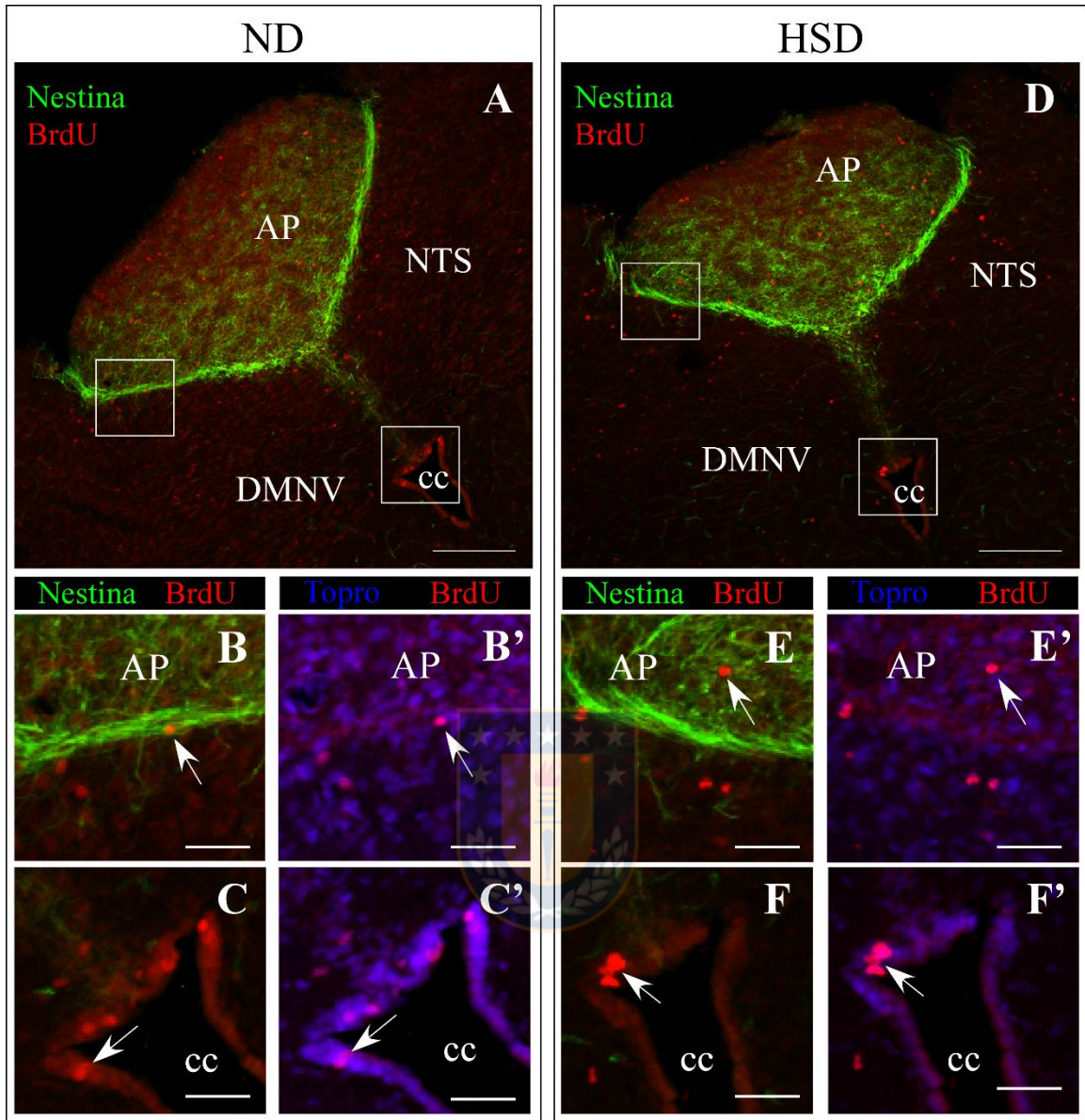


Figura 9. Efecto de la dieta rica en sacarosa sobre la proliferación celular en CDV.

A-F'. Secciones coronales representativas de hipotálamos de ratas sometidas a una dieta control (A-C') y una dieta rica en sacarosa (D-F'), denominadas ND y HSD, respectivamente. A y D corresponden a visualizaciones generales de troncos posteriores sometidos a diferentes dietas y teñidos por inmunohistoquímica para nestina y BrdU. AP. Área postrema. NTS. Núcleo del tracto solitario. DMNV. Núcleo dorsomotor del vago. cc. Canal central. Barra de escala 200µm. B-C'. Amplificación de los recuadros señalados en A especificando la proliferación celular en límites entre AP y NTS (B-B') y en el cc (C-C'), tras el doble marcaje BrdU/nestina y BrdU/TOPRO para ND. E-F'. Amplificación de los recuadros señalados en

D detallando la proliferación de células en los límites del AP y NTS (E-E') y el canal central (F-F') para HSD. Barra de escala 80µm.

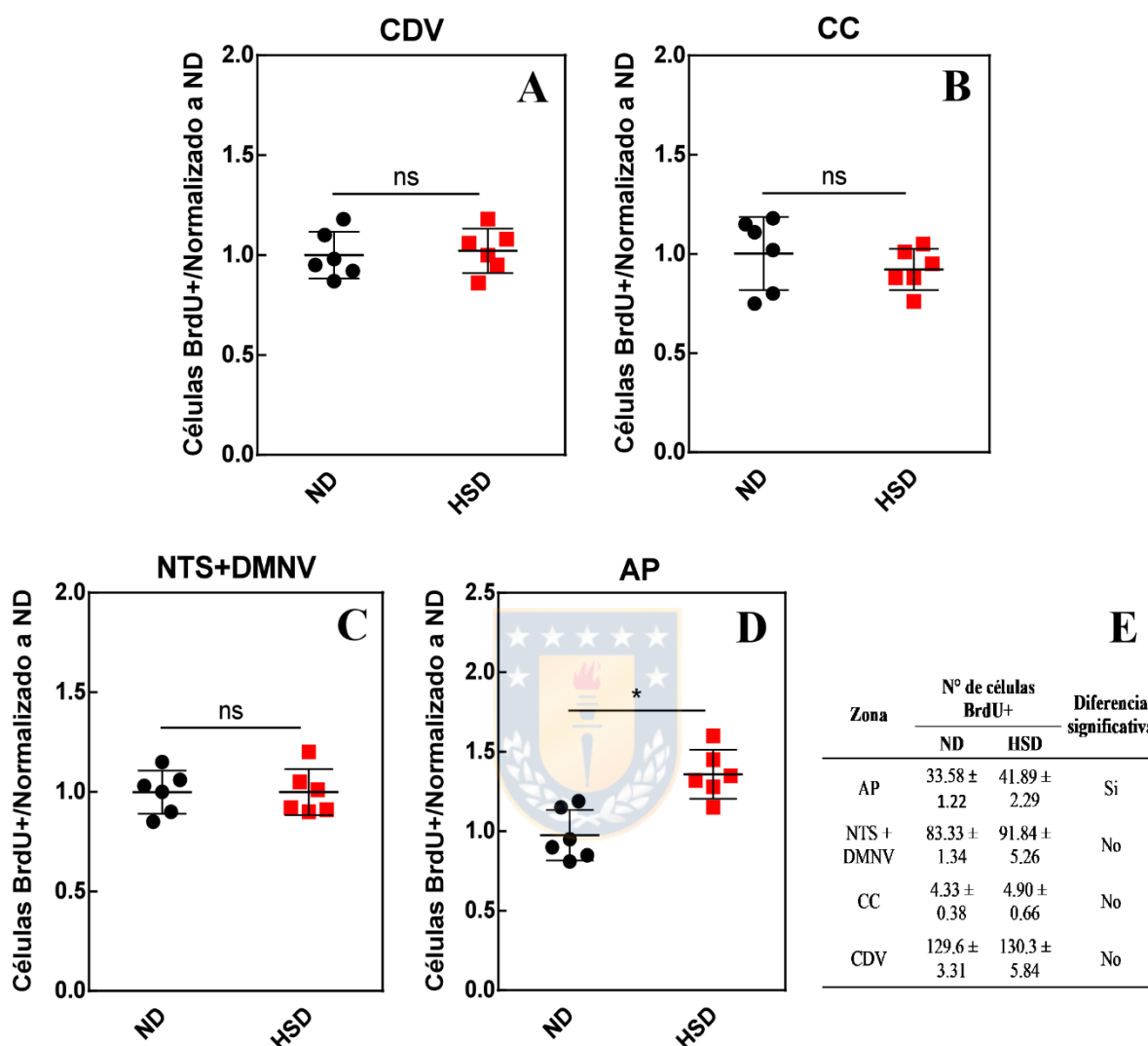


Figura 10. Cuantificación del efecto de la dieta rica en sacarosa sobre la proliferación celular en CDV.

A-E. Cuantificación del número de células BrdU⁺ en el complejo dorsal vagal (CDV) de ratas sometidas a cada dieta. El número de células BrdU⁺ fue relativizada al volumen de cada zona del CDV (excluyendo áreas no celulares como el canal central) y normalizada a la situación de dieta control, especificándose el área del área postrema (A), núcleo del tracto solitario y núcleo dorsomotor del nervio vago (B), canal central (C) y CDV total (D). La proliferación

celular se determinó con base en su localización y marcaje para nestina, los valores absolutos se reportan en (E). N=6. (*) $p < 0.05$ (Test T-student).

En conjunto, tanicitos $\beta 2$ y células del AP mostraron un aumento significativo en su proliferación, frente al suministro de una dieta rica en sacarosa, esto evento podría, a largo plazo, originar nuevas neuronas en dichas áreas. Por tanto, es necesario identificar la presencia de genes característicos de células precursoras neurales (PNs) en AP y tanicitos, además de cuantificar su expresión. Para lo anterior, se realizaron ensayos de PCR convencional y en tiempo real, con cultivo primario de tanicitos y disgregación directa del AP.

5. Tanicitos y células del AP comparten genes de células PN

Puesto que en el estudio de células PNs se han descrito diversos tipos de genes implicados en el proceso neurogénico, relacionados con la proliferación, se prosiguió a identificar y cuantificar la expresión de algunos de estos genes característicos, en cultivo primario de tanicitos y disgregado de células del AP. Puesto que no se ha estandarizado un cultivo primario para vagliocitos, fue necesario extraer y disgregar el AP completa, a partir de cortes gruesos del tronco posterior. A través de PCR convencional, se logró identificar la presencia de genes clave en la producción de nuevas neuronas, como Pax6 (Fukuda et al., 2003) (del inglés *Paired box 6*) y Ascl1; del inglés *achaete-scute family bHLH transcription factor 1*) (Fukuda et al., 2003; Kriegstein & Alvarez-Buylla, 2009; Lledo et al., 2006), en tanicitos de cultivo primario, mientras que solo se identificó Pax6 en AP (Fig. 11A); se utilizó beta actina como gen de referencia. Posteriormente y mediante PCR en tiempo real, se cuantificó la expresión tanto de Pax6 y Ascl1, como de Clcf (del inglés *Cardiotrophin-like cytokine factor*), Fgf18 (del inglés, *fibroblastic growth factor 18*), Foxn4 (del inglés, *Forkhead Box*

N4) y *Rcor2* (del inglés *REST corepressor 2*; Fig. 11B); la expresión de este último grupo de genes ya ha sido reportada previamente en tanicitos (Recabal et al., 2018). La expresión génica fue normalizada a la expresión de ciclofilina; se reportaron niveles importantes en la expresión de los genes descritos anteriormente, en tanicitos, excepto para *Fgf18* (Fig. 11B). Si bien, se identificó expresión en el mismo grupo de genes para células del AP, los niveles fueron inferiores comparados con los obtenidos para tanicitos, a excepción del gen *Clcf*. Los niveles bajos de expresión en AP pueden deberse a la presencia de ARN mensajero (ARNm) de diferentes tipos celulares, puesto que se disgregó el tejido completo, y de esta forma, el ARNm correspondiente a dichos genes está aún más diluido en la muestra final.

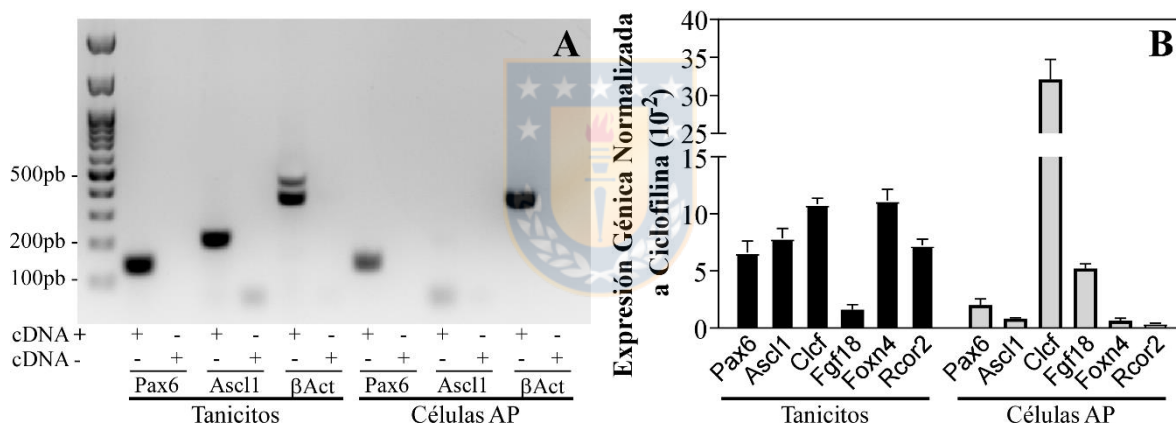


Figura 11. Identificación y cuantificación de la expresión de genes neurogénicos en cultivo primario de tanicitos y células del AP.

Extractos de ARN total, provenientes de cultivo primario de tanicitos de rata y disgregado de AP de rata, fueron utilizados en RT-PCR convencional (A), para identificar la amplificación de partidores para Pax6y Ascl1, además del gen control β-actina. Los mismos extractos de ARN total fueron usados en RT-PCR en tiempo real (B), para cuantificar la expresión génica de Pax6, Ascl1, Clcf, Fgf18, Foxn4 y Rcor2, normalizada a la expresión de ciclofilina como gen control.

De acuerdo con los resultados anteriores, se evidencia la necesidad de obtener tanicitos y vagliocitos purificados, a partir de animales adultos de una manera rápida y precisa, que permita su separación con respecto de neuronas y otros tipos de glía. De esta manera, podrán evaluarse distintos parámetros bioquímicos, metabólicos y moleculares, directamente en estas células, minimizando el tiempo de maduración y purificación que tienen los cultivos *in vitro*, así como las interferencias en cuanto a la expresión génica, por parte de otras células. Para lograr lo anterior, se generó un adenovirus que permitió marcar por fluorescencia, *in vivo*, tanicitos y vagliocitos en animales adultos y su posterior aislamiento mediante FACS.

6. Ad off-tdTomato puede ser titulado por la identificación de la proteína reportera

Previamente, el laboratorio de Biología Celular ha diseñado y generado distintos vectores, para el uso de adenovirus en el análisis de expresión y función en tanicitos. Uno de ellos es el vector pDC311.2-OFF-tdTomato (Elizondo Vega, 2016), el cual contiene el gen reportero tdTomato que se expresa bajo el control del promotor de ubiquitina humano. Este vector junto con el vector genómico viral pBHGlox Δ E1,3Cre, fueron cotransfectados en células HEK 293A para la generación gradual de partículas adenovirales en cosechas sucesivas (Fig. 12); la generación del virus se describe en la sección de materiales y métodos. La identificación de células transfectadas se basó en la detección del reportero tdTomato por microscopía de fluorescencia (Fig. 12A', B', C' y D'). Inicialmente la capacidad de transfección del virus era mínima (cosechas 1-5), las células no presentaban diferencias importantes en cuanto a su morfología, confluencia o propiedad de adherencia a la placa de cultivo (Fig. 12A-B'). A partir de la sexta cosecha, el aumento en la producción de partículas virales y, en consecuencia, un mayor número de células transfectadas, se hizo evidente, al identificar cambios sustanciales en la morfología celular y cantidad de células adheridas a la

placa, lo cual representa un efecto citopático relacionado con el aumento de título (Fig. 12C-D').

Una vez amplificado el adenovirus Ad OFF-tdTomato, se cuantificaron las partículas adenovirales en cultivos de células HEK 293T, basado en la detección de células que expresaron el gen reportero. Se determinó el título óptimo del adenovirus, considerando su efecto citopático, encontrando que $1,2 \times 10^9$ unidades infecciosas/mL producían una transducción cercana al 100 %. El Ad OFF-tdTomato en el título indicado, fue utilizado para el estudio de transducción *in vivo* de células endimarias de ratones adultos.

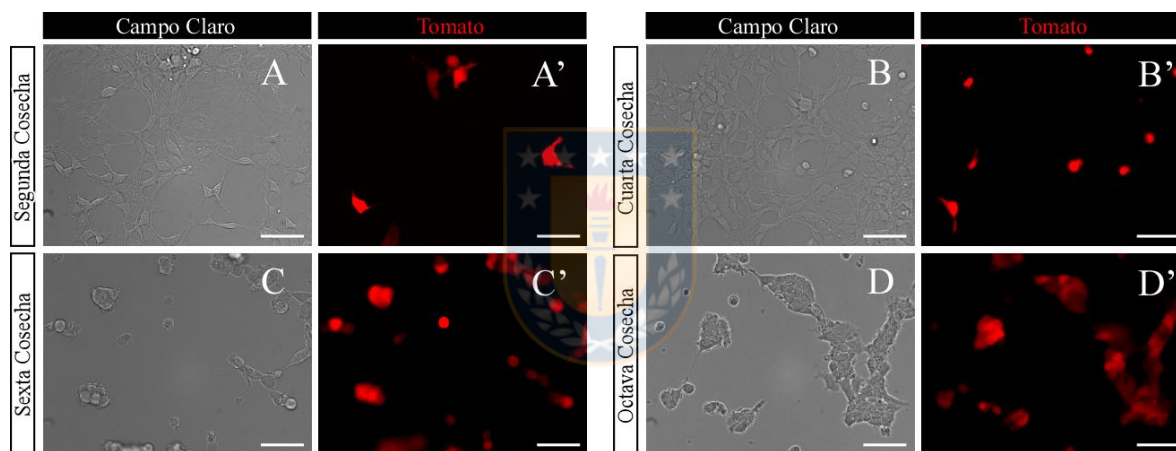


Figura 12. Aumento de la capacidad de transfección del Ad OFF-tdTomato.

A-D'. Cosechas sucesivas del Ad OFF-tdTomato en células HEK 293A para aumento de título. Inicialmente la transfección del adenovirus fue reducida a pocas células (A' y B') y sin evidenciar cambios en su adherencia, morfología o confluencia celular (A y B). A partir de la sexta cosecha, el adenovirus no solo aumentó su capacidad de transfección (C' y D'), sino que también mostró un efecto citopático, al alterar la morfología celular y reducir su adherencia a la placa de cultivo (C y D). A, B, C y D, imágenes obtenidas por microscopía en campo claro. A', B', C' y D', imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia. Barra de escala 100 μ m.

7. Ad OFF-tdTomato transduce con eficiencia células endimarias en hipotálamo y CDV

Para evaluar la capacidad de transducción *in vivo* del Ad OFF-tdTomato en ratones adultos, se utilizó como marcador, la proteína reportera tdTomato. Mediante cirugía estereotáxica, fueron inyectados 10µL del adenovirus inyectado directamente al ventrículo lateral (Fig. 13A), de manera que, valiéndose de la circulación constante del LCR, el adenovirus se distribuyera hacia los demás ventrículos y alcanzara 3V, 4V y CC. Luego de 96 horas de transducción, se evaluó la expresión de tdTomato en cortes coronales de hipotálamo y CDV, correspondientes a diferentes bregmas, con el fin de identificar las poblaciones de células transducidas en distintos puntos del eje anteroposterior (Fig. 13B-G). En CDV, se encontró expresión de tdTomato en células que delimitan el 4V (Fig. 13B), de la misma forma, tras la aparición del AP, células endimarias del CC también expresaron la proteína reportera (Fig. 13C), y posteriormente se identificaron células transducidas tanto en el CC como en AP, al evidenciar marca en cuerpos y procesos celulares (flechas blancas en Fig. 13D). Por otra parte, en hipotálamo basal también se identificó la presencia de la proteína reportera alrededor del 3V, tanto endimocitos como en las subpoblaciones de tanicitos, fueron transducidos eficientemente (Fig. 13E-G). También se observa marca en el parénquima cercano al ventrículo, lo que puede corresponder a procesos de tanicitos o de astrocitos cercanos a los procesos de tanicitos (cabezas de flechas blancas en Fig. 13E-F).

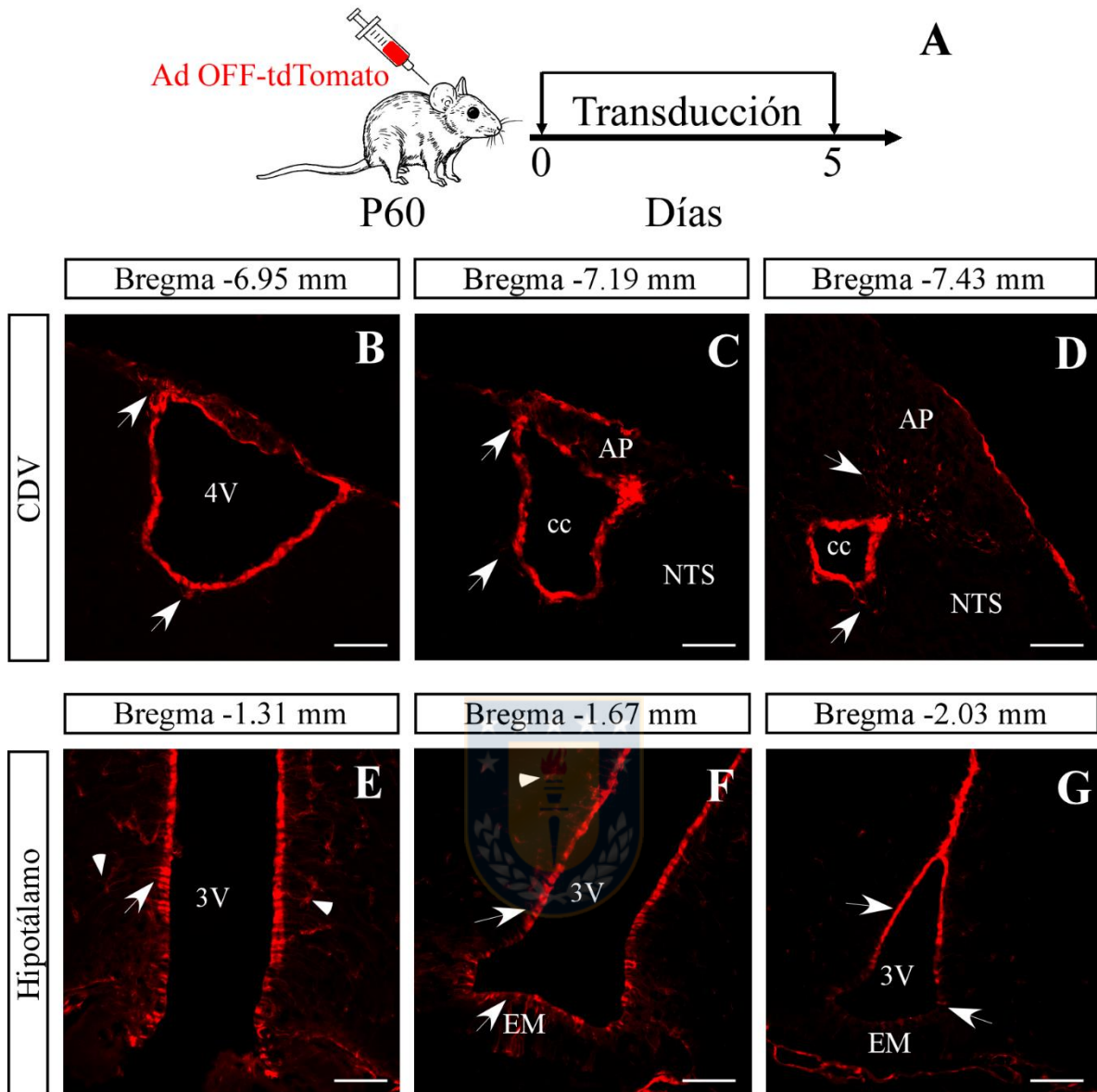


Figura 13. Capacidad de transducción del Ad OFF-tdTomato en hipotálamo y CDV.

(A) el Ad OFF-tdTomato fue inyectado en el ventrículo lateral de ratones adultos y luego de 5 días se disgregaron los tejidos de las zonas de interés. (B-G) Imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia para cortes coronales, representativas de la infección viral en células endimarias de ratón. La infección en el complejo dorsal vagal, se identificó en células endimarias que rodean tanto el cuarto ventrículo (B), como el canal central (C) y también en cuerpos celulares en al área postrema (D), todo lo anterior señalado con flechas blancas. La infección en el hipotálamo se observó en células endimarias (ependimocitos y tanicitos) que delimitan el tercer ventrículo (flechas blancas en E-G) y también en algunos

astrocitos cercanos a los procesos de α -tanicitos principalmente (cabezas de flechas blancas en E y F). Barra de escala 100 μ m.

Una vez evidenciada la eficiencia del adenovirus en cuanto a su capacidad de transducir *in vivo*, células endimarias en distintas zonas ventriculares, se prosiguió a identificar y sortear dichas células, tomando como parámetro base la expresión del gen reportero, utilizando la técnica FACS. Lo anterior es importante en la obtención de células tdTomato positivas, enriquecidas de tanicitos y vagliocitos, para así extraer ARN total, útil en el análisis de expresión génica por distintos métodos como qRT-PCR o análisis transcriptómico.

8. La inyección icv de Ad OFF-tdTomato permite el aislamiento de células endimarias por FACS

Con el objetivo de identificar y sortear células transducidas con el Ad OFF-tdTomato, se inyectó icv el adenovirus en ratones adultos (P60). Luego de 96 horas de transducción, se obtuvieron cerebros y se diseccionaron cuidadosamente hipotálamos y CDV de cada uno. Los tejidos fueron disgregados mecánica y enzimáticamente, para posteriormente eliminar del exceso de grasas, debris celular y tejido conectivo resultante, usando un gradiente de percoll. Las células resultantes resuspendidas en PBS, fueron analizadas por citometría de flujo (Fig. 14), bajo parámetros biofísicos que permiten discriminar poblaciones celulares por características como tamaño, complejidad o fluorescencia. Inicialmente se evaluó el tamaño y granularidad de cada suspensión de células (CDV e hipotálamo por separado; Fig. 14A y C, respectivamente), con el fin de identificar la posible presencia de distintas poblaciones celulares y para tener un estimado sobre el número de eventos o células adquiridas por el equipo, lo cual es un indicador del número total de células en la suspensión. Cada muestra analizada por el equipo contenía una suspensión celular proveniente de dos

CDVs, donde se seleccionó la población que presentó mayor dispersión en cuanto a tamaño y granularidad, correspondiente a un 30.7 % del total adquirido (Fig. 14A), esta selección se contrarrestó con un segundo análisis donde se comparó el tamaño y la intensidad de fluorescencia, lo cual permitió seleccionar una población del 29.7 % del total adquirido (Fig. 14B). De la misma forma, para la suspensión celular obtenida a partir de dos hipotálamos, se analizaron tamaño y granularidad, con el fin de identificar la población a sortear, seleccionándose un 32 % del total adquirido (Fig. 14C), y posteriormente, se comparó también el tamaño e intensidad de fluorescencia, donde sorprendentemente se encontró que equivalía a un 80.5 % del total (Fig. 14D).

Para la muestra de CDV, el equipo logró adquirir un total de 89089 eventos, de los cuales sorteó 27375, correspondientes a un 30,7 % como se estableció inicialmente, según los parámetros de análisis. De la misma forma, de la muestra de hipotálamo se adquirieron 50731 eventos y de estos se sortearon 16252, correspondientes al 32 %. Como consecuencia de la baja cantidad de células aisladas, se decidió no verificar su pureza, pues esto significaría una reducción considerable en el tamaño de la muestra.

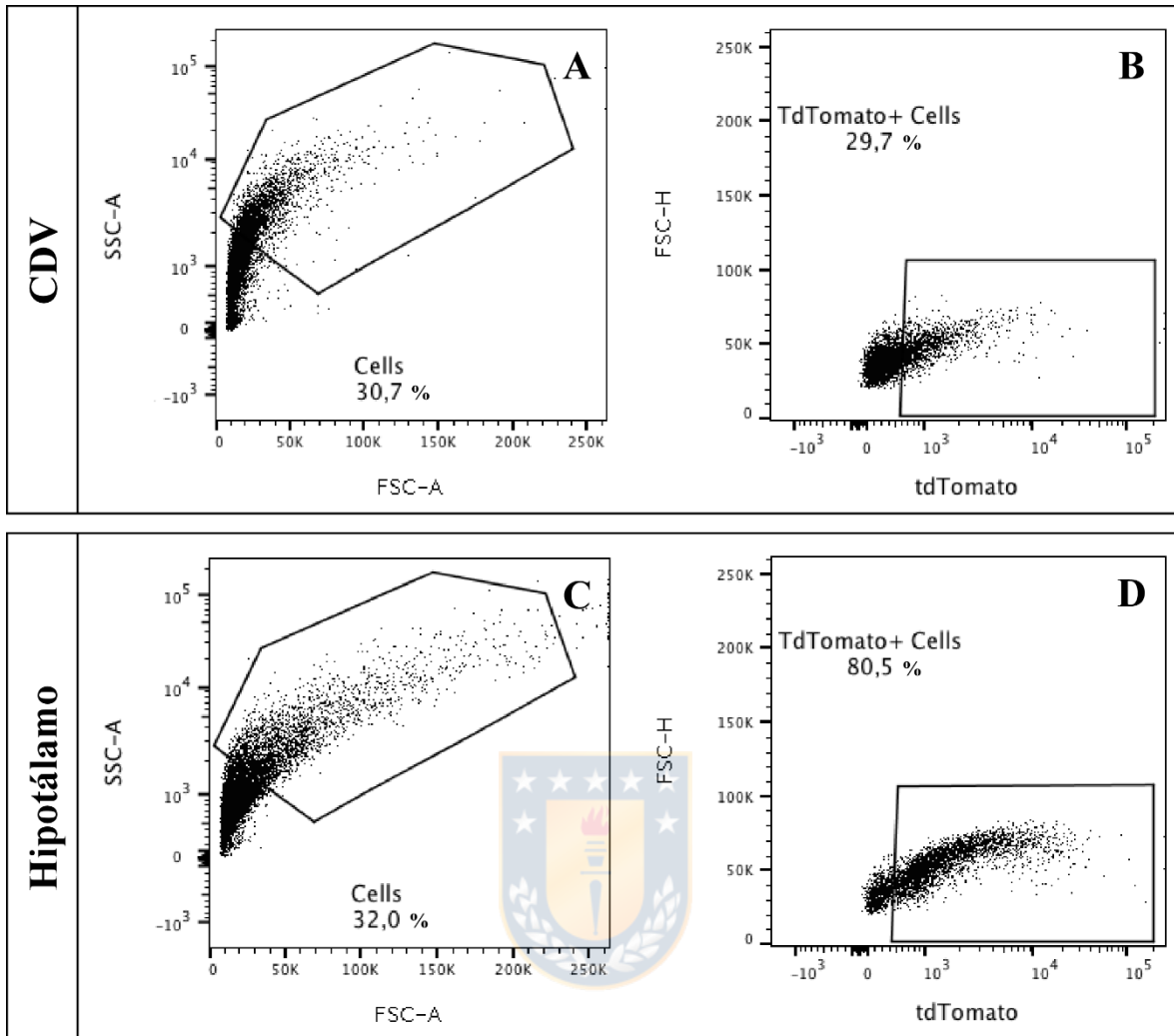


Figura 14. Sorteo de células transfectadas con Ad OFF-tdTomato.

Identificación de células que expresaban la proteína fluorescente tdTomato en complejo dorsal vagal (CDV; A y B) e hipotálamo (C y D), bajo el análisis de parámetros biofísicos al disgregado celular, como tamaño y granularidad (A y C), y tamaño e intensidad de fluorescencia. Los porcentajes hacen referencia a la cantidad de células seleccionadas bajo los parámetros mencionados, dentro de la población total adquirida por el equipo.

De acuerdo con la cantidad de células sorteadas, se utilizó el kit *RNAqueous*, para extraer ARN de muestras pequeñas (≤ 500000 células o 10mg). Se cuantificó el ARN total para el volumen completo de cada muestra, obteniendo 51,4ng para las células extraídas del CDV y

78,4ng para las células extraídas de hipotálamo. De acuerdo con la mínima concentración de ARN extraído de cada muestra, resultó imposible la síntesis de ADNc y el posterior análisis de expresión de genes neurogénicos mediante qRT-PCR, puesto que la cantidad mínima recomendada para esto es de 1µg de ARN total.

Existen diferentes métodos para el análisis de expresión génica, los cuales tienen distintas características tanto a favor como en contra, que permiten elegir entre uno y otro. Principalmente qRT-PCR y microarreglo se han convertido en técnicas comunes en el análisis de expresión génica debido a su practicidad y bajo costo, sin embargo, estas técnicas solo muestran la expresión de genes que se hayan definido previamente, lo que impide obtener una información completa del estado celular. Durante los últimos años, han surgido revolucionarios métodos bioinformáticos, denominados como secuenciación de siguiente generación (NGS; del inglés *Next-Generation Sequencing*). Estas técnicas se basan en la secuenciación del ARN de una determinada muestra (*RNA-seq*), permitiendo establecer un perfil transcriptómico y de expresión, bajo distintas condiciones. De esta manera, es posible contar con una amplia variedad de análisis y resultados, a partir del procesamiento bioinformático de datos obtenidos por *RNA-seq* y es por esa razón que, en este trabajo de investigación se planteó como objetivo, el análisis transcriptómico de datos obtenidos de hipotálamos de ratones, sometidos a diferentes condiciones alimenticias. Lo anterior con el fin de caracterizar y cuantificar la expresión de genes neurogénicos, expresados exclusivamente en tanicitos.

9. El riguroso preprocesamiento de *reads* permite la selección de poblaciones celulares aptas para el análisis transcriptómico

Se obtuvieron los archivos de secuenciación a partir del trabajo publicado por Campbell y cols (Campbell et al., 2017), desde el repositorio *Gene Expression Omnibus* (GEO, N° acceso GSE93374). Estos datos corresponden a la secuenciación del ARN de células individuales (*scRNA-seq*), obtenidas de hipotálamos de ratones sometidos a diferentes condiciones alimenticias y energéticas; 1) ayuno de 24 horas (denominados como *Fasted*), 2) alimentados con comida estándar (4 % de grasa; denominados como Chow), 3) comida con 10% de grasa (denominados como Chow10) y 4) comida con 60% de grasa (denominados como HFD). Puesto que se procesaron los hipotálamos completos, en los datos obtenidos se encontraban las distintas poblaciones neuronales, gliales y microgliales que allí coexisten (más de 50 poblaciones distintas fueron identificadas); los archivos contenían una gran diversidad de ARNs y su procesamiento debió realizarse en el computador de alto rendimiento, perteneciente al programa de magíster en bioquímica y bioinformática. Inicialmente se hizo un análisis de control de calidad a los fragmentos de ARN o *reads*, para verificar parámetros importantes como el porcentaje de guanina y citosina (% GC), el tamaño de los *reads*, el contenido de bases indeterminadas o la presencia de adaptadores (Tabla 2). Con base en los parámetros anteriores se realizó el corte y filtrado a los archivos, con el fin de utilizar en los análisis posteriores, únicamente los *reads* que cumplieran con estas condiciones de calidad; se eliminaron los adaptadores presentes y todos los *reads* con un tamaño inferior a 35 bases. La población *Fasted* reportó no solo la cantidad más baja de *reads* secuenciados, sino también un menor contenido en el % GC, lo cual es determinante al evaluar la calidad de los *reads*, pues está relacionado con la calidad y estabilidad de la estructura del ADN sintetizado a partir del ARN secuenciado. El contenido de GC en el genoma de mamíferos, por lo general varía

entre 45-75 %, por tanto, un valor de 40 % es un indicativo de una secuenciación de baja calidad.

Tabla 2. Parámetros analizados en el control de calidad a reads provenientes de animales sometidos a diferentes condiciones alimenticias.

Condición experimental	N° de animales	Total reads	% GC	Tamaño de reads (N° bases)
Fasted	3	141'120.243	40	32-60
Chow	7	158'201.594	46	35-50
Chow10	3	167'269.116	44	20-50
HFD	4	174'524.472	44	20-50

Una vez seleccionados los *reads* de mejor calidad bajo los parámetros indicados anteriormente, se logró identificar a qué células correspondían, comparando con una matriz que contenía todos los diferentes tipos celulares secuenciados, de manera que se obtuvo un número estimado de células totales por cada muestra, y posteriormente, discriminar por tipo celular y así aislar únicamente los *reads* asignados a tanicitos (Tabla 3).

Tabla 3. Células identificadas por cada condición luego del control de calidad y filtrado.

Condición experimental	Tanicitos					Células totales identificadas
	$\alpha 1$	$\alpha 2$	$\beta 1$	$\beta 2$	Totales	
Fasted	2	4	8	4	18	1405
Chow	21	40	132	72	265	5005
Chow10	83	300	358	183	924	3206
HFD	78	170	255	118	622	3406

Seguido de la identificación de células, los *reads* correspondientes fueron alineados al genoma de ratón y finalmente fueron asignados a genes conocidos. De esta manera, se identificó en cada célula un perfil de datos asignados a genes individuales, de acuerdo con la condición experimental a la que pertenece.

10. El análisis de componentes principales permite identificar y agrupar poblaciones y subpoblaciones de tanicitos

La secuenciación de tipo *single cell RNA-seq* brinda una gran y compleja agrupación de datos provenientes de células individuales; en este caso, cada conjunto de datos contenía una alta cantidad de *reads*, incluso luego del control de calidad y filtrado; esto significó un incremento en la cantidad de variables con respecto a un análisis tradicional de *RNA-seq*. Antes de iniciar los análisis de expresión génica, es importante realizar un análisis de componentes principales (PCA, del inglés *Principal Components Analysis*), el cual simplifica la multidimensionalidad de los datos, derivada de la cantidad de células, genes y cantidad de *reads* asociados a cada uno, hasta lograr representarlos en un plano simple de dos dimensiones. Se realizó PCA a cada conjunto de células en las distintas condiciones alimenticias, con el fin de identificar su distribución en un plano que contempla no solo los tipos de genes que expresa, sino también valores asignados a estos genes y así obtener un perfil transcriptómico de cada célula individual (Fig. 15). Por definición geométrica, cada componente principal se obtiene por la combinación lineal de las variables originales (en este caso, la expresión de cada gen); el primer componente principal (PCA1), es la combinación normalizada de todas las variables, mostrando la mayor varianza, mientras que el segundo (PCA2), depende del cálculo del PCA1 y es perpendicular a este para mostrar la mínima varianza.

El foco principal del análisis son los tanicitos y, por tanto, se quiso comparar inicialmente la distribución y agrupación de estas células de acuerdo con las distintas condiciones experimentales, inicialmente tanicitos de la condición *fasted*, que presentó pocas células luego del filtrado y tanicitos de la condición control o chow (Fig. 15A). También se

compararon tanicitos de la condición chow10 con respecto a los de la condición HFD (Fig. 15B). Debido a la baja cantidad de células y las razones que fueron mencionadas con anterioridad, se excluyó la población *fasted* de los demás análisis, por tanto, en la siguiente comparación, se involucraron tanicitos de las condiciones restantes en un mismo gráfico (Fig. 15C). Es importante comparar la distribución y agrupación de una población celular, no solo frente a distintas condiciones, sino también frente a otras poblaciones totalmente distintas, de manera que sea evidente el cambio en la distribución, de acuerdo con la composición génica de cada una. Para lo anterior, primero se identificó la distribución de una población pequeña de neuronas, encargadas de producir la hormona liberadora de la hormona del crecimiento (GHRH, por sus siglas en inglés), en las tres condiciones experimentales (Fig. 15D), y posteriormente se comparó con tanicitos en las mismas condiciones (Fig. 15E).



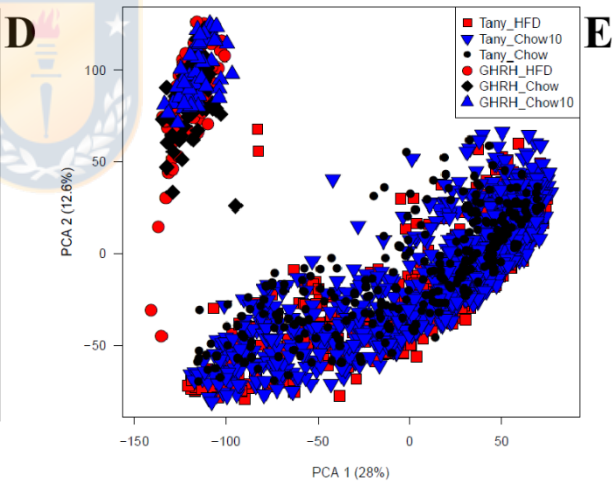
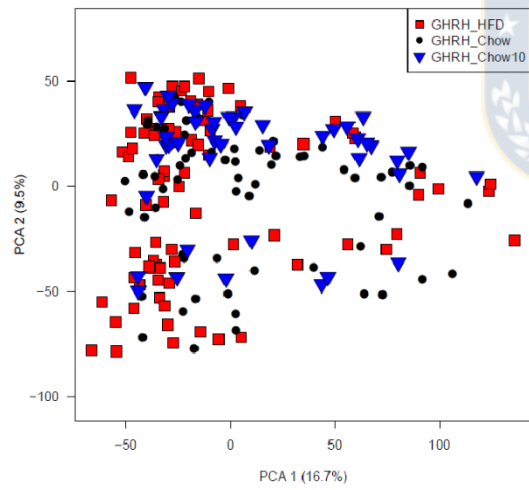
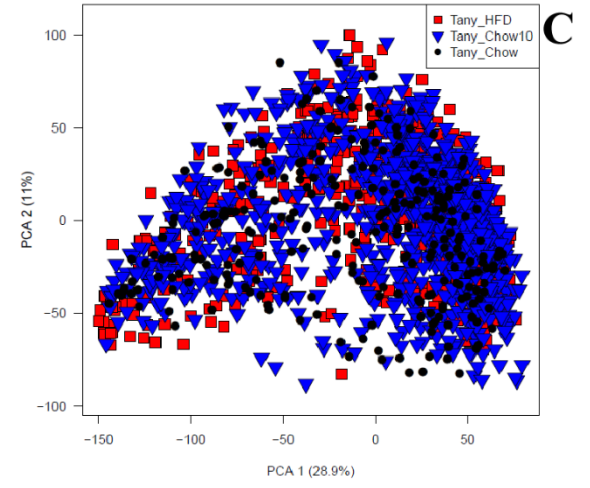
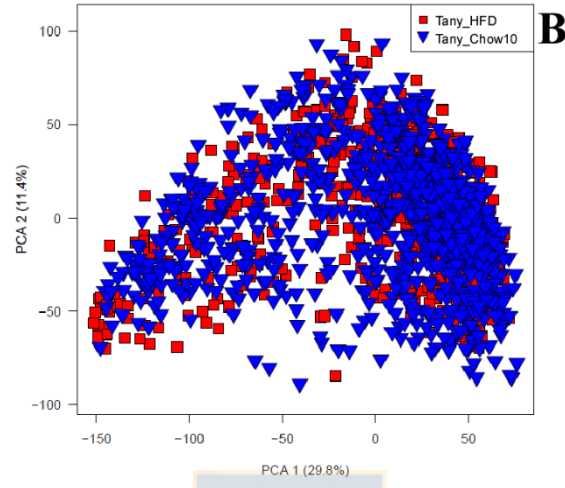
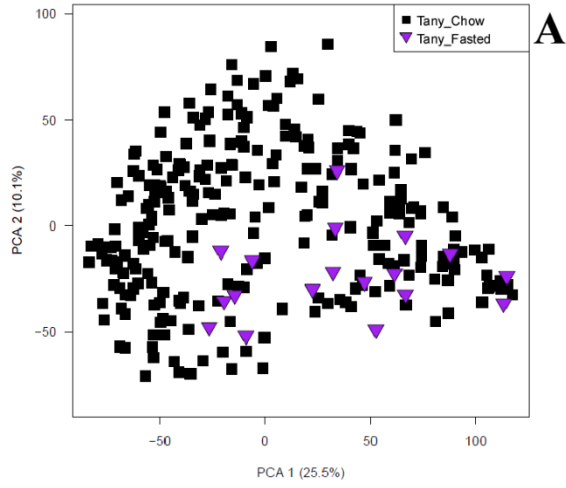


Figura 15. Distribución y agrupación de tanicitos en distintas condiciones experimentales de acuerdo con sus componentes principales.

(A-E) Gráficos de PCA para células individuales de tanicitos y neuronas GHRH en distintas condiciones alimenticias, ayuno o *fasted* (morado), control o chow (negro), baja en grasa o chow10 (azul) y alta en grasa o HFD (rojo). Los tanicitos fueron comparados primero en dos condiciones con el fin de identificar distribución inicial respecto a las condiciones, por una parte, *fasted* y chow (A) y luego chow10 y HFD (B). Debido a la baja cantidad de células en *fasted*, se tomaron como condiciones experimentales chow, chow10 y HFD (C). Posteriormente, se incluyó la población de neuronas GHRH en las mismas condiciones experimentales (D), para caracterizar la distribución de los tanicitos, frente a otra población celular distinta (E).

De acuerdo con los resultados anteriores y los análisis de control de calidad, se llegó a la conclusión que los *reads* provenientes de la condición *fasted* eran de baja calidad, de acuerdo con los parámetros estudiados y, por tanto, luego del proceso de filtrado, la población celular obtenida representaba una proporción mínima con respecto a las demás. Esto podría traducirse en un sesgo significativo en los análisis posteriores y en una notable disminución en la calidad de resultados, por esta razón, la condición *fasted* fue excluida de los análisis de expresión diferencial.

Con lo mostrado en la figura 15, se hace evidente que no existe un cambio importante en cuanto a los componentes principales de tanicitos, con respecto a las distintas condiciones alimenticias (Fig. 15A-C), sin embargo, es notoria la aglomeración de la mayoría de tanicitos en la misma zona del gráfico (Fig 15B y C). Lo anterior posiblemente debido a una conformación similar de componentes principales, en algunas subpoblaciones de tanicitos, lo cual se evidencia de nuevo, incluso cuando se comparan poblaciones celulares distintas

(Fig. 15E). En esta última comparación, es clara la diferencia en cuanto a la composición de ambas poblaciones celulares (debido a tipos de genes presentes en cada una), pues neuronas y tanicitos se agrupan en sitios distantes, de acuerdo con sus componentes principales, tomando distribuciones distintas a las mostradas en los PCA de las poblaciones individuales (Fig. 15 C y D).

Tomando en cuenta los análisis realizados a los PCA descritos anteriormente, fue importante separar la población total de tanicitos en subpoblaciones, de manera que pudiera realizarse un análisis más detallado en cuanto a la distribución de cada una y arrojando así, evidencia relacionada con la posible diferencia en cuanto a sus componentes principales (Fig. 16). Para esto, se tomaron los archivos de tanicitos totales en cada condición alimenticia y se obtuvo un archivo para cada subpoblación de tanicitos en cada una de las tres condiciones alimenticias, para un total de 12 nuevos archivos. Esta nueva cantidad de archivos amplía la posibilidad de comparaciones y también facilita su manipulación computacional, pues contienen menor cantidad de información. Se compararon las cuatro subpoblaciones de tanicitos, $\alpha 1$ (negro), $\alpha 2$ (amarillo), $\beta 1$ (rojo) y $\beta 2$ (azul) de acuerdo con una misma condición alimenticia, chow (Fig. 16A), chow10 (Fig. 16B) y HFD (Fig. 16C); de manera tal que fuera posible ubicarlas en el mismo gráfico y así, describir su comportamiento.

La distribución de las subpoblaciones en general fue bastante similar, independiente de la condición experimental, se logró identificar que la aglomeración de células evidenciada en la figura 15 correspondía al conjunto de tanicitos $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\beta 1$. Es notorio también, que las subpoblaciones β son más abundantes que las α ; sin embargo, no existe ninguna evidencia experimental sobre esta cuantificación y podría deberse únicamente al proceso de control de calidad y filtrado, como se mostró en la tabla 3. Por otra parte, es notable que la subpoblación

$\beta 2$ posee una distribución distinta a las otras subpoblaciones, de acuerdo con sus componentes principales, esto podría indicar una diferencia importante en sus características génicas básicas y fue identificado de manera similar por Campbell y cols.

Realizados los análisis anteriores, se prosiguió con la prueba de expresión diferencial, con el fin de identificar genes candidatos de los tanicitos, que hubiesen modificado significativamente su expresión, frente al tratamiento con la dieta Chow 10 o HFD.

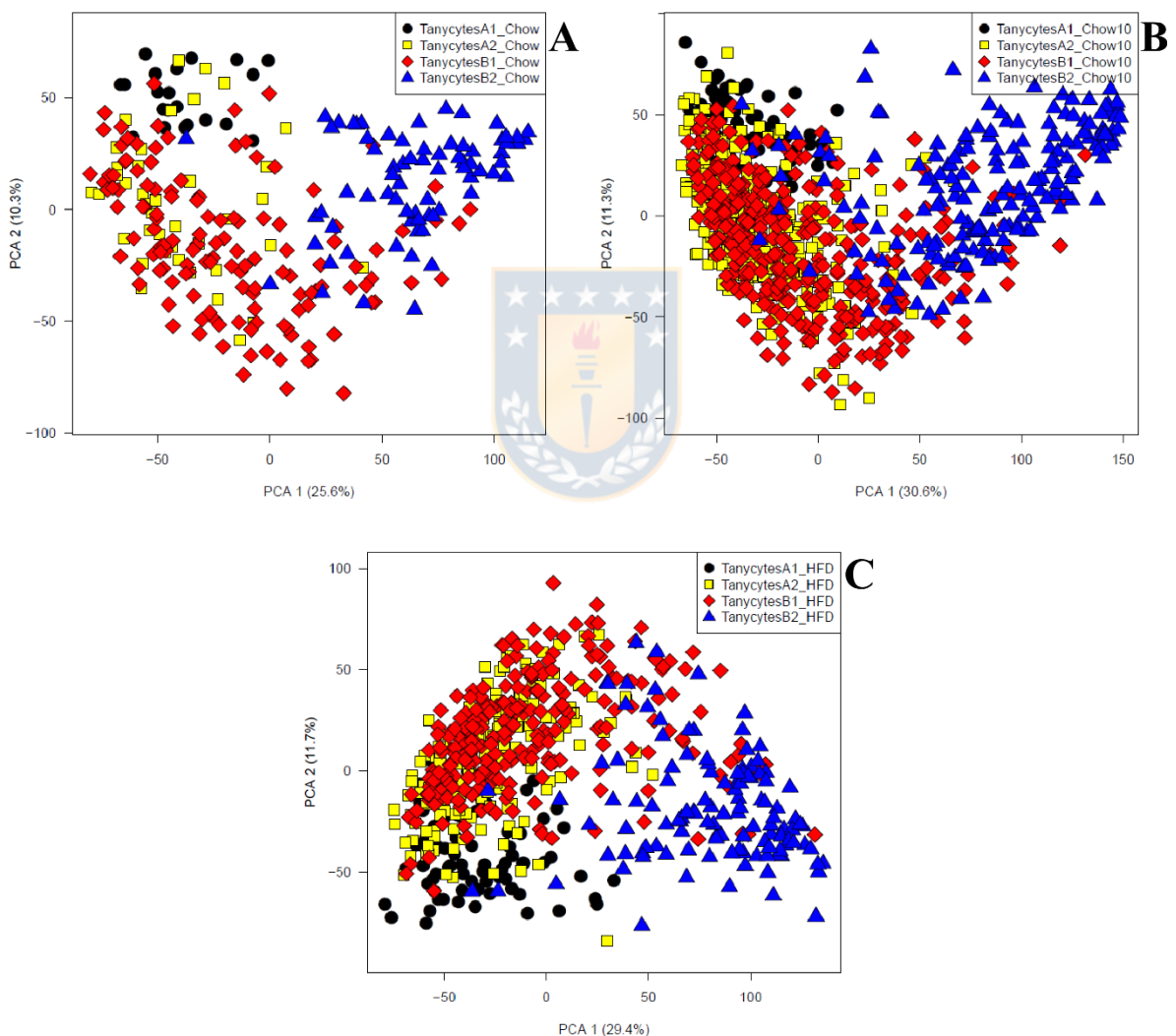


Figura 16. Distribución y agrupación de subpoblaciones de tanicitos con respecto a una misma condición experimental de acuerdo con sus componentes principales.

(A-C) Gráficos de PCA para células individuales de subpoblaciones de tanicitos $\alpha 1$ (negro), $\alpha 2$ (amarillo), $\beta 1$ (rojo) y $\beta 2$ (azul) de acuerdo con una misma condición alimenticia, chow (A), chow10 (B) y HFD (C). Se muestra una agrupación en la parte izquierda de cada gráfico, por parte de tanicitos $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\beta 1$, mientras que los $\beta 2$ se ubican en su mayoría hacia el sector derecho.

11. El análisis de expresión diferencial permite identificar genes de tanicitos que alteran su expresión frente al aumento de grasas en la dieta

La expresión génica o transcripción de genes, es el proceso mediante el cual se generan transcritos o ARNm, desde los genes que codifican para proteínas. Teniendo en cuenta esto y gracias a la secuenciación masiva de datos, es posible identificar y cuantificar cada uno de los transcritos secuenciados y asignados a genes, usando métodos bioinformáticos y generando así un análisis de expresión diferencial (ED). El análisis de ED para la población completa de tanicitos, se realizó comparando los niveles de expresión para cada gen de manera individual en la condición Chow, con respecto a las condiciones Cho10 y HFD, de manera que se obtuvieran valores de expresión normalizados para Chow10 y HFD, a partir de la expresión basal en Chow (Fig. 17). Los valores de ED para cada gen fueron graficados en un MA-plot, el cual representa en el eje Y (también denominado M), el cociente logarítmico de los dos valores correspondientes al mismo gen, representando las veces de cambio con respecto a la expresión control; y en el eje X (también denominado A), se representa el promedio logarítmico de los dos valores anteriores. De acuerdo con esto, es importante mencionar que los genes que modificaron su expresión significativamente son aquellos que mayor dispersión tuvieron y, por tanto, son aquellos más alejados del punto de

inicio en cero, representado con una línea roja (Fig. 17). Debido a que en la prueba de ED solo pueden incluirse dos condiciones, se realizaron dos análisis por separado; condición Chow frente a Chow10 (Fig. 17A) y condición Chow frente a HFD (Fig. 17B), de manera que en cada uno se identificara la variación con respecto a la misma condición control.

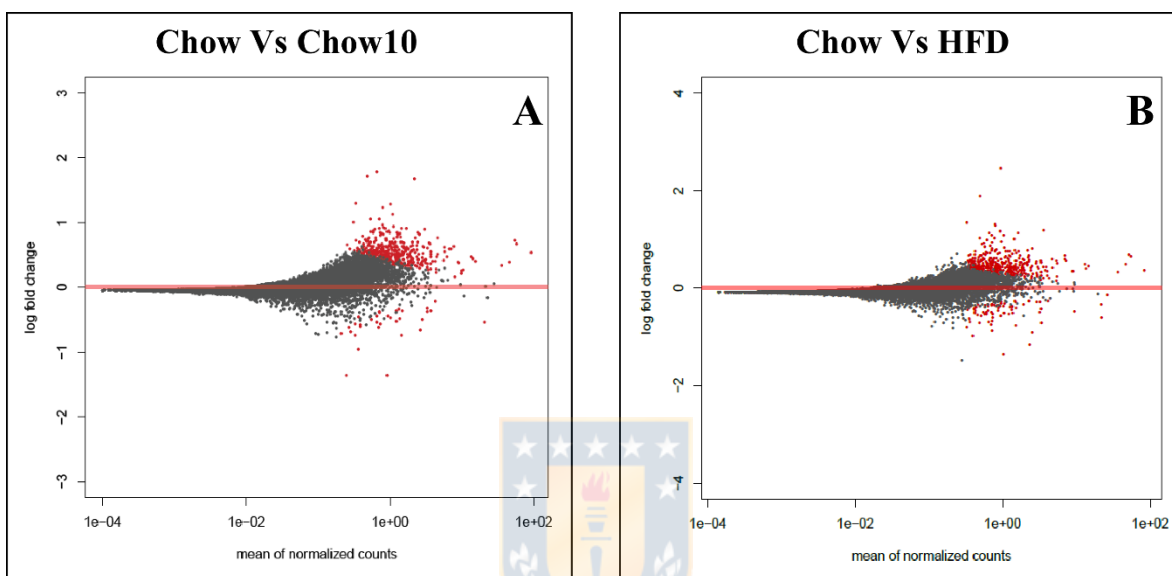


Figura 17. Dispersión de valores obtenidos del análisis de expresión diferencial para tanicitos en diferentes condiciones alimenticias.

MA-plots para tanicitos totales, que permiten identificar variaciones de la expresión génica, a partir de la comparación de valores para cada gen en condición control (Chow), con respecto al valor del mismo gen en diferentes condiciones alimenticias; baja en grasa (Chow10; A) y alta en grasa (HFD; B). Los puntos rojos representan los genes significativamente afectados, mientras que los puntos grises representan genes sin cambios significativos.

De los gráficos obtenidos, cada punto representa un gen diferente de los tanicitos totales, de color rojo los expresados diferencialmente ($M > \pm 0.5$ y $p < 0.05$) y en gris los que no sufrieron cambios significativos en su expresión. Los valores negativos en M corresponden a los genes

que disminuyeron su expresión frente al aumento en el contenido de grasas de la dieta y aparentemente son menor cantidad, con respecto a los genes que aumentaron su expresión en las mismas condiciones alimenticias (valores positivos en M). Al comparar las poblaciones de tanicitos de manera general, no puede identificarse un cambio importante en la distribución de valores, desde el MA-plot. No obstante, es evidente la mayor cantidad de genes que regularon su expresión positivamente, en relación con los que lo hicieron de forma negativa, tanto en la condición Chow10 como en HFD. Dado lo anterior, se decidió hacer el análisis de ED comparando por separado cada subpoblación de tanicitos, con el fin de identificar diferencias importantes en su expresión génica frente a un incremento en la concentración de grasas obtenidas de la dieta (Fig. 18).

El análisis de ED se realizó tomando como base los valores de expresión en la condición Chow, frente a los valores en las condiciones Chow10 (Fig. 18A-D) y HFD (Fig. 18E-H), por separado. Los análisis se realizaron de manera individual para cada subpoblación de tanicitos, $\alpha 1$ (Fig. 18A y E), $\alpha 2$ (Fig. 18B y F), $\beta 1$ (Fig. 18C y G), y $\beta 2$ (Fig. 18D y H), con el objetivo de evaluar dispersión de los valores de expresión génica en cada una y también para identificar una posible subpoblación más sensible al aumento en la concentración de grasas obtenidas de la dieta. De esta manera, parece existir mayor cantidad de genes diferencialmente afectados frente a la condición Chow10 que en HFD, evidenciando así, una mayor respuesta en la regulación génica en los tanicitos de animales que fueron expuestos a una dieta con 10% de grasa, con respecto a aquellos que recibieron una con 60% de grasa, por un tiempo prolongado. Tanicitos α presentan un perfil de expresión más heterogéneo que los tanicitos β , comparando la distribución de valores desde el cero (línea roja horizontal), incluso si se comparan las subpoblaciones por separado. Lo anterior podría estar directamente

relacionado con que tanicitos α están en contacto con diversas poblaciones neuronales como el NDM, NVM y NA, mientras que los tanicitos β lo hacen con NA y EM (en EM es mínima la cantidad de neuronas presentes). El conjunto de genes de tanicitos β , responden de manera homogénea, disminuyendo sus niveles de expresión génica (Fig. 18C, D y G, H), frente al aumento de lípidos en sangre, esto debido a su ubicación privilegiada en el hipotálamo, al formar la barrera de difusión EM-LCR, así como entre EM y parénquima hipotalámico; detectando de esta forma cualquier variación de diversos metabolitos provenientes del líquido sanguíneo.

Los resultados anteriores en conjunto muestran cambios en la regulación génica, dependiente no solo de la cantidad de lípidos provenientes de la dieta, sino también de acuerdo con la subpoblación de tanicitos analizada por separado. Por lo anterior se hizo importante cuantificar los genes que modificaron considerablemente su expresión basal, separando aquellos que lo hicieron de forma positiva, de aquellos que lo hicieron de forma negativa. Para cumplir este objetivo, se consideraron únicamente los genes expresados diferencialmente, de forma positiva y negativa, es decir, aquellos con un valor de $M > \pm 0.5$ y $FDR < 0.05$ (M es el valor del Log_2 *Fold Change* y FDR el *False Discovery Rate*). En la figura 19 se muestra el número de genes que modificaron significativamente su expresión en la población total de tanicitos y en cada subpoblación por separado, con respecto a Chow10 y HFD.

No existieron grandes diferencias en la cantidad de genes afectados por Chow10 o HFD en el análisis para la población total, sin embargo, si solo se toma en cuenta la población de tanicitos, es considerablemente mayor el número de genes regulados positivamente, 85 genes para Chow10 y 58 para HFD, mientras que se identificaron 18 genes regulados

negativamente en Chow10 y 29 en HFD. Por otra parte, cuando se analizaron las subpoblaciones por separado, hubo cambios importantes no solo en la forma en la que se regularon los genes, sino también, en la cantidad de genes involucrados para ello. Tanicitos $\alpha 1$, $\beta 1$ y $\beta 2$ presentaron una inhibición significativa en la expresión de 96, 170 y 160 genes, frente a Chow10 y 112, 121 y 90 genes frente a HFD, respectivamente; mientras que 26, 24 y 79 genes incrementaron su expresión significativamente frente a Chow10 y 16, 34 y 78 lo hicieron frente a HFD, respectivamente. De manera contraria a la descrita anteriormente, tanicitos $\alpha 2$ presentaron una mayor cantidad de genes sobre expresados, 208 en Chow10 y 64 en HFD, frente a los inhibidos, 25 en Chow10 y 52 en HFD.

Con base en los resultados anteriores es posible afirmar que, frente a un incremento en la concentración de grasas provenientes de la dieta, las subpoblaciones de tanicitos $\alpha 1$, $\beta 1$ y $\beta 2$ inhiben la expresión de una mayor cantidad de genes, respecto al número de genes que son sobre expresados, contrario al comportamiento evidenciado en los tanicitos $\alpha 2$, donde prevalece el incremento en la expresión génica. De manera sorprendente, tomando el conjunto completo de tanicitos, existe una importante disminución en la cantidad de genes significativamente afectados, sin embargo, se presenta una mayor favorabilidad hacia la sobreexpresión de genes. Lo anterior puede explicarse desde la manera en que se realiza el análisis de ED; pues los valores de expresión son diferentes en cada gen, para el conjunto total de tanicitos y sus subpoblaciones. De esta manera, el cálculo de ED varía y con esto, el número de genes regulados positiva y negativamente, con respecto a un grupo control. También se hace evidente un mayor efecto de la dieta baja en grasa sobre la regulación génica, que el mostrado por la dieta rica en grasa. Todo lo anterior indica que los análisis de ED varían no solo de acuerdo con las condiciones experimentales, sino también frente a las

poblaciones y respectivas subpoblaciones de interés; esto es especialmente determinante en el hipotálamo, donde se han descubierto más de 50 poblaciones distintas de células que a su vez están conformadas por diversas subpoblaciones, lo que se traduce en un complejo mapa de regulación de la expresión génica, dependiente también de diferentes factores como los metabólicos.



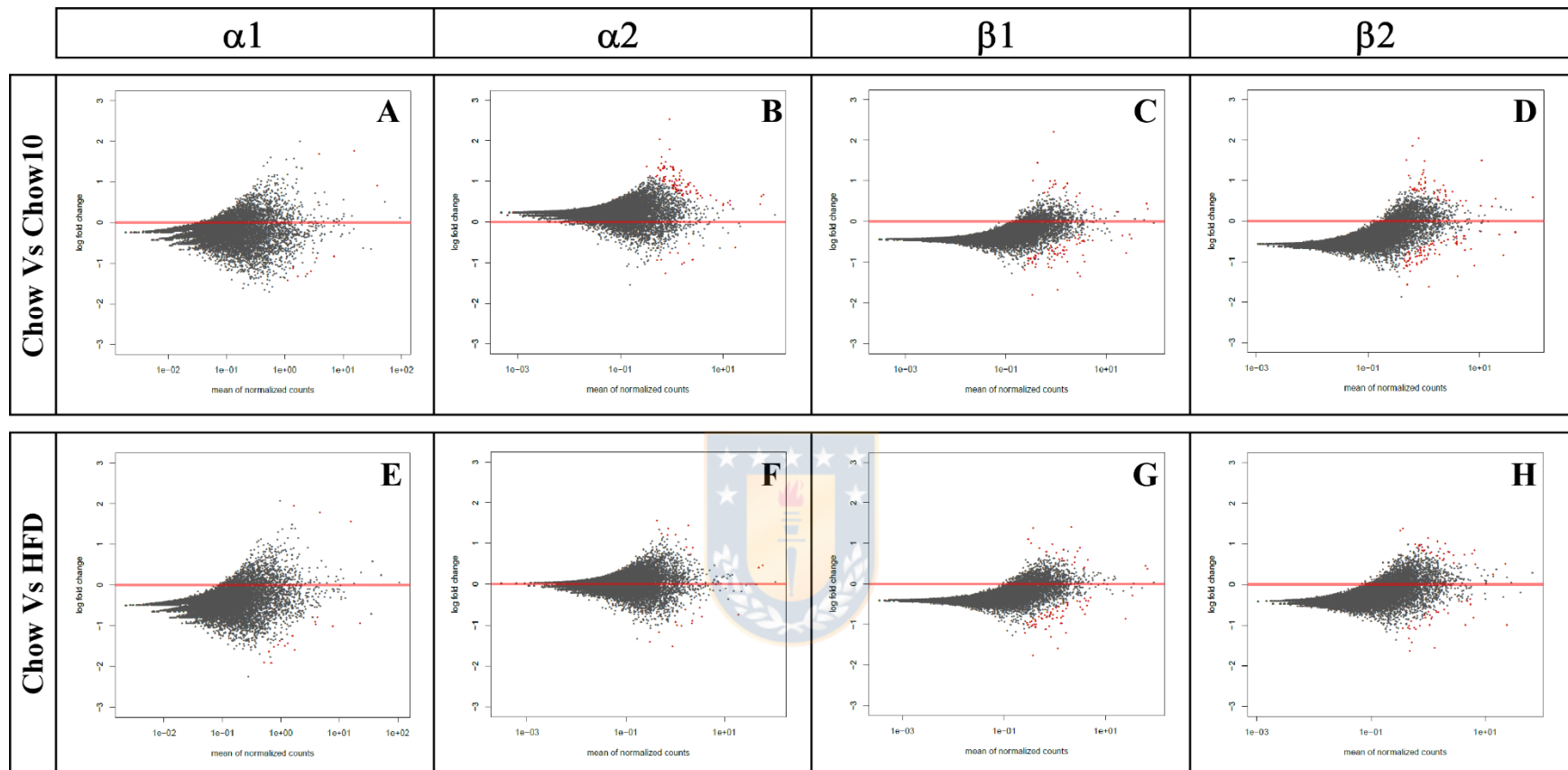


Figura 18. Dispersión de valores obtenidos en el análisis de expresión diferencial para subpoblaciones de tamicitos en diferentes condiciones alimenticias.

(A-H) *MA-plots* para subpoblaciones de tamicitos; $\alpha 1$ (A y E); $\alpha 2$ (B y F); $\beta 1$ (C y G) y $\beta 2$ (D y H), que permiten identificar variaciones en la expresión génica, a partir de la comparación de valores para cada gen en la condición control (Chow), con respecto al valor del mismo gen en la condición de dieta baja en grasa (Chow10; A-D) y dieta alta en grasa (HFD; E-H). Los puntos rojos en cada gráfico representan los genes mayormente afectados, mientras que los puntos grises representan genes sin cambios significativos.

Regulación de la expresión génica frente a Chow10 frente a HFD

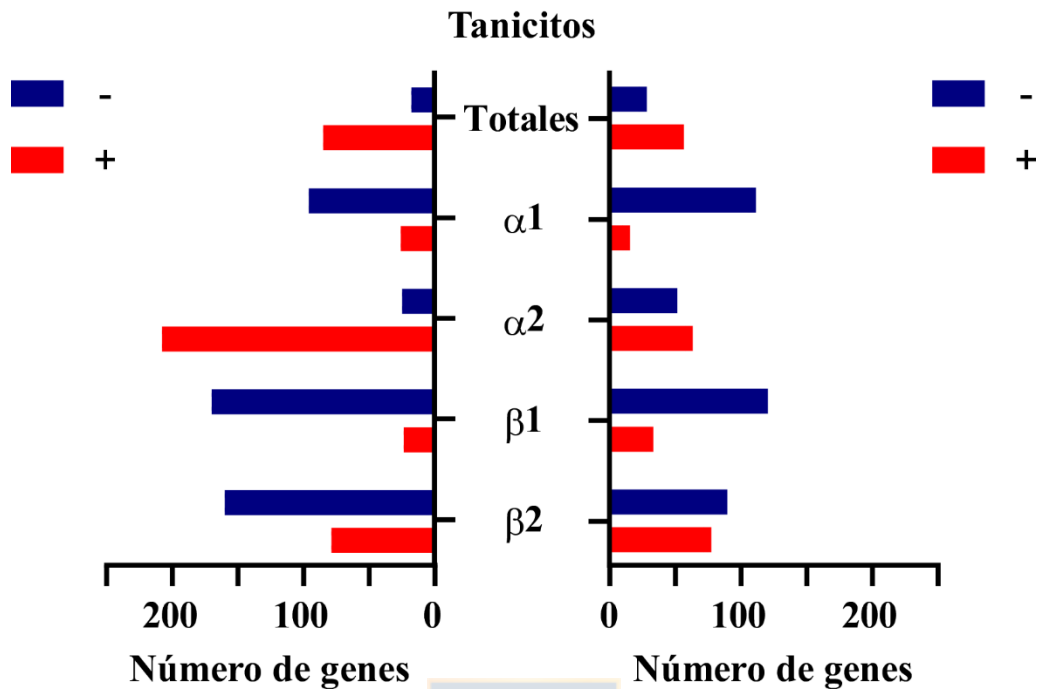


Figura 19. Respuesta génica de tanicitos frente a dieta baja y alta en grasa.

Comparación del número de genes mayormente afectados en subpoblaciones de tanicitos, con respecto a condiciones alimenticias bajas y alta en grasa (Chow10 y HFD, respectivamente). Se muestra la cantidad de genes cuya expresión fue regulada tanto positiva (rojo), como negativamente (azul).

Una vez realizados los análisis anteriores con base en la cantidad de genes diferencialmente afectados, es determinante la identificación de los principales genes responsables de dicha respuesta génica en los tanicitos frente a un aumento prolongado en el consumo de grasas. Para lograr esto se graficaron los resultados de la ED en un mapa de calor.

12. Valores de expresión diferencial de tanicitos permiten identificar genes clave en respuesta a cambios en la dieta

Los mapas de calor o *heatmaps* son un tipo de gráfico común en los análisis de expresión génica, independiente del tipo de muestra o condición a la que se sometan estas. Básicamente se asigna una escala de colores a la variación de los valores de expresión, teniendo en cuenta valores positivos, negativos y cero. Es una herramienta útil, pues permite relacionar fácilmente cambios en la expresión de un grupo ilimitado de genes de un número ilimitado de muestras, identificando así, genes candidatos, responsables del posible efecto evidenciado a partir de la comparación de condiciones experimentales.

Para los presentes análisis fueron generados mapas de calor a partir de las mismas comparaciones experimentales anteriores, la condición Chow frente a Chow10 y HFD por separado. Inicialmente se realizó el análisis para el conjunto completo de tanicitos, donde los valores de ED ($\text{Log}_2 \text{Fold Change}$) fueron relacionados con una escala de color que varía desde azul para valores negativos, pasando por blanco para genes sin variación, hasta rojo para valores positivos (Fig. 20). Para lo anterior, se reorganizaron los genes y de acuerdo con sus valores de expresión, se seleccionaron los 30 genes que mayores cambios sufrieron en su expresión, independiente de si su regulación fue positiva o negativa. Concordando con los resultados anteriores, no existen cambios relevantes en la expresión génica al comparar la población total de tanicitos, frente a Chow10 (Fig. 20A) y HFD (Fig. 20B); sin embargo, la intensidad especialmente del color rojo permite señalar un grupo de genes cuya ED fue notablemente mayor frente a Chow10, mientras que en la condición HFD, la expresión génica aumentó de manera más homogénea. Debido a la similitud en ED de la población total de tanicitos en las dos condiciones experimentales, se generaron mapas de calor para las subpoblaciones de tanicitos, para tener un panorama más claro y específico, respecto a la regulación génica para cada subgrupo. De manera

similar a los resultados mostrados en la figura 20, las subpoblaciones $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\beta 1$, presentaron genes principalmente con valores de ED mayores a cero, pero sin ninguna variación destacable o relevante frente a las dos dietas; esto significa que aunque existe una gran variedad de genes con valores altos de ED (positivos y negativos), los 30 genes con mayor variación, presentan un comportamiento análogo entre si (datos no mostrados), lo cual dificulta relacionar las diferencias en regulación génica respecto a cambios en la dieta.

De manera destacable, la subpoblación $\beta 2$ mostró un comportamiento notoriamente diferente frente a los dos tipos de dieta (Fig. 21); de manera general se puede apreciar que los 30 genes mayormente afectados por la dieta Chow10, presentan valores negativos de ED, esto se relaciona directamente con una significativa inhibición en la expresión de esos genes (Fig. 21A). De forma contraria, los genes mayormente afectados por HFD, presentaron valores positivos de ED, relacionados con una sobreexpresión de estos, frente al exceso de grasas (Fig. 21B).

Gracias a los mapas de calor descritos anteriormente, se identificaron los 30 genes mayormente afectados, y con estos se realizó un análisis cruzado entre los genes de tanicitos totales y $\beta 2$, en las dos condiciones alimenticias (cuatro grupos de genes en total), arrojando como resultado cinco genes en común, cuya expresión fue significativamente afectada (Tabla 4).

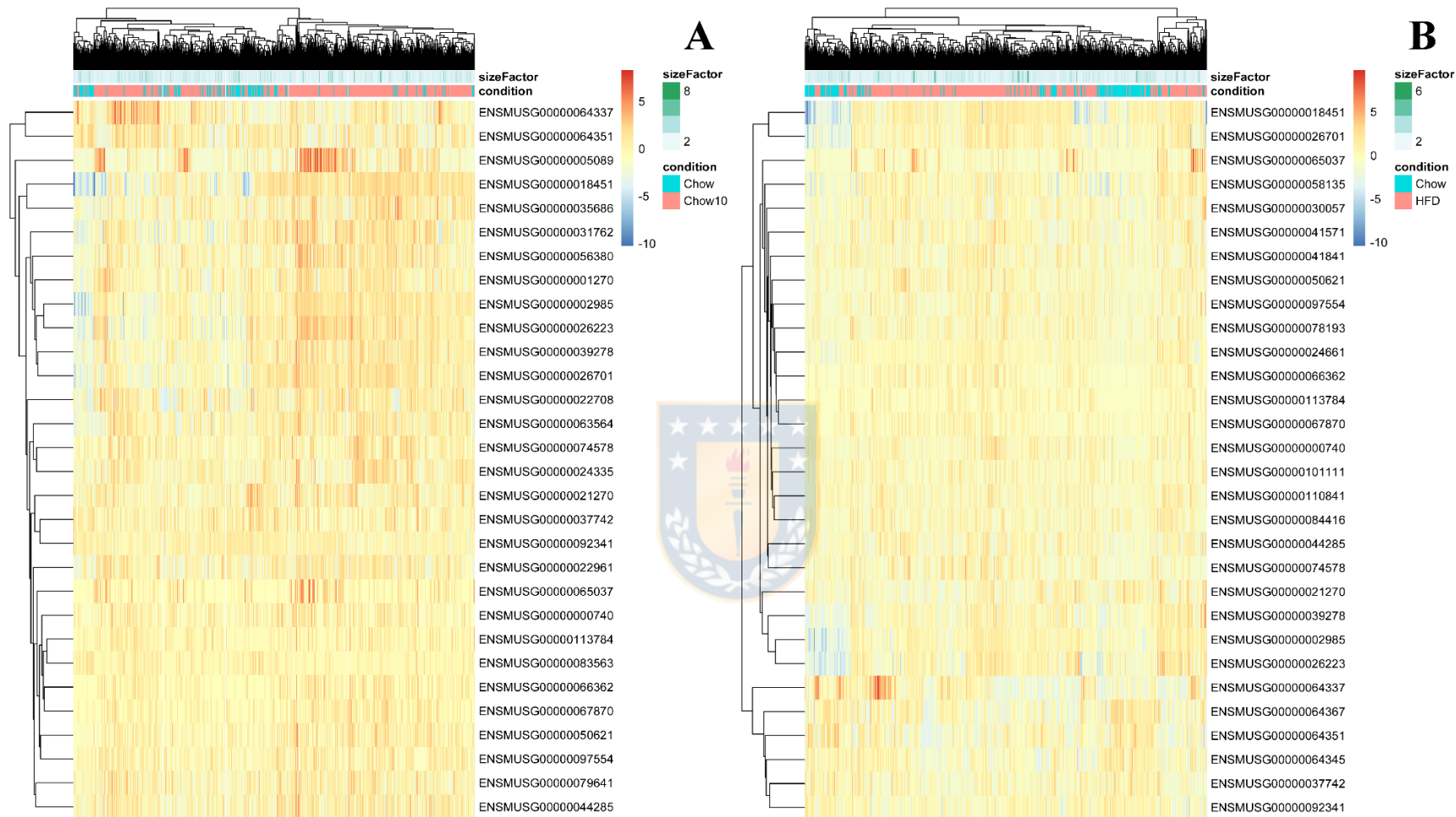


Figura 20. Genes mayormente afectados en tanicitos como respuesta al consumo de dietas con mayor contenido de grasas.

(A-B) 30 genes con mayor expresión diferencial en tanicitos totales de animales que consumieron dietas con 10 % (A) y 60 % de grasas (B). A cada celda se asignó un color dentro de una escala desde azul hasta rojo, representando valores de expresión diferencial (Log_2 *Fold Change*) negativos y positivos, respectivamente.

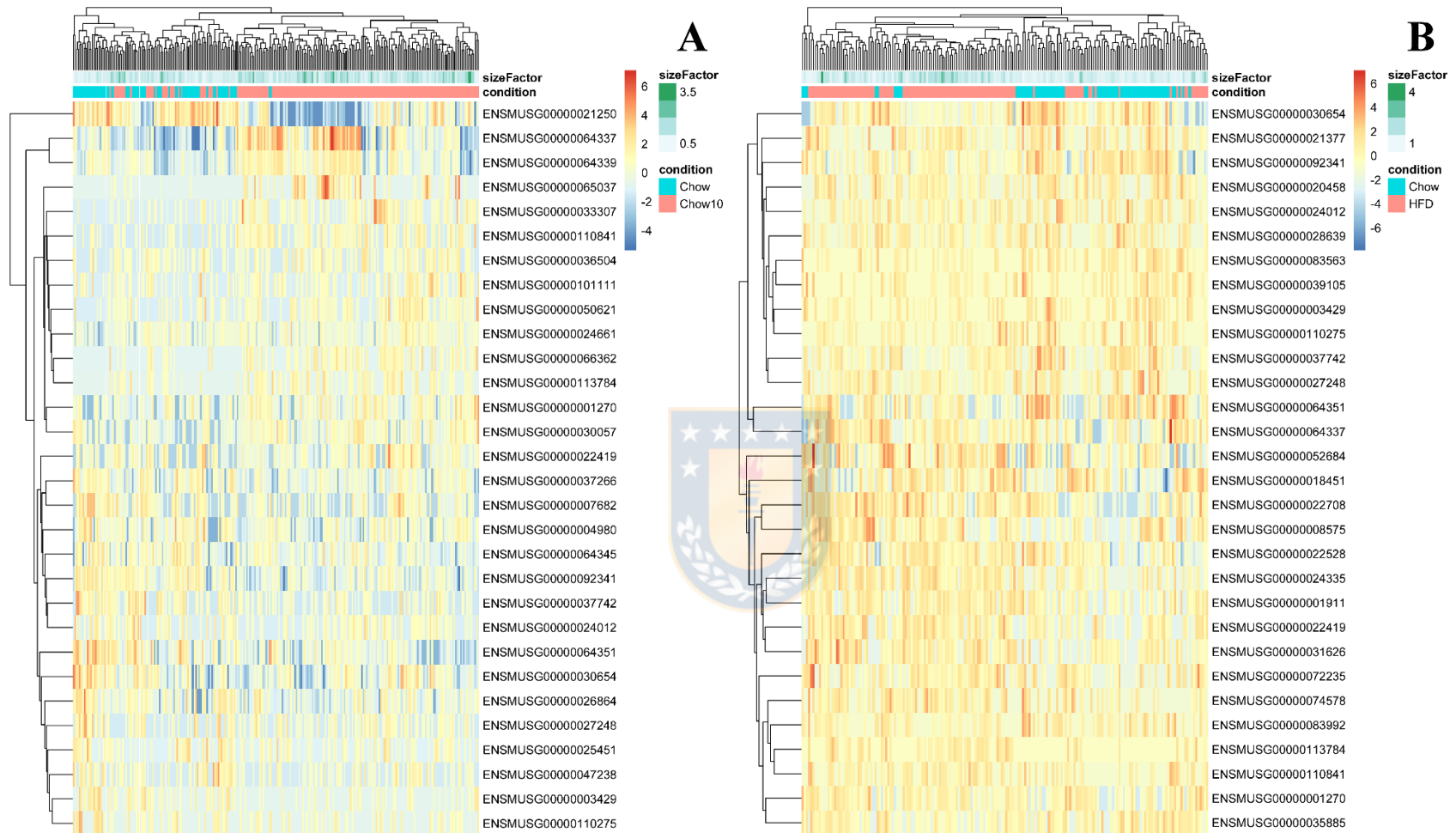


Figura 21. Genes mayormente afectados en tanicitos $\beta 2$ como respuesta al consumo de dietas con mayor contenido de grasas.

(A-B) 30 genes con mayor expresión diferencial en tanicitos $\beta 2$ de animales que consumieron dietas con 10 % (A) y 60 % de grasas (B). A cada celda se asignó un color dentro de una escala desde azul hasta rojo, representando valores de expresión diferencial ($\text{Log}_2 \text{Fold Change}$) negativos y positivos, respectivamente.

Tabla 4. Genes diferencialmente expresados en tanicitos frente a dietas con mayor contenido de grasas respecto a una dieta control.

Gen diferencialmente expresado			Ontología genética		
ID de Ensembl	Nombre	Símbolo	Función molecular	Proceso biológico	Componente celular
ENSMUSG00000037742	Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	<i>Eef1a1</i>	Unión a derivados de carbohidratos, actividad hidrolasa y unión a ARN	Diferenciación y muerte celular; procesos metabólicos proteicos y respuesta a estímulos	Proyecciones celulares, citoesqueleto, citosol, núcleo y membrana plasmática
ENSMUSG00000064337	Mitochondrially encoded 12S rRNA	<i>mt-Rnr1</i>	Desconocida	Respuesta a estímulos y organización de componentes celulares	Mitocondria y lumen de organelos
ENSMUSG00000064351	Mitochondrially encoded cytochrome c oxidase I	<i>mt-Co1</i>	oxidorreductasa y transporte	Respuesta a estímulos	Mitocondria y envoltura de organelos
ENSMUSG00000092341	Metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 (non-coding RNA)	<i>Malat1</i>	Desconocida	Proliferación y organización de componentes celulares	Núcleo y lumen de organelos
ENSMUSG00000113784	No asignado	<i>Gm46400</i>	Desconocida	Desconocida	Desconocida

Gracias a la búsqueda en servidores especializados, se puede obtener valiosa información sobre aspectos fundamentales de la participación del gen en diversos procesos biológicos, componentes celulares y funciones moleculares; el conjunto de estos tres aspectos se denomina ontología genética (Tabla 4). Para el presente análisis se utilizó el servidor *GO enrichment analysis* (geneontology.org). A partir del código de *Ensembl*, se encuentra información específica que permite relacionar la expresión del gen con su rol dentro de la célula, a excepción de los genes de los que se conoce solo su secuencia y por tanto están incluidos en cada genoma, pero se desconocen sus funciones y procesos en los que participa; tal como el gen con código ENSMUSG00000113784, el cual tampoco posee un nombre o símbolo oficial. Los cuatro genes restantes (*Eef1a1*, *mt-Rnr1*, *mt-Col* y *Malat1*), tienen funciones como unión a derivados de carbohidratos, también participan en procesos como proliferación, diferenciación y muerte celular y en común participan en la respuesta a estímulos. Adicionalmente son clave en la composición de componentes celulares como núcleo, mitocondrias, citoesqueleto y forman parte del lumen y la envoltura de diferentes organelos.

Siguiendo con la visualización de cambios en la expresión, a través de mapas de calor, se seleccionaron manualmente diversos genes que participan en procesos como neurogénesis, transporte de carbohidratos y monocarboxilatos, factores de crecimiento, entre otros, y por tanto han sido de gran interés en la investigación que aborda el laboratorio de Biología Celular. Se graficaron los valores de la ED para estos genes ($\text{Log}_2 \text{Fold Change}$), de manera que pudiera identificarse fácilmente la expresión correspondiente a la población de tanicitos totales, así como para cada subpoblación por separado, frente a las condiciones experimentales Chow10 y HFD (Fig. 22). Genes relacionados con el proceso de neurogénesis

como *Nes*, *Notch2*, *Sox9* y *Slc1a3*, incrementan su expresión, frente a un aumento en el contenido de grasas de la dieta, mientras que en general, los genes asociados a transportadores (*Slc16a1*, *Slc16a3* y *Slc2a2*), disminuyeron su expresión. Por otra parte, se identificó un aumento en la expresión de los genes codificantes para proteínas relacionadas con el metabolismo de glucosa, como glucoquinasa (*Gck*) y la proteína reguladora de glucoquinasa (*Gckr*), principalmente en tanicitos $\alpha 2$. Interesantemente, el gen *Rax*, relacionado con la regulación de la proliferación de PNs, incrementó su expresión tanto en la población total, como en cada subpoblación de tanicitos para ambas condiciones alimenticias. Genes correspondientes a factores de crecimiento o mitogénicos, como *Fgf2*, *Fgf10* y *Fgf18*, reprimen o aumentan su expresión de manera distinta en cada subpoblación de tanicitos, aunque en la población total, aumenta frente a la dieta Chow10. Genes normalmente expresados en células precursoras como *Gfap* y *Gjal*, aumentaron su expresión en la población total de tanicitos, únicamente frente a Chow10. Por otra parte, frente a HFD, *Gfap* incrementó su expresión en tanicitos $\alpha 1$ y $\alpha 2$, mientras que *Gjal* lo hizo en tanicitos $\beta 1$ y $\beta 2$.

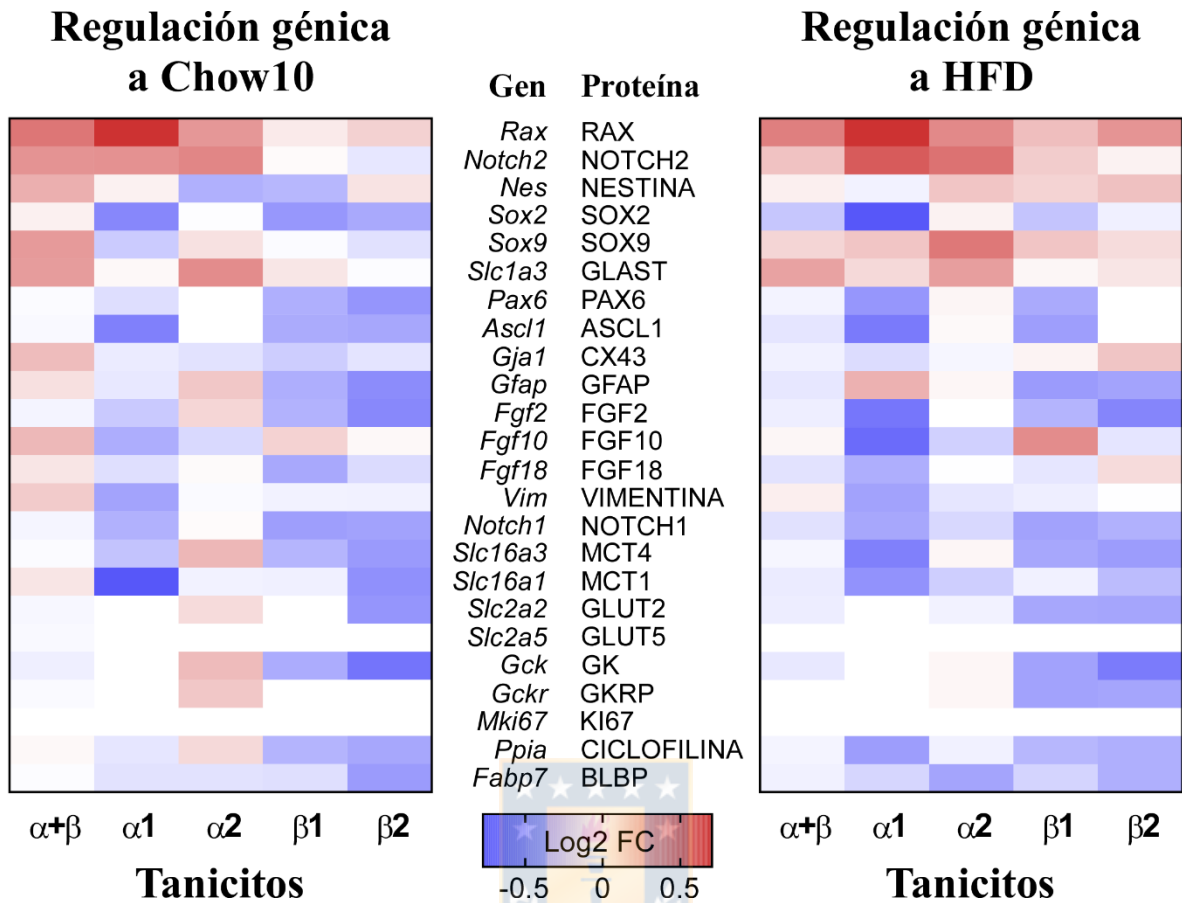


Figura 22. Análisis de expresión para genes neurogénicos y de importancia metabólica en tanicitos.

Cambios en la expresión de genes seleccionados, en subpoblaciones de tanicitos, frente a dos tipos de dieta, una con 10 % de grasas (mapa izquierdo) y otra con 60 % (mapa derecho). La expresión génica es representada en mapas de calor, asignando color azul a valores negativos de Log₂ Fold Change y rojo a valores positivos, genes con menor o mayor expresión frente al control, respectivamente.

V. DISCUSIÓN

1. Efecto del incremento de glucosa en la dieta sobre la proliferación en hipotálamo y complejo dorsal vagal

En las últimas dos décadas, diversos estudios han identificado el nacimiento de nuevas neuronas en el hipotálamo de murinos adultos, estimulado por la inyección icv de factores mitogénicos o la exposición a HFD (Kokoeva et al., 2005; Lee et al., 2012; Robins et al., 2013). Se demostró que la mayoría de estas células migran y se incorporan a núcleos neuronales como el NA y allí pueden adquirir por ejemplo el fenotipo de neuronas anorexigénicas POMC. Este evento sugiere que la neurogénesis hipotalámica ocurre como respuesta a un desequilibrio energético y metabólico propiciado por el consumo de HFD (Gouazé et al., 2013). Sin embargo, este hallazgo no ha sido reproducido con ninguna otra dieta hipercalórica, ni estudiado en otra zona cerebral relacionada con el comportamiento alimenticio; por tal razón, en este trabajo de investigación se analizó el efecto de HSD en hipotálamo y CDV de ratas adultas.

Se demostró en este trabajo, que la exposición aguda a HSD en ratas adultas, incrementa la proliferación de tanicitos $\beta 2$, lo cual concuerda con los resultados de otras investigaciones, donde se ha comprobado el potencial neurogénico y proliferativo de estas células, y por tanto se han catalogado como PNs en hipotálamo (Kano et al., 2019; Lee et al., 2012; Lee et al., 2014). El aumento significativo en la proliferación como consecuencia del incremento en el consumo de sacarosa se restringió a tanicitos $\beta 2$; si bien se identificaron células BrdU+ en el parénquima hipotalámico, EM y tanicitos α , no mostraron diferencias significativas con respecto a la condición control. En otras investigaciones donde se ha usado HFD tampoco se han encontrado diferencias significativas de proliferación en estas zonas hipotalámicas,

concordando con esta investigación (Safahani et al., 2019), así como hay investigaciones que no vieron incrementada la proliferación de tanicitos β , pero sí de tanicitos α , como respuesta a FGF2 (Robins et al., 2013).

Las dietas ND y HSD aportan la misma cantidad de energía (aproximadamente 4 Kcal/g) y están compuestas en un 61 % por carbohidratos, la diferencia radica en el tipo de estos; mientras HSD contiene sacarosa, ND contiene almidón de maíz, cuya estructura se basa en complejas cadenas ramificadas de glucosa, lo cual hace lenta su absorción. Este hecho sustenta el aumento de la glicemia evidenciado en las ratas alimentadas con HSD, respecto a las alimentadas con ND y permite así, sugerir que tanicitos β_2 detectan el incremento en la glucosa disponible y esto se traduce en el aumento de su proliferación. Además, se demostró también que, en el tronco posterior, las células del AP aumentaron significativamente su proliferación, luego de la exposición aguda a HSD, pero no lo hicieron así las células que forman el CC. Este efecto permite relacionar el aumento en el consumo de glucosa, junto con el incremento en la proliferación celular en OCVs de zonas cerebrales relacionadas con el comportamiento alimenticio y el balance energético. Puesto que la proliferación en CDV hasta ahora no había sido investigada como respuesta a algún tipo de dieta, este podría significar el primer dato que evidencie cambios significativos en la proliferación basal de células del AP frente al consumo de una dieta hipercalórica.

En relación con los resultados obtenidos, otros estudios de animales alimentados con HFD, mostraron un incremento significativo en la proliferación de células en EM solo en hembras, que posteriormente se tradujo en un aumento en la neurogénesis (Lee et al., 2014), indicando que puede existir una respuesta sexo específico en esta respuesta contrarreguladora frente a una dieta rica en grasas. Nuestros estudios fueron realizados únicamente en machos,

coincidiendo con un aumento en la proliferación como respuesta a la dieta hipercalórica. Estos hallazgos también coinciden con los resultados previamente informados por el mismo grupo de investigación, quienes reportaron el origen de las nuevas neuronas encontradas en EM tras la exposición a HFD, asignándolo a los tanicitos $\beta 2$ (Lee et al., 2012). La proliferación celular y neurogénesis han sido asociadas con el balance energético, puesto que, al estimular la proliferación basal en hipotálamo con la inyección icv de CNTF, se identificó también un aumento en la neurogénesis en NA y una respuesta fisiológica donde los animales perdían peso rápidamente, incluso después del término del tratamiento (Kokoeva et al., 2005). En la misma línea experimental, se realizó un experimento opuesto para confirmar estos mismos resultados, esta vez inhibiendo la proliferación hipotalámica en ratones adultos tras la inyección icv de AraC y esto conllevó a un aumento drástico en el peso corporal (Gouazé et al., 2013). En conjunto, los resultados anteriores corroboraron la implicancia de la proliferación celular y consecuente plasticidad hipotalámica, en los mecanismos que regulan el balance energético. En la EM se han descrito cambios relevantes en la plasticidad del piso del 3V y capilares fenestrados, frente a una disminución en la concentración de glucosa en sangre, producto del ayuno; esto principalmente evidenciado en la subpoblación de tanicitos $\beta 2$, cuya unión es mediada por *tigh junctions* o uniones ocluyentes, las cuales conforman la barrera LCR-EM (Langlet, Levin, et al., 2013). Esta reorganización estructural en EM disminuyó la cantidad de uniones ocluyentes, mejorando así el acceso de factores metabólicos como glucosa hacia el NA; sin embargo, esta organización fue revertida con el incremento de glucosa en sangre, tras la realimentación. En ambas etapas, la expresión de transcritos involucrados en el metabolismo de glucosa (GLUT1, GLUT2 y glucoquinasa), se vio alterado, sugiriendo un rol protagónico de los tanicitos en la plasticidad de la EM y la barrera con el LCR, como respuesta a fluctuaciones de la cantidad de glucosa en sangre

(Langlet, Levin, et al., 2013). Del mismo modo, estos cambios en la plasticidad de zonas altamente permeables y por tanto con la capacidad de monitorear los niveles de glucosa, podría replicarse en otros OCVs como el AP, pues comparten características estructurales con la EM: i) están próximas a núcleos neuronales involucrados en la ingesta, NA y NTS, respectivamente; ii) la formación de barreras frente a LCR constituida por tanicitos y vagliocitos, a partir de proteínas ocluyentes (ZO1, ocludina, claudina1 y claudina5) (Langlet, Mullier, et al., 2013), y iii) contener capilares fenestrados, los cuales son contactados por los procesos de los tanicitos y vagliocitos (Langlet, Mullier, et al., 2013).

De esta manera, se ha identificado tanto en hipotálamo como en CDV, la presencia de células con la maquinaria molecular necesaria para monitorear cambios en los niveles de glucosa y así participar en circuitos de regulación energética. Los tanicitos expresan GLUT1, GLUT2 y la enzima glucoquinasa (GK), mientras que en CDV también existen neuronas que expresan GLUT2 (Garcia et al., 2003; Lamy et al., 2014; Millán et al., 2010). En el CDV se ha reconocido el rol de células GLUT2 en mecanismos gluco-reguladores, pues estimulan la producción de glucagón en condiciones de hipoglicemia o ayuno, mientras que en hiperglicemia estimulan la secreción de insulina (Lamy et al., 2014; Marty et al., 2005).

2. Expresión de marcadores y genes neurogénicos en hipotálamo y CDV

Diferentes grupos de investigación han utilizado ensayos de colocalización y análisis de expresión de marcadores moleculares y genes, respectivamente, en búsqueda de distintos nichos neurogénicos en cerebros de murinos adultos, como en hipotálamo (Pellegrino et al., 2018; Robins et al., 2013) y CDV (Bauer et al., 2005; Furube et al., 2020; Hourai & Miyata, 2013). Principalmente se ha tratado de encontrar agrupaciones celulares que cumplan con patrones de expresión similares al fenotipo de células madre neurales, identificadas en las

zonas neurogénicas convencionales; ZSV y ZSG. Se ha establecido que estas células expresan combinaciones de marcadores moleculares que incluyen nestina, Sox2, GLAST, GFAP, vimentina, Pax6 y Ascl1 (Kriegstein & Alvarez-Buylla, 2009; Lledo et al., 2006; Zhang & Jiao, 2015).

Por lo descrito anteriormente, en esta investigación se utilizaron nestina y vimentina para identificar tanicitos y vagliocitos; mientras que las células ependimarias del CC resultaron ser positivas únicamente para vimentina. Este resultado coincide con los mostrados por Bauer (2005) y Pecchi (2007) para murinos silvestres. A diferencia de nuestros resultados, Furube (2015 y 2020), utilizando ratones Nestina-CreER-EGFP, mostró que células del CC, casi en su totalidad expresaban nestina. Estos resultados contradictorios podrían deberse al estado de madurez alcanzado por estas células, pues nestina es una proteína que conforma filamentos intermedios en células indiferenciadas o con potencial de PNs, pero su expresión puede verse disminuida, por ejemplo, por la inhibición de receptores nucleares TLX (asociados con cambios entre potencial neurogénico y senescencia), lo cual disminuye también la proliferación en nichos neurogénicos (Lledo et al., 2006; Wang & Xiong, 2016). Lo anterior permite sugerir que, aunque la localización de células nestina positivas es útil para la identificación de células con potencial neurogénico, podría complementarse con análisis de expresión génica, pues la presencia de esta proteína puede ser selectiva incluso entre células con el mismo fenotipo, como el caso de tanicitos, donde también se ha registrado disminución en la expresión de nestina o procesos que no la expresan. Utilizando el doble marcaje nestina-vimentina, para caracterizar la presencia de PNs en hipotálamos de rata, ratón, lémur y humano, se encontró que algunos procesos de tanicitos expresaban vimentina o GFAP, pero no colocalizaban con nestina (Pellegrino et al., 2018). Por otra parte, tanto

tanicitos, como vagliocitos y células del CC, expresan los demás marcadores neurogénicos característicos; Sox2, factor de transcripción involucrado en la capacidad de autorrenovación en células madre, además de vimentina y GFAP, proteínas fibrosas que conforma filamentos intermedios del citoesqueleto intracelular en PNs. (Furube et al., 2020; Furube et al., 2015; Kriegstein & Alvarez-Buylla, 2009; Lledo et al., 2006).

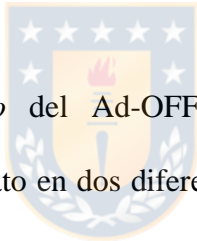
De forma complementaria, se caracterizó la expresión en tanicitos y células del AP de otros genes que han sido descritos en otros nichos neurogénicos, como: Pax6, Ascl1, Fgf18, Clcf, Foxn4 y Rcor2, de los cuales no existían antecedentes hasta el momento. Interesantemente, se identificó una baja expresión de Fgf18 en tanicitos y una alta expresión de Clcf en células del AP. Niveles bajos en la expresión de Fgf18 en tanicitos, pueden relacionarse con su purificación en cultivo, puesto que este factor de crecimiento es derivado de neuronas y tiene efecto directo (mediado por receptores específicos), sobre distintos tipos de glía, así como sobre microglía (Hoshikawa et al., 2002). La expresión de Fgf18 es determinante en el proceso de gliogénesis, por su actividad mitogénica durante los primeros días de la etapa postnatal, días en los cuales se recolectaron los tanicitos (P1), pero debido a la ausencia de neuronas en el cultivo, lo más probable es que se redujo la expresión de este gen. De acuerdo con lo anterior, se explica también una mayor expresión de Fgf18 en células del AP, donde se procesó el tejido completo, incluyendo de esta manera neuronas y las diferentes poblaciones gliales. Por otra parte, el alto nivel en la expresión del gen Clcf en células del AP, puede relacionarse también con la interacción glía-neurona; puesto que un aumento en la expresión de Clcf en astrocitos es indicativo de su efecto de neuroprotección y neuroplasticidad en condiciones normales, además de estimular de diferenciación de las células B (Schuettauf et al., 2005). No obstante, una baja expresión de este gen se asocia a

una respuesta neurotóxica, como la producida en enfermedades neurodegenerativas, cuando por ejemplo se induce a la activación microglial (Chan et al., 2019). De acuerdo con lo anterior, se establece la importancia de realizar cultivos primarios para vagliocitos y células del CC, de manera que pueda caracterizarse la expresión génica, con menos interferencia de otros tipos celulares, tal y como se hizo con tanicitos.

3. Transducción de células endimarias utilizando un vector adenoviral

En los experimentos que buscan elucidar y caracterizar el comportamiento de PNs como tanicitos, células del CC y de OCVs, que pueden derivar en nacimientos de nuevas neuronas, se han implementado diferentes modelos de animales transgénicos que expresan proteínas reporteras como por ejemplo GFP o tdTomato, bajo el promotor de genes específicos expresados en esos PNs, como nestina, Glast, NG2 o Fgf10 (Chaker et al., 2016; Furube et al., 2015; Haan et al., 2013; Lee et al., 2012; Robins et al., 2013). Sin embargo, no son el único método eficiente de rastrear e identificar células que pertenezcan a un determinado linaje; los vectores virales se convierten en alternativas válidas, cuando no se cuenta con una línea transgénica. De acuerdo con el tipo de metodología planteada, se pueden utilizar diferentes tipos de virus; para el interés de análisis neurogénico por ejemplo, ha sido útil el uso de vectores lentivirales como el empleado por Li y col (2012) para identificar células Sox2+ bajo la expresión de la proteína fluorescente amarilla (YFP); o también vectores adenovirales asociados (AAV), debido a la estabilidad en inserción del gen y consiguiente larga expresión de la proteína fluorescente (Narvaiza et al., 2003; Wang & Huang, 2000). Puesto que en el presente trabajo el análisis fue dirigido a células en etapa de proliferación, el tiempo considerado se redujo a un máximo de 7 días y se realizó el ensamble de un adenovirus (Ad), el cual permitió alcanzar un título alto (mayor que el posible de obtener

usando lentivirus), y una transducción específica para células que contactan el LCR, a diferencia de los AAV que al ingresar al parénquima cerebral transfectan neuronas y glía. Con esta metodología, se logró la expresión transiente de la proteína reportera tdTomato en células endimarias de 3V, 4V y CC, puesto que los adenovirus no se insertan y se ha descrito que se pierde el episoma en las células que se replican. El Ad-OFF-tdTomato evidenció una importante tasa de transducción, debido a que éste contiene un casete de expresión vacío, es decir, sin un promotor específico; sin embargo, su serotipo es 5, lo que determina su interacción con receptores localizados en células gliales. Es importante señalar que al igual que otros Ad generados en nuestro laboratorio, cuando son inyectados en las cavidades ventriculares, transducen preferentemente las células en contacto directo con el LCR.



Luego de la transducción *in vivo* del Ad-OFF-tdTomato, se identificaron células endimarias que expresaban tdTomato en dos diferentes poblaciones del CDV; AP y CC. La mayoría de las células del CC fueron transducidas en diferentes ubicaciones del eje anteroposterior, mientras que la marca evidenciada en células del AP fue baja y varió en intensidad y cantidad, en cortes con bregmas más posteriores. Lo anterior puede explicarse por la diversa orientación que pueden tomar los vagliocitos, cuya parte apical se encuentra hacia el 4V y desde allí se proyectan los procesos en diferentes direcciones, rodeando y atravesando el AP, contactando células del NTS y en orientación hacia el CC (Dallaporta et al., 2009; Pecchi et al., 2007). De esta forma, lo mostrado en las imágenes de inmunohistoquímicas realizadas a cortes coronales, corresponde únicamente a una fracción corta de los procesos de los vagliocitos; lo que permite sugerir que para realizar un análisis completo y determinar la efectividad de transducción del Ad en los vagliocitos, se deberían

generar adicionalmente cortes sagitales, solo así se tendrá un panorama completo de su extensión y proyección desde el 4V hasta el CC, a través del AP. Del análisis anterior surgen varias preguntas como ¿qué diferencia las células del CC y los vagliocitos?, ¿por qué son diferentes, si ambas contactan el LCR y neuronas del NTS?

Por otra parte, en el hipotálamo la transducción del Ad-OFF-tdTomato fue uniforme entre tanicitos y endimocitos en los diferentes cortes coronales analizados; sin embargo, también se identificaron algunas células transducidas en cercanía de los procesos de tanicitos α . Secciones dorsales de la pared ventricular donde se ubican tanicitos $\alpha 1$, no corresponden exclusivamente a este subgrupo de células, se encuentra presente una mezcla aleatoria de estas células y endimocitos, pero entre estas células se ha identificado algunos pies terminales provenientes de astrocitos aledaños, que conforman la capa subependimaria que recubre el 3V (Robins et al., 2013; Yoo & Blackshaw, 2018). De acuerdo con la conformación mixta de la barrera 3V-parénquima en esta zona, es posible que, en adición a las células endimarias, se hayan transducido algunos astrocitos. De esta manera, se puede concluir que el Ad-OFF-tdTomato generado en este trabajo de tesis, posee alta capacidad de transducir células endimarias en 3V, 4V y CC, gracias a su elevado título y genera una estable expresión de la proteína reportera, al menos durante 5-7 días; hubiese sido importante evaluar cuántos días se mantiene esta marca, para realizar seguimiento de PN o neuronas generadas a partir de tanicitos. Sin embargo, este Ad fue generado con el objetivo de analizar estas células a través de microscopía de fluorescencia y *sortear* las mismas, con la implementación de FACS.

4. Identificación de genes diferencialmente expresados en tanicitos de ratones sometidos a diferentes condiciones alimenticias mediante datos de *single cell RNAseq*

La secuenciación masiva de datos ha permitido elucidar y caracterizar los genomas, transcriptomas y epitranscriptomas de diversas especies de seres vivos; de esta manera se ha logrado mejorar tanto la comprensión global de los sistemas biológicos, como la variedad y complejidad que diferencia células inclusive de un mismo órgano, células cancerígenas y hasta comunidades microbianas (Hwang et al., 2018). Lo anterior incluye estudios en células madre neurales en cerebro adulto, donde gracias a datos transcriptómicos, se identificaron dos poblaciones de estas células, de acuerdo con su estado metabólico y participación en el ciclo celular; así, se clasificaron como quiescentes o activas (Li & Clevers, 2010). En los últimos diez años, las nuevas tecnologías de secuenciación se han enfocado en desarrollar técnicas que posibiliten un acercamiento que mejore la concepción de la relación genotipo-fenotipo; una de ellas permite obtener perfiles transcriptómicos de células individuales y se ha denominado *single cell RNAseq* (scRNA-seq) (Tang et al., 2009). Gracias a la implementación de scRNA-seq, se han revelado complejas poblaciones y subpoblaciones celulares, principalmente en órganos de composición heterogénea como el cerebro; además de esclarecer relaciones regulatorias entre varios genes y caracterizar el desarrollo de distintos linajes celulares (Hwang et al., 2018). Un análisis de scRNA-seq realizado por Campbell y cols (2017), permitió identificar más de 50 poblaciones celulares distintas en hipotálamo de ratones adultos (principalmente en EM y NA), entre ellos poblaciones neuronales no descritas hasta ese momento y subpoblaciones nuevas de tanicitos y neuronas AgRP y POMC, principalmente. En la investigación anterior se utilizaron ratones adultos de ambos sexos, en distintas condiciones energéticas, gracias a la exposición a diferentes dietas; por tal razón en el presente trabajo se obtuvieron y procesaron bioinformáticamente los datos

transcriptómicos generados por Campbell y cols, con el fin de analizar y comparar el perfil de expresión génica de tanicitos, frente a cambios en las condiciones alimenticias.

Luego del control de calidad y filtrado para los datos obtenidos, se definió el número de células identificadas por cada condición, así como el grupo de genes que éstas expresaron y el número de transcritos asignados a cada gen. Puesto que se siguieron los parámetros de preprocesamiento indicados por Campbell y cols (2017), la cantidad de células resultantes fue bastante similar a las reportadas en el presente trabajo, incluso en la condición *fasted*, para la cual se identificaron únicamente 1405 células, 18 de ellas correspondientes a tanicitos. En general, se relacionan tres razones principales por las que puede verse reducido el número de células secuenciadas, con respecto al total de células existentes en cada tejido, 1) errores de secuenciación y amplificación por PCR, 2) gotas o *droplets* de secuenciación vacíos o sin ninguna célula y 3) contenido de contaminantes en la muestra (Hwang et al., 2018; Smith et al., 2017). Posterior a la selección de subpoblaciones de tanicitos desde el total de células obtenidas anteriormente, se realizó análisis de componentes principales (PCA), mediante el cual se evidenció que los tanicitos $\beta 2$ presentaban una clara tendencia de agrupación distinta a las demás subpoblaciones. Los datos del número y tipo de genes expresados por cada célula, así como el número de transcritos identificados en cada gen, representan una casi infinita cantidad de variables, pero mediante PCA es posible reducir todo esto a un plano bidimensional. Este método estadístico y geométrico permite reconocer grupos de datos con patrones similares y correlaciona su variabilidad, hasta lograr identificar valores óptimos de varianza que son graficados en un plano simple (Lever et al., 2017). Gracias a la implementación de PCA, se permite sugerir que tanicitos $\beta 2$ poseen notables diferencias tanto en el grupo de genes identificados mediante la secuenciación, como en la expresión de

estos y no depende de la condición experimental o del número de células identificadas; esto es evidente únicamente al comparar entre subpoblaciones de tanicitos, pero no observable cuando se incluyen poblaciones celulares distintas como neuronas. Previamente se ha descrito que los tanicitos $\beta 2$ expresan marcadores moleculares distintos de otras subpoblaciones o en una proporción mayor; al menos diez genes expresados exclusivamente por esta subpoblación (Campbell et al., 2017). Por ejemplo, los tanicitos $\beta 2$ expresan FGF10, pero no FGF18, además poseen una relación de expresión mayor de nestina y vimentina (Kano et al., 2019; Robins et al., 2013); adicionalmente son los únicos que expresan piroglutamil peptidasa II, enzima degradadora de la hormona liberadora de tirotrópina por parte de los axones de las neuronas TRH en EM, lo cual es clave en la regulación de la secreción de la hormona tiroidea (Bolborea & Dale, 2013).

Una de las claves moleculares para comprender la variación fenotípica entre distintas condiciones experimentales, es el análisis de expresión diferencial (ED), así como la representación gráfica de estos resultados (Soneson & Delorenzi, 2013). Gracias a la implementación de este análisis en poblaciones y subpoblaciones de tanicitos de diferentes condiciones alimenticias, se logró la cuantificación de los genes diferencialmente expresados y se hizo diferencia entre los regulados positiva o negativamente. Estudios similares de ED realizados en la corteza cerebral de ratones alimentados con HFD, han permitido identificar que los genes diferencialmente expresados, participan en procesos de neurogénesis, sinapsis, regulación de la diferenciación celular, entre otros (Yoon et al., 2019). Genes mayormente expresados, identificados por Yoon y cols, participan de la formación de *tight junctions*, metabolismo de purinas y la contracción de músculo liso, mientras que los genes menormente expresados, participan en la regulación de señalización del calcio y el ritmo circadiano.

En el análisis de ED realizado en la presente tesis, se encontró de forma general, una mayor respuesta de regulación génica, por parte de las poblaciones alimentadas con Chow10, comparado con HFD. Una crítica a los datos obtenidos por Campbell y cols, es que las respuestas observadas son el resultado de una semana de exposición a las dietas y esto representa un tiempo de exposición bajo para encontrar diferencias en los perfiles transcriptómicos. Se ha demostrado que, en hipotálamo, la expresión génica cambia en el tiempo, dependiendo del contenido y tipo de grasas, incluso hasta 15 semanas de administración de las dietas (Townsend et al., 2008). Estos cambios en la expresión génica, sostenidos a largo plazo, se relacionan con la alteración en la expresión de POMC, NPY y el receptor de leptina, así como con la metilación de los promotores de estos genes; todo esto en conjunto está asociado con el aumento de peso corporal (Cifani et al., 2015; Keleher et al., 2018).

Una vez realizados los análisis de ED, en este trabajo se generaron mapas de calor, que permitieron analizar en un panorama global e individual, la expresión de los 30 genes mayormente afectados por cada dieta en la población total y subpoblación de tanicitos $\beta 2$. En conjunto, se identificó la presencia de 5 genes en común, que deben considerarse determinantes en cuanto a la respuesta metabólica hacia un incremento en el consumo de grasas, entre ellos se encuentra el gen *Gm46400* que todavía no ha sido identificado ni se le ha asignado un nombre oficial. Los otros cuatro genes identificados tienen funciones relacionadas con proliferación, sensibilidad a insulina y diferenciación neuronal.

1) El gen *Eef1a1* codifica para un importante factor que regula la traducción, presente durante la unión de los ARNt con el sitio A de los ribosomas, controlando así la biosíntesis de proteínas en cerebro, riñón, hígado y páncreas; su expresión es normalmente estable e incluso

se utiliza como gen referencia en qRT-PCR (Ma et al., 2019). Sin embargo, el aumento en la expresión de este gen ha sido relacionado con la proliferación de células cancerígenas renales, mientras que la disminución de su expresión aumentó la apoptosis de las mismas células y redujo su proliferación basal (Bao et al., 2019).

2) El gen *mt-Rnr1* codifica el péptido mitocondrial MOTS-c en humanos, el cual participa en procesos biológicos como la regulación de la biosíntesis de bases púricas, regulación de sensibilidad a insulina, disminuyendo la resistencia a la insulina y obesidad inducidas por la dieta, en especial una alta en grasas; de esta manera se involucra ampliamente en la homeostasis metabólica, alterando la actividad mitocondrial (Lee et al., 2015).

3) El gen *mt-Co1* es codificante para la subunidad 1 de la proteína citocromo C, la cual posee actividad oxido reductasa y es clave por su función transportadora de electrones hacia el oxígeno molecular en la generación de ATP. Bajos niveles en la expresión de este gen y de la proteína correspondiente, son asociados a disfunción mitocondrial en pacientes obesos y diabéticos, principalmente por un aumento en el estrés oxidativo, seguido de una respuesta inflamatoria (Holvoet et al., 2017; Li et al., 2017).

4) El gen *Malat1* es no codificante para proteína, se expresa abundantemente en el sistema nervioso, aunque no tiene un rol esencial durante el desarrollo, sin embargo, se relaciona con el mantenimiento de la densidad de sinapsis y crecimiento de dendritas de neuronas en el hipocampo. Adicionalmente se sabe que promueve el proceso de metástasis en cáncer colorrectal y pulmón, por tanto, se ha postulado como biomarcador para pacientes con estos tipos de cáncer (Ji et al., 2019).

Luego de una exposición aguda a HFD o Chow10, se han identificado modificaciones en los niveles de al menos 78 proteínas diferentes, relacionadas con procesos como cambios en citoesqueleto, plasticidad sináptica, respuesta a estrés, metabolismo de carbohidratos y función mitocondrial (McLean et al., 2019), lo cual podría estar relacionado con los cambios en la expresión génica mostrados por Campbell y cols (2017) y en este trabajo dirigido a las poblaciones de tanicitos.

5. Expresión de genes gluco-sensores y neurogénicos en tanicitos ante un incremento en el consumo de grasas

En el análisis específico de algunos genes de interés, se generaron mapas de calor para aquellos relacionados con el metabolismo de carbohidratos y neurogénesis, para la población completa de tanicitos y respectivas subpoblaciones por separado, esto con el fin de comparar cambios en la expresión génica tras la exposición aguda a diferentes dietas. Se sabe que la exposición crónica a HFD normalmente conduce a obesidad y resistencia a la insulina, pero basta con tres días continuos de consumo de esta dieta para cambiar expresión génica y el proteoma en hipotálamo (McLean et al., 2019). Gracias al análisis y procesamiento de los mismos datos transcriptómicos utilizados en el presente trabajo, Yoo et al (2019), descartaron la presencia del receptor de leptina en tanicitos, debido a su nula o baja expresión que lo hacen indetectable. De esta manera, concluyeron que el proceso de señalización de leptina es independiente de los tanicitos y se asocia principalmente con otras poblaciones celulares, como las neuronales orexigénicas AgRP/NPY.

En el presente análisis se encontró una disminución en la expresión de Glut2 en tanicitos de las condiciones Chow10 y HFD. Se ha demostrado que la inhibición en la expresión de Glut2 (*Slc2a2*) en hipotálamo de ratas adultas, altera los niveles de neuropéptidos orexigénicos y

anorexigénicos, e incrementa la ingesta alimenticia y el peso corporal, sugiriendo un efecto inhibitorio sobre la saciedad y una pérdida de respuesta para los incrementos de glucosa en hipotálamo (Barahona et al., 2018). De la misma forma, se identificó disminución en la expresión de otros genes relacionados con el metabolismo de glucosa, como *Gk* y *Gkrp*, y también de genes relacionados con el transporte de productos derivados de glucosa como lactato, *Mct1* y *Mct4*. La relación en la expresión génica de *Gck* y *Gckr* es clave para determinar el estado de compartimentalización de GK, como respuesta a fluctuaciones en la concentración de glucosa detectada por tanicitos. Bajos niveles de la enzima GK con respecto de su inhibidor GKRP, permiten la translocación de GK hacia el núcleo, mientras que niveles con niveles menores o similares de GKRP con respecto de GK, se favorece la translocación inversa de GK hacia el citoplasma; todo esto independiente del contexto intracelular (Salgado et al., 2019). Lo anterior es importante, debido a que previamente se demostró que, ante un aumento de glucosa se incrementaba la compartimentalización nuclear de GK, con el fin de detener o disminuir la señalización celular en respuesta a un incremento de glucosa en hipotálamo (Salgado et al., 2014). Por otra parte, la inhibición de MCT1 y la doble inhibición de MCT1/MCT4 en tanicitos de ratas adultas, altera el comportamiento alimenticio y modifica la expresión normal de neuropéptidos, lo que se traduce en una pérdida de respuesta a glucosa y sugiere un rol fundamental de estos transportadores en la regulación del comportamiento alimenticio (Elizondo-Vega et al., 2020). Tomando lo anterior en conjunto, es posible sugerir que el incremento en el consumo de grasas, alteran el mecanismo de detección y metabolismo de glucosa, lo que adicionalmente tiene un impacto importante en el comportamiento alimenticio, pues se perturban también sistemas gluco-dependientes, que regulan las sensaciones de hambre y saciedad en hipotálamo, principalmente representados por neuronas del NA.

La expresión de *Gja1*, el gen codificante para Cx43, aumentó para la población total de tanicitos en la condición Chow10, mientras que ante HFD, se sobre expresó en tanicitos $\beta 1$ y 2. Cx43 forma uniones comunicantes entre células y permite la movilización de iones, AMPc, ATP y metabolitos de bajo tamaño molecular como glucosa, entre otros (Zhu et al., 2016). Cx 43 es la conexina más abundante entre tanicitos y gracias a esto, permite establecer una red de comunicación similar a la presente en PNs de otras zonas cerebrales, la cual es clave en la sincronización del ciclo celular y proliferación; en tanicitos es determinante para mantener su potencial proliferativo basal (Recabal et al., 2018). Adicionalmente, se ha comprobado que, el bloqueo de Cx43 disminuye la propagación de señales desde el hipotálamo, como las producidas tras la activación de neuronas POMC, las cuales regulan el almacenamiento de lípidos y reducen la formación de tejido adiposo blanco, mientras que la sobre expresión de Cx43 promueve la formación de reservas energéticas en adipocitos (Zhu et al., 2016). Todo lo anterior sugiere un rol fundamental de la Cx43 en el mantenimiento del potencial proliferativo de tanicitos como PNs hipotalámicos y su participación en la transmisión de señales desde el hipotálamo, que modifican las reservas energéticas en tejido adiposo, frente a un incremento en el consumo de grasas. De esta forma, los resultados del análisis de scRNA-seq indican una sobreexpresión de Cx43 en tanicitos β de animales sometidos por un tiempo corto a HFD, estos concuerdan con los obtenidos en este trabajo de tesis, donde los tanicitos $\beta 2$ proliferaron en respuesta a una dieta hipercalórica, en nuestro caso HSD. Por otra parte, esos hallazgos se correlacionan con los descritos por Recabal y cols (2020), donde se demuestra que Cx43 cumple una función importante en la proliferación de tanicitos inducida por FGF y que su bloqueo farmacológico reduce la proliferación de tanicitos $\beta 2$, selectivamente.

Con respecto a la expresión de genes neurogénicos, de manera general en tanicitos se identificó una respuesta diversa, observando un aumento en la expresión para genes que codifican para proteínas fibrilares y para factores de transcripción, mientras que algunos factores mitóticos disminuyeron su expresión. La expresión génica permite el reconocimiento de un perfil transcriptómico excluyente, que diferencia células PNs adultas de acuerdo con su estado de quiescencia o actividad proliferativa, o con su identidad celular dentro de las distintas etapas en el proceso de neurogénesis (Kriegstein & Alvarez-Buylla, 2009). Si bien, el proceso de neurogénesis es regulado principalmente por la expresión génica, existen diferentes comportamientos que pueden representar cambios en el perfil de expresión de células PNs, como el ejercicio, cambios en la dieta, aprendizaje y estrés, entre otros (Aimone et al., 2014). Tanicitos como PNs hipotalámicos, describen una expresión estable de *Rax*, *Nestina*, *Vimentina*, y *Sox2*, mientras que tanicitos α adicionalmente expresan *GFAP* y *GLAST*, y tanicitos β expresan *FGF10*, pero no *FGF18* (Kano et al., 2019; Robins et al., 2013). La disminución en la expresión génica de *Sox2* y *Pax6* se asocia con la pérdida de potencial proliferativo y multipotencialidad (Kano et al., 2019; Maekawa et al., 2005). El aumento en la expresión de *Notch* favorece la actividad proliferativa, importante para la autorrenovación de las poblaciones de PNs; mientras que una mayor expresión de *Ascl1* beneficia la diferenciación celular de progenitores neurales (Johnson et al., 2009). En resumen, el análisis de ED específico para cada subpoblación de tanicitos, permitió establecer un perfil de expresión, frente al consumo de Chow10 y HFD, de manera que pudo determinarse en detalle la expresión de cada gen de interés en una determinada subpoblación. De esta manera, es posible postular a tanicitos $\alpha 2$ y $\beta 2$ como las subpoblaciones mayormente afectadas por cambios en la expresión de genes *gluco-sensores* y neurogénicos, luego del suministro de dietas con mayor contenido de grasas, respecto a la dieta estándar. Lo anterior

concuenda con el potencial neurogénico evidenciado por tanicitos α como respuesta a la inyección de factores mitogénicos (Robins et al., 2013) y de tanicitos β 2 luego de la exposición a HFD (Lee et al., 2012; Lee et al., 2014). Los grupos de investigación anteriores no utilizaron HSD y cabe mencionar que otros investigadores que, si han utilizado esta dieta, no han estudiado su efecto en hipotálamo.

En conclusión, en este trabajo de investigación se identificó que la proliferación específica de tanicitos β 2 y células del AP, es estimulada por el incremento de glucosa en sangre, sugiriendo una alta sensibilidad por parte de estas células en OCVs, pertenecientes a zonas que regulan el balance energético y el comportamiento alimenticio; a diferencia de células del CC que mantuvieron su potencial proliferativo basal. El análisis transcriptómico de datos permitió identificar cambios en la expresión de genes *gluco-sensores* y neurogénicos, en subpoblaciones de tanicitos de diferentes condiciones alimenticias, posibilitando el reconocimiento de tanicitos α 2 y β 2 como los más sensibles ante un incremento en el contenido de grasas provenientes de la dieta. Será de gran importancia determinar el mecanismo por el cual, tanicitos y células del AP estimulan su proliferación tras la detección de cambios en la concentración de factores provenientes de la dieta. De igual forma, la generación de un perfil transcriptómico para vagliocitos de diferentes condiciones energéticas y alimenticias, permitirá el análisis completo de células tipo glía radial en OCVs involucrados en la regulación energética y alimenticia; aportando así datos hasta ahora únicos en la literatura.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Abegg, K., Hermann, A., Boyle, C. N., Bouret, S. G., Lutz, T. A., & Riediger, T. (2017). Involvement of amylin and leptin in the development of projections from the area postrema to the nucleus of the solitary tract. *Frontiers in endocrinology*, 8, 324.
- Aimone, J. B., Li, Y., Lee, S. W., Clemenson, G. D., Deng, W., & Gage, F. H. (2014). Regulation and function of adult neurogenesis: from genes to cognition. *Physiological reviews*, 94(4), 991-1026.
- Alfaro-Cervello, C., Cebrian-Silla, A., Soriano-Navarro, M., Garcia-Tarraga, P., Matías-Guiu, J., Gomez-Pinedo, U., Molina Aguilar, P., Alvarez-Buylla, A., Luquin, M. R., & Garcia-Verdugo, J. M. (2014). The adult macaque spinal cord central canal zone contains proliferative cells and closely resembles the human. *Journal of Comparative Neurology*, 522(8), 1800-1817.
- Altman, J., & Das, G. D. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *Journal of Comparative Neurology*, 124(3), 319-335.
- Bagnol, D., Lu, X.-Y., Kaelin, C. B., Day, H. E., Ollmann, M., Gantz, I., Akil, H., Barsh, G. S., & Watson, S. J. (1999). Anatomy of an endogenous antagonist: relationship between Agouti-related protein and proopiomelanocortin in brain. *Journal of Neuroscience*, 19(18), RC26-RC26.
- Bao, Y., Zhao, T., Zhang, Z., Liang, X., Wang, Z., Xiong, Y., Lu, X., & Wang, L. (2019). High eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1 expression promotes proliferation and predicts poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma. *Neoplasma*, 67(1), 78-84.
- Barahona, M. J., Llanos, P., Recabal, A., Escobar-Acuña, K., Elizondo-Vega, R., Salgado, M., Ordenes, P., Uribe, E., Sepúlveda, F. J., & Araneda, R. C. (2018). Glial hypothalamic inhibition of GLUT2 expression alters satiety, impacting eating behavior. *Glia*, 66(3), 592-605.
- Bauer, S., Hay, M., Amilhon, B., Jean, A., & Moyse, E. (2005). In vivo neurogenesis in the dorsal vagal complex of the adult rat brainstem. *Neuroscience*, 130(1), 75-90.
- Belluzzi, O., Benedusi, M., Ackman, J., & LoTurco, J. J. (2003). Electrophysiological differentiation of new neurons in the olfactory bulb. *Journal of Neuroscience*, 23(32), 10411-10418.
- Bennett, L., Yang, M., Enikolopov, G., & Iacovitti, L. (2009). Circumventricular organs: a novel site of neural stem cells in the adult brain. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 41(3), 337-347.
- Berger, U. V., & Hediger, M. A. (2001). Differential distribution of the glutamate transporters GLT-1 and GLAST in tanycytes of the third ventricle. *Journal of Comparative Neurology*, 433(1), 101-114.
- Blessing, W. W. (1997). *The lower brainstem and bodily homeostasis*. Oxford University Press, USA.
- Bolborea, M., & Dale, N. (2013). Hypothalamic tanycytes: potential roles in the control of feeding and energy balance. *Trends in neurosciences*, 36(2), 91-100.
- Boldrini, M., Fulmore, C. A., Tartt, A. N., Simeon, L. R., Pavlova, I., Poposka, V., Rosoklija, G. B., Stankov, A., Arango, V., & Dwork, A. J. (2018). Human hippocampal neurogenesis persists throughout aging. *Cell stem cell*, 22(4), 589-599. e585.

- Bonfanti, L., & Theodosis, D. (1994). Expression of polysialylated neural cell adhesion molecule by proliferating cells in the subependymal layer of the adult rat, in its rostral extension and in the olfactory bulb. *Neuroscience*, *62*(1), 291-305.
- Campbell, J. N., Macosko, E. Z., Fenselau, H., Pers, T. H., Lyubetskaya, A., Tenen, D., Goldman, M., Verstegen, A. M., Resch, J. M., & McCarroll, S. A. (2017). A molecular census of arcuate hypothalamus and median eminence cell types. *Nature neuroscience*, *20*(3), 484-496.
- Chaker, Z., George, C., Petrovska, M., Caron, J.-B., Lacube, P., Caillé, I., & Holzenberger, M. (2016). Hypothalamic neurogenesis persists in the aging brain and is controlled by energy-sensing IGF-I pathway. *Neurobiology of aging*, *41*, 64-72.
- Chan, S. J., Niu, W., Hayakawa, K., Hamanaka, G., Wang, X., Cheah, P. S., Guo, S., Yu, Z., Arai, K., & Selim, M. H. (2019). Promoting neuro-supportive properties of astrocytes with epidermal growth factor hydrogels. *Stem cells translational medicine*, *8*(12), 1242-1248.
- Charrier, C., Coronas, V., Fombonne, J., Roger, M., Jean, A., Krantic, S., & Moysé, E. (2006). Characterization of neural stem cells in the dorsal vagal complex of adult rat by in vivo proliferation labeling and in vitro neurosphere assay. *Neuroscience*, *138*(1), 5-16.
- Chigr, F., Rachidi, F., Segura, S., Mahaut, S., Tardivel, C., Jean, A., Najimi, M., & Moysé, E. (2009). Neurogenesis inhibition in the dorsal vagal complex by chronic immobilization stress in the adult rat. *Neuroscience*, *158*(2), 524-536.
- Cifani, C., Micioni Di Bonaventura, M. V., Pucci, M., Giusepponi, M. E., Romano, A., Di Francesco, A., Maccarrone, M., & D'Addario, C. (2015). Regulation of hypothalamic neuropeptides gene expression in diet induced obesity resistant rats: possible targets for obesity prediction? *Frontiers in neuroscience*, *9*, 187.
- Dallaporta, M., Pecchi, E., Pio, J., Jean, A., Horner, K., & Troadec, J. (2009). Expression of leptin receptor by glial cells of the nucleus tractus solitarius: possible involvement in energy homeostasis. *Journal of neuroendocrinology*, *21*(1), 57-67.
- De Filippis, L., Lamorte, G., Snyder, E. Y., Malgaroli, A., & Vescovi, A. L. (2007). A novel, immortal, and multipotent human neural stem cell line generating functional neurons and oligodendrocytes. *Stem Cells*, *25*(9), 2312-2321.
- Doetsch, F., Caille, I., Lim, D. A., García-Verdugo, J. M., & Alvarez-Buylla, A. (1999). Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell*, *97*(6), 703-716.
- Elizondo Vega, R. J. (2016). *Participación de los transportadores de monocarboxilatos hipotalámicos en la regulación de la ingesta alimenticia* Universidad de Concepción. Facultad de Ciencias Biológicas.].
- Elizondo-Vega, R., Oyarce, K., Salgado, M., Barahona, M. J., Recabal, A., Ordenes, P., López, S., Pincheira, R., Luz-Crawford, P., & García-Robles, M. A. (2020). Inhibition of Hypothalamic MCT4 and MCT1–MCT4 Expressions Affects Food Intake and Alters Orexigenic and Anorexigenic Neuropeptide Expressions. *Molecular neurobiology*, *57*(2), 896-909.
- Elizondo-Vega, R., Cortes-Campos, C., Barahona, M. J., Oyarce, K. A., Carril, C. A., & García-Robles, M. A. (2015). The role of tanycytes in hypothalamic glucosensing. *Journal of cellular and molecular medicine*, *19*(7), 1471-1482.

- Eriksson, P. S., Perfilieva, E., Björk-Eriksson, T., Alborn, A.-M., Nordborg, C., Peterson, D. A., & Gage, F. H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature medicine*, 4(11), 1313-1317.
- Fukuda, S., Kato, F., Tozuka, Y., Yamaguchi, M., Miyamoto, Y., & Hisatsune, T. (2003). Two distinct subpopulations of nestin-positive cells in adult mouse dentate gyrus. *Journal of Neuroscience*, 23(28), 9357-9366.
- Furube, E., Ishii, H., Nambu, Y., Kurganov, E., Nagaoka, S., Morita, M., & Miyata, S. (2020). Neural stem cell phenotype of tanycyte-like ependymal cells in the circumventricular organs and central canal of adult mouse brain. *Scientific reports*, 10(1), 1-15.
- Furube, E., Morita, M., & Miyata, S. (2015). Characterization of neural stem cells and their progeny in the sensory circumventricular organs of adult mouse. *Cell and tissue research*, 362(2), 347-365.
- Ganong, W. F. (2000). Circumventricular organs: definition and role in the regulation of endocrine and autonomic function. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 27(5-6), 422-427.
- Garcia, M. d. I. A., Millán, C., Balmaceda-Aguilera, C., Castro, T., Pastor, P., Montecinos, H., Reinicke, K., Zúniga, F., Vera, J. C., & Oñate, S. A. (2003). Hypothalamic ependymal-glia cells express the glucose transporter GLUT2, a protein involved in glucose sensing. *Journal of neurochemistry*, 86(3), 709-724.
- Gouazé, A., Brenachot, X., Rigault, C., Krezymon, A., Rauch, C., Nédélec, E., Lemoine, A., Gascuel, J., Bauer, S., & Pénicaud, L. (2013). Cerebral cell renewal in adult mice controls the onset of obesity. *PLoS One*, 8(8), e72029.
- Grijalva, C. V., & Novin, D. (1990). The role of the hypothalamus and dorsal vagal complex in gastrointestinal function and pathophysiology. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 597, 207-222.
- Guillebaud, F., Girardet, C., Abysique, A., Gaigé, S., Barbouche, R., Verneuil, J., Jean, A., Leprince, J., Tonon, M.-C., & Dallaporta, M. (2017). Glial endozepines inhibit feeding-related autonomic functions by acting at the brainstem level. *Frontiers in Neuroscience*, 11, 308.
- Haan, N., Goodman, T., Najdi-Samiei, A., Stratford, C. M., Rice, R., El Agha, E., Bellusci, S., & Hajihosseini, M. K. (2013). Fgf10-expressing tanycytes add new neurons to the appetite/energy-balance regulating centers of the postnatal and adult hypothalamus. *Journal of Neuroscience*, 33(14), 6170-6180.
- Holmes, M. M., Galea, L. A., Mistlberger, R. E., & Kempermann, G. (2004). Adult hippocampal neurogenesis and voluntary running activity: Circadian and dose-dependent effects. *Journal of neuroscience research*, 76(2), 216-222.
- Holvoet, P., Vanhaverbeke, M., Geeraert, B., De Keyzer, D., Hulsmans, M., & Janssens, S. (2017). Low cytochrome oxidase 1 links mitochondrial dysfunction to atherosclerosis in mice and pigs. *PLoS One*, 12(1), e0170307.
- Horstmann, E. (1954). Die faser-glia des selachiergehirns. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie*, 39(6), 588-617.
- Hoshikawa, M., Yonamine, A., Konishi, M., & Itoh, N. (2002). FGF-18 is a neuron-derived glial cell growth factor expressed in the rat brain during early postnatal development. *Molecular brain research*, 105(1-2), 60-66.
- Hourai, A., & Miyata, S. (2013). Neurogenesis in the circumventricular organs of adult mouse brains. *Journal of neuroscience research*, 91(6), 757-770.

- Hwang, B., Lee, J. H., & Bang, D. (2018). Single-cell RNA sequencing technologies and bioinformatics pipelines. *Experimental & molecular medicine*, *50*(8), 1-14.
- Imayoshi, I., Sakamoto, M., Ohtsuka, T., & Kageyama, R. (2009). Continuous neurogenesis in the adult brain. *Development, growth & differentiation*, *51*(3), 379-386.
- Jenkins, J. (1972). The hypothalamus. *British medical journal*, *2*(5805), 99.
- Jessberger, S., & Kempermann, G. (2003). Adult-born hippocampal neurons mature into activity-dependent responsiveness. *European Journal of Neuroscience*, *18*(10), 2707-2712.
- Jhaveri, D., Tedoldi, A., Hunt, S., Sullivan, R., Watts, N., Power, J., Bartlett, P., & Sah, P. (2018). Evidence for newly generated interneurons in the basolateral amygdala of adult mice. *Molecular psychiatry*, *23*(3), 521-532.
- Ji, Q., Cai, G., Liu, X., Zhang, Y., Wang, Y., Zhou, L., Sui, H., & Li, Q. (2019). MALAT1 regulates the transcriptional and translational levels of proto-oncogene RUNX2 in colorectal cancer metastasis. *Cell death & disease*, *10*(6), 1-17.
- Johnson, M. A., Ables, J. L., & Eisch, A. J. (2009). Cell-intrinsic signals that regulate adult neurogenesis in vivo: insights from inducible approaches. *BMB reports*, *42*(5), 245.
- Joseph, S. A., Pilcher, W. H., & Bennett-Clarke, C. (1983). Immunocytochemical localization of ACTH perikarya in nucleus tractus solitarius: evidence for a second opiocortin neuronal system. *Neuroscience letters*, *38*(3), 221-225.
- Kano, M., Suga, H., Ishihara, T., Sakakibara, M., Soen, M., Yamada, T., Ozaki, H., Mitsumoto, K., Kasai, T., & Sugiyama, M. (2019). Tanycyte-like cells derived from mouse embryonic stem culture show hypothalamic neural stem/progenitor cell functions. *Endocrinology*, *160*(7), 1701-1718.
- Keleher, M. R., Zaidi, R., Hicks, L., Shah, S., Xing, X., Li, D., Wang, T., & Cheverud, J. M. (2018). A high-fat diet alters genome-wide DNA methylation and gene expression in SM/J mice. *BMC genomics*, *19*(1), 888.
- Kiecker, C. (2018). The origins of the circumventricular organs. *Journal of anatomy*, *232*(4), 540-553.
- Kokoeva, M. V., Yin, H., & Flier, J. S. (2005). Neurogenesis in the hypothalamus of adult mice: potential role in energy balance. *Science*, *310*(5748), 679-683.
- Kokoeva, M. V., Yin, H., & Flier, J. S. (2007). Evidence for constitutive neural cell proliferation in the adult murine hypothalamus. *Journal of Comparative Neurology*, *505*(2), 209-220.
- Kriegstein, A., & Alvarez-Buylla, A. (2009). The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annual review of neuroscience*, *32*, 149-184.
- Kronenberg, G., Reuter, K., Steiner, B., Brandt, M. D., Jessberger, S., Yamaguchi, M., & Kempermann, G. (2003). Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to physiologic neurogenic stimuli. *Journal of Comparative Neurology*, *467*(4), 455-463.
- Lamy, C. M., Sanno, H., Labouèbe, G., Picard, A., Magnan, C., Chatton, J.-Y., & Thorens, B. (2014). Hypoglycemia-activated GLUT2 neurons of the nucleus tractus solitarius stimulate vagal activity and glucagon secretion. *Cell metabolism*, *19*(3), 527-538.
- Langlet, F., Levin, B. E., Luquet, S., Mazzone, M., Messina, A., Dunn-Meynell, A. A., Balland, E., Lacombe, A., Mazur, D., & Carmeliet, P. (2013). Tanycytic VEGF-A boosts blood-hypothalamus barrier plasticity and access of metabolic signals to the arcuate nucleus in response to fasting. *Cell metabolism*, *17*(4), 607-617.

- Langlet, F., Mullier, A., Bouret, S. G., Prevot, V., & Dehouck, B. (2013). Tanycyte-like cells form a blood–cerebrospinal fluid barrier in the circumventricular organs of the mouse brain. *Journal of Comparative Neurology*, *521*(15), 3389-3405.
- Lee, C., Zeng, J., Drew, B. G., Sallam, T., Martin-Montalvo, A., Wan, J., Kim, S.-J., Mehta, H., Hevener, A. L., & de Cabo, R. (2015). The mitochondrial-derived peptide MOTS-c promotes metabolic homeostasis and reduces obesity and insulin resistance. *Cell metabolism*, *21*(3), 443-454.
- Lee, D. A., Bedont, J. L., Pak, T., Wang, H., Song, J., Miranda-Angulo, A., Takiar, V., Charubhumi, V., Balordi, F., & Takebayashi, H. (2012). Tanycytes of the hypothalamic median eminence form a diet-responsive neurogenic niche. *Nature neuroscience*, *15*(5), 700-702.
- Lee, D. A., Yoo, S., Pak, T., Salvatierra, J., Velarde, E., Aja, S., & Blackshaw, S. (2014). Dietary and sex-specific factors regulate hypothalamic neurogenesis in young adult mice. *Frontiers in neuroscience*, *8*, 157.
- Lehtinen, M. K., Bjornsson, C. S., Dymecki, S. M., Gilbertson, R. J., Holtzman, D. M., & Monuki, E. S. (2013). The choroid plexus and cerebrospinal fluid: emerging roles in development, disease, and therapy. *Journal of Neuroscience*, *33*(45), 17553-17559.
- [Record #10 is using a reference type undefined in this output style.]
- Li, L., & Clevers, H. (2010). Coexistence of quiescent and active adult stem cells in mammals. *science*, *327*(5965), 542-545.
- Li, Q. O. Y., Soro-Arnaiz, I., & Aragonés, J. (2017). Age-dependent obesity and mitochondrial dysfunction. *Adipocyte*, *6*(2), 161-166.
- Liberini, C. G., Borner, T., Boyle, C. N., & Lutz, T. A. (2016). The satiating hormone amylin enhances neurogenesis in the area postrema of adult rats. *Molecular metabolism*, *5*(10), 834-843.
- Lledo, P.-M., Alonso, M., & Grubb, M. S. (2006). Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nature Reviews Neuroscience*, *7*(3), 179-193.
- Ma, D., Fan, J., Tian, Y., Jiang, P., Wang, J., Zhu, H., & Bai, J. (2019). Selection of reference genes for quantitative real-time PCR normalisation in largemouth bass *Micropterus salmoides* fed on alternative diets. *Journal of fish biology*, *95*(2), 393-400.
- Maekawa, M., Takashima, N., Arai, Y., Nomura, T., Inokuchi, K., Yuasa, S., & Osumi, N. (2005). Pax6 is required for production and maintenance of progenitor cells in postnatal hippocampal neurogenesis. *Genes to Cells*, *10*(10), 1001-1014.
- Marty, N., Dallaporta, M., Foretz, M., Emery, M., Tarussio, D., Bady, I., Binnert, C., Beermann, F., & Thorens, B. (2005). Regulation of glucagon secretion by glucose transporter type 2 (glut2) and astrocyte-dependent glucose sensors. *The Journal of clinical investigation*, *115*(12), 3545-3553.
- McKinley, M., McAllen, R., Mendelsohn, F. A., Allen, A., Chai, S., & Oldfield, B. (1990). Circumventricular organs: neuroendocrine interfaces between the brain and the hemal milieu. *Frontiers in neuroendocrinology*, *11*(2), 91-127.
- McLean, F. H., Campbell, F. M., Langston, R. F., Sergi, D., Resch, C., Grant, C., Morris, A. C., Mayer, C. D., & Williams, L. M. (2019). A high-fat diet induces rapid changes in the mouse hypothalamic proteome. *Nutrition & metabolism*, *16*(1), 26.
- Medeiros, N., Dai, L., & Ferguson, A. (2012). Glucose-responsive neurons in the subfornical organ of the rat—a novel site for direct CNS monitoring of circulating glucose. *Neuroscience*, *201*, 157-165.

- Millán, C., Martínez, F., Cortés-Campos, C., Lizama, I., Yanez, M. J., Llanos, P., Reinicke, K., Rodríguez, F., Peruzzo, B., & Nualart, F. (2010). Glial glucokinase expression in adult and post-natal development of the hypothalamic region. *ASN neuro*, 2(3), AN20090059.
- Miyata, S. (2015). New aspects in fenestrated capillary and tissue dynamics in the sensory circumventricular organs of adult brains. *Frontiers in neuroscience*, 9, 390.
- Narvaiza, I., Mazzolini, G., Qian, C., Prieto, J., & Melero, I. (2003). Vectores adenovirales de primera generación, el vector por excelencia en inmunoterapia génica del cáncer. *Inmunología (1987)*, 225-242.
- Palmer, T. D., Willhoite, A. R., & Gage, F. H. (2000). Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *Journal of Comparative Neurology*, 425(4), 479-494.
- Paxinos, G., & Franklin, K. B. (2019). *Paxinos and Franklin's the mouse brain in stereotaxic coordinates*. Academic press.
- [Record #97 is using a reference type undefined in this output style.]
- Pecchi, E., Dallaporta, M., Charrier, C., Pio, J., Jean, A., Moyse, E., & Troadec, J. D. (2007). Glial fibrillary acidic protein (GFAP)-positive radial-like cells are present in the vicinity of proliferative progenitors in the nucleus tractus solitarius of adult rat. *Journal of Comparative Neurology*, 501(3), 353-368.
- Pellegrino, G., Trubert, C., Terrien, J., Pifferi, F., Leroy, D., Loyens, A., Migaud, M., Baroncini, M., Maurage, C. A., & Fontaine, C. (2018). A comparative study of the neural stem cell niche in the adult hypothalamus of human, mouse, rat and gray mouse lemur (*Microcebus murinus*). *Journal of Comparative Neurology*, 526(9), 1419-1443.
- Pencea, V., Bingaman, K. D., Freedman, L. J., & Luskin, M. B. (2001). Neurogenesis in the subventricular zone and rostral migratory stream of the neonatal and adult primate forebrain. *Experimental neurology*, 172(1), 1-16.
- Price, C. J., Hoyda, T. D., & Ferguson, A. V. (2008). The area postrema: a brain monitor and integrator of systemic autonomic state. *The Neuroscientist*, 14(2), 182-194.
- Recabal, A., Caprile, T., & García-Robles, M. d. l. A. (2017). Hypothalamic neurogenesis as an adaptive metabolic mechanism. *Frontiers in neuroscience*, 11, 190.
- Recabal, A., Elizondo-Vega, R., Philippot, C., Salgado, M., López, S., Palma, A., Tarifeño-Saldivia, E., Timmermann, A., Seifert, G., & Caprile, T. (2018). Connexin-43 gap junctions are responsible for the hypothalamic tanycyte-coupled network. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12, 406.
- Recabal, A., Fernández, P., López, S., Barahona, M. J., Ordenes, P., Alejandra, P., Elizondo-Vega, R., Farkas, C., Uribe, A., & Caprile, T. (2020). The FGF2-induced tanycyte proliferation involves a connexin 43 hemichannel/purinergic-dependent pathway. *Journal of Neurochemistry*.
- Reynolds, B. A., & Weiss, S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *science*, 255(5052), 1707-1710.
- Robins, S., Stewart, I., McNay, D., Taylor, V., Giachino, C., Goetz, M., Ninkovic, J., Briancon, N., Maratos-Flier, E., & Flier, J. (2013). α -Tanycytes of the adult hypothalamic third ventricle include distinct populations of FGF-responsive neural progenitors. *Nature communications*, 4(1), 1-13.
- Rodríguez, E. M., Blázquez, J. L., Pastor, F. E., Peláez, B., Pena, P., Peruzzo, B., & Amat, P. (2005). Hypothalamic tanycytes: a key component of brain–endocrine interaction. *International review of cytology*, 247, 89-164.

- Safahani, M., Aligholi, H., Noorbakhsh, F., Djalali, M., Pishva, H., Mousavi, S. M. M., Alizadeh, L., Gorji, A., & 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. *European journal of nutrition*, 58(4), 1687-1701.
- Salgado, M., Ordenes, P., Villagra, M., Uribe, E., García-Robles, M. d. I. A., & Tarifeño-Saldivia, E. (2019). When a little bit more makes the difference: Expression levels of GKRP determines the subcellular localization of GK in tanycytes. *Frontiers in neuroscience*, 13, 275.
- Salgado, M., Tarifeño-Saldivia, E., Ordenes, P., Millán, C., Yañez, M. J., Llanos, P., Villagra, M., Elizondo-Vega, R., Martínez, F., & Nualart, F. (2014). Dynamic localization of glucokinase and its regulatory protein in hypothalamic tanycytes. *PloS one*, 9(4), e94035.
- Schuettauf, F., Zurakowski, D., Quinto, K., Varde, M. A., Besch, D., Laties, A., Anderson, R., & Wen, R. (2005). Neuroprotective effects of cardiotrophin-like cytokine on retinal ganglion cells. *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 243(10), 1036-1042.
- Schwartz, M. W., Woods, S. C., Porte, D., Seeley, R. J., & Baskin, D. G. (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature*, 404(6778), 661-671.
- Seri, B., García-Verdugo, J. M., Collado-Morente, L., McEwen, B. S., & Alvarez-Buylla, A. (2004). Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus. *Journal of Comparative Neurology*, 478(4), 359-378.
- Shen, Q., Wang, Y., Kokovay, E., Lin, G., Chuang, S.-M., Goderie, S. K., Roysam, B., & Temple, S. (2008). Adult SVZ stem cells lie in a vascular niche: a quantitative analysis of niche cell-cell interactions. *Cell stem cell*, 3(3), 289-300.
- Shors, T. J., Townsend, D. A., Zhao, M., Kozorovitskiy, Y., & Gould, E. (2002). Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal-dependent learning. *Hippocampus*, 12(5), 578-584.
- Smith, T., Heger, A., & Sudbery, I. (2017). UMI-tools: modeling sequencing errors in Unique Molecular Identifiers to improve quantification accuracy. *Genome research*, 27(3), 491-499.
- Soneson, C., & Delorenzi, M. (2013). A comparison of methods for differential expression analysis of RNA-seq data. *BMC bioinformatics*, 14(1), 91.
- Steiner, B., Klempin, F., Wang, L., Kott, M., Kettenmann, H., & Kempermann, G. (2006). Type-2 cells as link between glial and neuronal lineage in adult hippocampal neurogenesis. *Glia*, 54(8), 805-814.
- Tang, F., Barbacioru, C., Wang, Y., Nordman, E., Lee, C., Xu, N., Wang, X., Bodeau, J., Tuch, B. B., & Siddiqui, A. (2009). mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell. *Nature methods*, 6(5), 377-382.
- Townsend, K. L., Lorenzi, M. M., & Widmaier, E. P. (2008). High-fat diet-induced changes in body mass and hypothalamic gene expression in wild-type and leptin-deficient mice. *Endocrine*, 33(2), 176-188.
- Wang, T., & Xiong, J.-Q. (2016). The orphan nuclear receptor TLX/NR2E1 in neural stem cells and diseases. *Neuroscience bulletin*, 32(1), 108-114.
- Wang, Y., & Huang, S. (2000). Adenovirus technology for gene manipulation and functional studies. *Drug Discovery Today*, 5(1), 10-16.

- Wei, L.-C., Shi, M., Chen, L.-W., Cao, R., Zhang, P., & Chan, Y. (2002). Nestin-containing cells express glial fibrillary acidic protein in the proliferative regions of central nervous system of postnatal developing and adult mice. *Developmental brain research*, 139(1), 9-17.
- Wilkinson, M., & Imran, S. A. (2019). *Clinical Neuroendocrinology: An Introduction*. Cambridge University Press.
- Wojtowicz, J. M., & Kee, N. (2006). BrdU assay for neurogenesis in rodents. *Nature protocols*, 1(3), 1399.
- Wolburg, H., Liebner, S., & Lippoldt, A. (2003). Freeze-fracture studies of cerebral endothelial tight junctions. In *The Blood-Brain Barrier* (pp. 51-66). Springer.
- Xu, Y., Tamamaki, N., Noda, T., Kimura, K., Itokazu, Y., Matsumoto, N., Dezawa, M., & Ide, C. (2005). Neurogenesis in the ependymal layer of the adult rat 3rd ventricle. *Experimental neurology*, 192(2), 251-264.
- Yoo, S., & Blackshaw, S. (2018). Regulation and function of neurogenesis in the adult mammalian hypothalamus. *Progress in neurobiology*, 170, 53-66.
- Yoon, G., Cho, K. A., Song, J., & Kim, Y.-K. (2019). Transcriptomic analysis of high fat diet fed mouse brain cortex. *Frontiers in genetics*, 10, 83.
- Zhang, J., & Jiao, J. (2015). Molecular biomarkers for embryonic and adult neural stem cell and neurogenesis. *BioMed research international*, 2015.
- Zhu, Y., Gao, Y., Tao, C., Shao, M., Zhao, S., Huang, W., Yao, T., Johnson, J. A., Liu, T., & Cypess, A. M. (2016). Connexin 43 mediates white adipose tissue beiging by facilitating the propagation of sympathetic neuronal signals. *Cell metabolism*, 24(3), 420-433.

