



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO
Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**Caracterización de un modelo celular de neuronas
POMC/CART de núcleo arqueado de ratón.**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
Perla Diana Coronado Monroy

TUTOR PRINCIPAL:
Dra. Selma Eréndira Avendaño Vázquez.
Instituto Nacional De Medicina Genómica.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dr. Jesús Adolfo García Sáinz
Instituto De Fisiología Celular

Dra. Lorena Aguilar Arnal
Instituto De Investigaciones Biomédicas

Ciudad de México, Agosto, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este proyecto se realizó gracias al financiamiento del Fondo Sectorial de Investigación para la Educación SEP-CONACyT [A1-S-38213], al Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social SS/IMSS/ISSSTE-CONACyT [SALUD-2017-2-289862] y al Instituto Nacional de Medicina Genómica, INMEGEN [09/2019/I y 08/2017/I].

Perla Diana Coronado Monroy fue becada durante sus estudios de maestría por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), becaria # 638651.

PMDCB/1444/2019

Coronado Monroy Perla Diana
Estudiante de Maestría en Ciencias Bioquímicas
P r e s e n t e

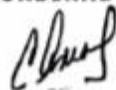
Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 10 de junio del presente año, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS**, con la réplica de la tesis "**Caracterización de un modelo celular de neuronas POMC/CART de núcleo arqueado de ratón**", dirigida por el/la Dr(a). **Avendaño Vázquez Selma Eréndira (Recordar Normatividad 4to tutorial oficial, con calificaciones)**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

PRESIDENTE	González Arenas Aliesha
VOCAL	Cifuentes Navarro Freddy Roberto
VOCAL	De Gortari Gallardo Patricia Bertha Judith
VOCAL	Gómora Martínez Juan Carlos
SECRETARIO	Velasco Velázquez Marco Antonio

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 10 de junio de 2019.
COORDINADORA



Dra. ANA BRÍGIDA CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico recibido, No. 494563.

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por el apoyo económico otorgado para poder participar en XXXII Congreso Nacional de Bioquímica, México.

Al Instituto de Fisiología Celular (IFC). Por el préstamo de sus instalaciones y la asesoría de sus expertos para la realización de algunos de los experimentos de esta investigación. En particular al Dr. J. Adolfo García Sáinz, al Dr. Fernando López Casillas y al Dr. Luis B. Tovar y Romo.

Quiero agradecer especialmente a la Dra. Rocío Alcántara Hernández, el M. C. Valentín Mendoza Rodríguez, y a la QFB Cristina Aranda Fraustro por su constante e invaluable apoyo técnico a lo largo de este proyecto.

A mi comité tutorial: a la Dra. Selma Eréndira Avendaño Vázquez, al Dr. Jesús Adolfo García Sáinz y a la Dra. Lorena Aguilar Arnal, que a lo largo del proyecto aportaron valiosos comentarios e ideas que permitieron la culminación de este proyecto y a mi crecimiento profesional.

A los miembros del jurado que revisaron el escrito de la tesis:

Dra. Aliesha González Arenas

Dr. Marco Antonio Velázquez Velasco

Dra. Patricia Bertha Judith De Gortari Gallardo

Dr. Freddy Roberto Navarro Cifuentes

Dr. Juan Carlos Gómora Martínez

Por sus valiosas observaciones que enriquecieron este trabajo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme las herramientas para mi crecimiento y formación profesional.

A mis amigos y compañeros de laboratorio, por compartir sus conocimientos. Gracias Omar, Heber, Mario, Elizabeth, Ana, Filiberto, Joel y Alejandro.

A mi amiga Diana C. por su apoyo académico, por todas las historias que vivimos en el laboratorio, por escucharme, por compartirme sus ideas, por ayudarme en los experimentos, por ser mi compañera de Uber en las noches y recordarme cuando exageraba “un poquito”. Los fines de semana en el laboratorio eran lo máximo.

A mi amiga Marisol O. por sus consejos, por siempre animarme, por su invaluable amistad y por nuestro “humor simplón” en los días más grises.

Al Dr. Fabian Flores Jasso y a la Dra. Mariana Flores Torres, por las opiniones, comentarios y críticas constructivas que aportaron en el desarrollo del proyecto.

A mi tutora, la Dra. Selma Eréndira Avendaño, por abrirme las puertas de su laboratorio, por su paciencia infinita, por ser tan maternal, por las enseñanzas dentro y fuera del laboratorio, y sobre

todo por confiar en mí y perdonar mis errores. Ser su alumna me permitió conocer e introducirme en el mundo de la investigación científica, gracias.

A mi familia. A mis papas Juan Pablo y Felicitas, por siempre esperar lo mejor de mí, por ser las personas que más admiro, por su amor y por todas las virtudes que me han brindado. A mi maravilloso hermano Oscar, por darle siempre un toque de alegría y diversión a mi vida.

A mis suegros Lila y Oscar, por su cariño, su apoyo incondicional y sus agradables platicas. A mis cuñados Montserrat, Francisco y Miguel, por su amabilidad y cariño.

A mi amado esposo Oscar, por iniciar este camino conmigo, por soportar mis días malos, por nunca quedarse callado, por llevarme y recogerme del instituto, por ser siempre tan atento y comprensivo, por demostrarme día con día y acción tras acción su amor incondicional. Te amo.

Índice	Página
ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN	3
ABSTRACT.....	4
INTRODUCCIÓN.....	6
Neuroanatomía general del hipotálamo	6
Poblaciones celulares del hipotálamo	6
Funciones generales del hipotálamo.....	7
Hipotálamo y regulación de la homeostasis energética	8
Vías de señalización de neuropéptidos y hormonas en el hipotálamo.....	9
Activación e inhibición de las neuronas POMC/CART y NPY/AgRP.....	10
JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO.	12
HIPÓTESIS.....	13
OBJETIVOS.....	13
Objetivo general.....	13
Objetivo particular	13
MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
Agentes farmacológicos	14
Cultivo celular.....	14
Citometría de flujo para separación de clonas de la línea celular CLU 507 mHypo-Kiss/GFP.....	14
Extracción de RNA.....	14
Cuantificación de la concentración y evaluación de la integridad de RNA total.....	15
RT-PCR.....	15
Extracción de proteínas.....	16
Cuantificación de proteínas por Bradford	16
Detección de neuropéptidos por WB	16
Determinación de $[Ca^{2+}]_i$	17
Determinación de STAT3 fosforilado.....	17
Determinación de AMPc	17
Secuenciación Sanger	18
Análisis estadístico	18
RESULTADOS	18
Obtención de clonas de la línea celular CLU 507 mHypoA-kiss/GFP-3	18

Expresión de neuropéptidos de las clonas obtenidas	19
Las células 507C1 presentan un transcrito inmaduro de AgRP	21
La clona 507C1 expresa la proteína de POMC y CART	22
Las células 507 C1 responden a norepinefrina y NPY.	24
Evaluación de la estabilidad del fenotipo de las células 507C1.	25
La concentración de glucosa no modifica el fenotipo de las células 507C1.....	25
Las células 507 C1 presentan cambios en su fenotipo	26
Revisión de los procesos de diferenciación de las células de NArc.....	27
El tipo de SFB no promueve cambio en los patrones de expresión en las células 507C1.	28
DISCUSIÓN	30
CONCLUSIONES.....	35
PERSPECTIVAS	35
Evaluación de la presencia de receptores de Leptina, orexina A, galanina y péptido YY.....	35
Estabilización del modelo celular 507 C1 POMC/CART	37
Análisis del procesamiento del mRNA inmaduro de AgRP	37
Knock-out de AgRP en la línea celular CLU 507	37
Función de la modificación m6A del mRNA en el procesamiento de señales extracelulares que modulan el metabolismo energético.	38
BIBLIOGRAFÍA.....	39

Índice de figuras

Figura 1. Ubicación y estructura del hipotálamo.....	6
Figura 2. Representación esquemática del control homeostático de la ingesta de alimentos en el hipotálamo.....	9
Figura 3. Regulación de la homeostasis energética entre el sistema nervioso central y las señales periféricas	10
Figura 4. Aislamiento de clonas por citometría de flujo.....	19
Figura 5. Patrón de expresión de los cuatro neuropéptidos en cultivos monoclonales de células CLU507.....	20
Figura 6. Confirmación de la presencia del transcrito inmaduro de AgRP en la clona 507 C1.....	22
Figura 7. Inmunodetección de CART y POMC en células 507C1.....	24
Figura 8. Respuesta de las células 507 C1 a estímulos hormonales:	25
Figura 9. Células 507 C1 con el mismo fenotipo en presencia de alta y baja glucosa.....	26
Figura 10. Coexpresión de AgRP y POMC	26
Figura 11. Fenotipo AgRP de las células 507C1.....	27
Figura 12. Resumen gráfico de las condiciones para la diferenciación de las células de NArc a partir de células madre embrionarias (hESC) o de células pluripotenciales inducidas (iPSC).....	28
Figura 13. Detección del transcrito maduro e inmaduro de AgRP en células 507 C1 cultivadas con SFB PP y BW.....	29
Figura 14. Evaluación de la señalización de leptina, epinefrina, orexina A, galanina y péptido YY...36	

Índice de tablas

Tabla 1. Efecto de las señales extracelulares sobre las neuronas POMC/CART y AgRP/NPY.....	12
Tabla 2. Secuencias de primers para la identificación de los mRNAs de los neuropéptidos.	15
Tabla 3. Condiciones de la reacción	15
Tabla 4. Especificaciones de los anticuerpos.....	17

ABREVIATURAS

ADH	Hormona antidiurética (Antidiuretic hormone)
AHD	Área hipotalámica dorsal (Dorsal hypothalamic area)
AgRP	Proteína relacionada a agouti (Agouti-related peptide)
AHL	Área hipotalámica lateral (Lateral hypothalamus area)
AMPK	Proteína quinasa activada por AMP (AMP-activated protein kinase)
APF	Área perifornical (Perifornical area)
CART	Transcrito regulado por cocaína y anfetamina (Cocaine and amphetamineregulated transcript)
CRH	Hormona liberadora de adrenocorticotropina (Corticotropin-releasing hormone)
DMEM	Dulbecco modified Eagles minimal essential medium
EM	Eminencia Media (Media eminence)
FSC	Dispersión de la luz frontal (Forward scatter)
FSH	Hormona folículo estimulante (Follicle-stimulating hormone)
GaIR	Receptor de galanina (Galanin receptor)
GI	Tracto gastrointestinal inferior (Gastrointestinal tract)
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropina (Gonadotropin-releasing hormone)
hESC	Células madre embrionarias (Human embryonic stem cell)
hiPSC	Células madre pluripotentes inducidas (Human Induced Pluripotent Stem Cell)
HDM	Hipotálamo dorsomedial (Dorsomedial hypothalamic)
HL	Hipotálamo Lateral (Lateral hypothalamus)
HVM	Hipotálamo ventromedial (Ventromedial hypothalamus)
IR	Receptor de insulina (Insulin receptor)
JAK2	Janus Kinase 2
LH	Hormona luteinizante (Luteinizing hormone)
LepR	Receptor de leptina (Leptin receptor)
MC4R	Receptor de melanocortina 4 (Melanocortin receptors 4)
NArc	Núcleo Arqueado (Arcuate nucleus)
Ngn3	Neurogenin 3
NMD	Degradación del ARN mensajero mediada por mutaciones terminadoras (Nonsense Mediated Decay)
NPC	Células neuroprogenitoras (Neuroprogenitor cells)
NSO	Núcleo supraóptico (Supraoptic nucleus)
NSQ	Núcleo supraquiasmático (Suprachiasmatic nucleus)
NPV	Núcleo paraventricular (Paraventricular nucleus)
NPVa	Núcleo paraventricular anterior (Anterior paraventricular nucleus)
NPY	Neuropéptido Y (Neuropeptide Y)
NPYR	Receptores de NPY (NPY receptors)
OD	Densidad óptica (Optical density)
Ox-1R	Receptor de Orexina (Orexin receptor)
PI3K	Fosfoinositol 3-quinasa (Phosphoinositide 3-kinase)
POMC	Proopiomelanocortina (Pro-opiomelanocortin)
PYY	Péptido YY (Peptide YY)

RA	Receptor adrenérgico (Adrenergic receptor)
RI	Retención de intrones (Intron retention)
SFB	Suero fetal bovino (Fetal bovine serum)
sgRNA	RNA guía
SSC	Dispersión lateral (Side scatter)
STAT3	Transductor de señal y activador de la transcripción 3 (Signal transducer and activator of transcription 3)
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
TRH	Hormona liberadora de tirotrópina (Thyrotropin-releasing hormone)
TRPC5	Short transient receptor potential channel 5
α -MSH	Hormona estimulante de la α -melanocortina (α - melanocortin stimulating hormone)

RESUMEN

El hipotálamo es un área del cerebro formada por fibras nerviosas y un conglomerado de neuronas organizadas en varios núcleos. Las neuronas que conforman estos núcleos pueden identificarse mediante patrones específicos de expresión genética como: neuropéptidos, receptores, hormonas, etc. Estos patrones de expresión genética les proporcionan una participación en funciones relacionadas con el mantenimiento de la homeostasis del cuerpo. Tal es el caso de la regulación del balance energético, función en la que participan dos poblaciones neuronales que conforman el núcleo arqueado (NArc), la población neuronal POMC/CART (que expresa los neuropéptidos: proopiomelanocortina o POMC y el transcrito regulado por cocaína y anfetamina o CART) y la población neuronal AgRP/NPY (que expresa los neuropéptidos: proteína relacionada a agouti o AgRP y neuropéptido Y o NPY). Estas poblaciones se encargan de detectar y responder a diversas señales periféricas para mantener el equilibrio energético de organismo y pueden responder de dos formas: estimulando la ingesta de alimento, activando las neuronas POMC/CART mediante la expresión de sus neuropéptidos; y estimulando la saciedad, activando las neuronas AgRP/NPY mediante la expresión de sus neuropéptidos.

La mayoría de los estudios que se han realizado para dilucidar este mecanismo de regulación de la homeostasis energética, no han evidenciado con detalle los procesos moleculares que subyacen a la activación e inhibición de ambas poblaciones neuronales. De hecho, un modelo celular *in vitro* que exprese un solo fenotipo (ya sea POMC/CART o AgRP/NPY) y que reproduzcan lo más fielmente las características de las poblaciones neuronales permitiría usarlo como herramienta de estudio para entender con detalle los procesos moleculares que regulan la homeostasis energética en respuesta directa a la administración de diferentes estímulos (excitadores o inhibidores).

En el presente proyecto se separaron las poblaciones celulares de NArc de la línea celular CLU507mHypoA-kiss/GFP-3 por citometría de flujo y se determinó la presencia de los neuropéptidos específicos de cada población mediante la detección de sus transcritos (POMC/CART y AgRP/NPY), además, se determinó la presencia de receptores involucrados con la homeostasis energética mediante la activación de sus vías de señalización.

Se encontró que el fenotipo POMC/CART, tanto a nivel de transcrito como de proteína, estaba presente no solo en las monoclonas obtenidas después de la separación sino también en la línea celular de la que se partió y en otra línea celular proveniente de todo el hipotálamo (CLU505mHypoA-kiss/GFP-1). Además, de manera inesperada se detectó el transcrito inmaduro de AgRP. Estos resultados demostraron no ser un fenómeno propio del cultivo celular de las monoclonas o las líneas celulares ya que también fueron observados en tejido de hipotálamo de ratón, lo que permite sugerir la presencia de algún otro mecanismo de regulación de la expresión de estos neuropéptidos, como la hipótesis del RNA centinela.

Por otra parte, también se encontró que el modelo celular C1 507 (una de las monoclonas) presenta receptores adrenérgicos y receptores NPY (receptores característicos de las neuronas POMC/CART), lo cual hace al modelo útil o ventajoso para el estudio de los mecanismos moleculares que subyacen a la regulación de su activación e inhibición.

Por último, la presencia del transcrito inmaduro de AgRP sugería la posibilidad de que fenotipo POMC/CART cambiara en respuesta a un estímulo extracelular por lo que se evaluó la estabilidad

del modelo celular frente a una disminución en la concentración de glucosa y una variación en la marca de SFB usada. Se encontró que, bajo las condiciones analizadas, ni la glucosa ni el tipo de SFB influían en el cambio de fenotipo, lo cual abre una ventana de posibilidades en cuanto al estudio de él o los factores involucrados con la estabilidad del fenotipo.

En conclusión, nuestros análisis sugieren que el modelo celular POMC/CART que obtuvimos además de proporcionar nuevas áreas de estudio en la búsqueda de los factores y mecanismos involucrados en la regulación del proceso de diferenciación hacia un determinado fenotipo peptidérgico final, también, podría ser útil como herramienta de estudio en los procesos de splicing que regulan el procesamiento del RNA mensajero de AgRP.

ABSTRACT

The hypothalamus is an area of the brain made up of nerve fibers and a conglomerate of neurons organized into various nuclei. The neurons that make up these nuclei can be identified through specific gene expression patterns such as: neuropeptides, receptors, hormones, etc. These gene expression patterns allow them to participate in functions related to maintaining the body's homeostasis. Such is the case of the regulation of energy balance, a function in which two neuronal populations that make up the arcuate nucleus (NArc) participate, the POMC / CART neuronal population (which expresses the neuropeptides: proopiomelanocortin or POMC and the transcript regulated by cocaine and amphetamine or CART) and the neuronal population AgRP / NPY (expressing neuropeptides: agouti-related protein or AgRP and neuropeptide Y or NPY). These populations are responsible for detecting and responding to various peripheral signals to maintain the energy balance of the body and can respond in two ways: by stimulating food intake, activating POMC / CART neurons by expressing their neuropeptides; and stimulating satiety, activating AgRP / NPY neurons by expressing their neuropeptides.

Most of the studies that have been carried out to elucidate this mechanism of regulation of energy homeostasis, have not evidenced in detail the molecular processes that underlie the activation and inhibition of neuronal populations. In fact, an in vitro cell model that expresses a single phenotype (either POMC / CART or AgRP / NPY) and that most faithfully reproduces the characteristics of neural populations would allow it to be used as a study tool to understand in detail the molecular processes that regulate energy homeostasis in direct response to the administration of different stimuli (excitatory or inhibitory).

In the present project, the NArc cell populations were separated from the CLU507mHypoA-kiss/GFP-3 cell line by flow cytometry and the presence of the specific neuropeptides of each population was determined by detecting their transcripts (POMC/CART and AgRP/NPY), in addition, the presence of receptors involved with energy homeostasis was determined by activating their signalling pathways.

The POMC/CART phenotype was found both at the transcripts and protein level, it was present not only in the monoclonal cells obtained after separation but also in cell line from which it was separated and from another cell line originating of whole hypothalamus (CLU505mHypoA-kiss/ GFP-1). Furthermore, the immature AgRP transcript is unexpectedly detected. These results proved not to be a phenomenon typical of the cell culture of monoclonal cells or cell lines since they were also observed in mouse hypothalamic tissue, which suggests the presence of some other mechanism for regulating the expression of these neuropeptides, such as the sentinel RNA hypothesis.

On the other hand, the C1 507 cell model (one of the monoclonal) is also found to have adrenergic receptors and NPY receptors (characteristic receptors for POMC / CART neurons), which makes the model useful or advantageous for the study of the molecular mechanisms that underlie the regulation of its activation and inhibition.

Finally, the presence of the immature AgRP transcript suggests the possibility that the POMC/CART phenotype could be changed depending of the response to an extracellular stimulus, therefore the stability of the cell model was evaluated against a decrease in glucose concentration and a variation in the brand of SFB used. It was found that, under the test conditions, neither the glucose nor the type of SFB influence the phenotype change, which opens a window of possibilities regarding the study of the factors involved with the stability of the phenotype.

In conclusion, our analysis detect the POMC / CART cell model that we obtained, in addition to providing new areas of study in the search for the factors and mechanisms involved in the regulation of the differentiation process towards a certain final peptidergic phenotype, also it could be useful as a study tool in the splicing process that regulates AgRP messenger RNA processing.

INTRODUCCIÓN

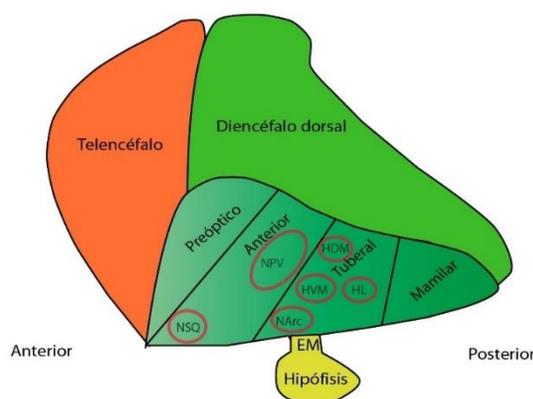
Neuroanatomía general del hipotálamo

El hipotálamo, es una zona diencefálica situada debajo del tálamo y que forma las paredes y el suelo del tercer ventrículo. Se trata de una pequeña, pero muy heterogénea y compleja estructura, que ha sido conservada por vertebrados⁴⁴.

El hipotálamo de mamíferos no posee una clara delimitación topográfica que pueda servir de base para el establecimiento de sus límites o sus divisiones morfológicas. No obstante, se sabe que comprende varios núcleos dispuestos en un mosaico tridimensional⁸².

La composición neuroanatómica de estos núcleos es heterogénea, debido a que existen neuronas que expresan distintos receptores o péptidos y tienen funciones reguladoras variadas.

Cada región hipotalámica tiene distintos de núcleos (Figura 1.) y zonas con funciones asociadas. El hipotálamo anterior, por ejemplo, incluye: el núcleo supraóptico (NSO), el núcleo supraquiasmático (NSQ), el núcleo paraventricular (PVN) y el núcleo periventricular anterior (NPVa). Todos estos regulan la alimentación, los ritmos circadianos y otros procesos homeostáticos. El hipotálamo tubular incluye el NArc, la eminencia media (EM) y el hipotálamo ventromedial (HVM) y dorsomedial (HDM), y desempeña un papel en el equilibrio energético, la respuesta al estrés y la regulación de los ejes endócrinos⁸².



Modificado de (Xie & Dorsky, 2017)

Figura 1. Ubicación y estructura del hipotálamo. Vista lateral del prosencéfalo que muestra divisiones hipotalámicas conservadas en un vertebrado después del patrón inicial. Cuatro regiones rostrocaudales (zona verde agua) están delineadas por líneas negras continuas, y los núcleos hipotalámicos están delineados por círculos rojos. NArc, núcleo arqueado; HDM, hipotálamo dorsomedial; HL, área hipotalámica lateral; EM, eminencia mediana; NPV, núcleo paraventricular; NSQ, núcleo supraquiasmático; HVM, hipotálamo ventromedial.

Poblaciones celulares del hipotálamo

Las neuronas que conforman los diferentes núcleos hipotalámicos pueden agruparse o identificarse por patrones específicos de expresión génica, como canales iónicos, factores de transcripción y neuropéptidos.

Por ejemplo, las neuronas que se encargan de liberar varios neuropéptidos ubicados en el hipotálamo lateral juegan un papel importante en la ingesta de alimentos. En el NArc, las neuronas expresan neuropéptidos orexigénicos: AgRP y NPY; y péptidos anorexigénicos: POMC y CART. Por su

parte, las neuronas que sintetizan una gran cantidad de neuropéptidos, como la sustancia P, las encefalinas y el NPY, se encuentran en el núcleo ventromedial y están involucradas en la regulación del comportamiento sexual y la analgesia⁶.

Un estudio reciente mostró que en el hipotálamo de ratón adulto hay 34 grupos de células neuronales y 11 grupos de células no neuronales con distintos fenotipos transcripcionales¹⁸. Los datos de este estudio además de proporcionar una visión integral de la expresión de neuropéptidos en los distintos subtipos neuronales, también sugiere que existe una especificación funcional de estos subtipos neuronales, ya que los efectos transcripciones (causados por inanición) varían entre en los subtipos neuronales.

Funciones generales del hipotálamo

El hipotálamo está conformado por una serie de núcleos. Estos núcleos están compuestos por diferentes poblaciones neuronales que establecen conexiones nerviosas y endocrinas. Debido a esto, el hipotálamo desarrolla múltiples funciones que generalmente se enfocan en mantener la homeostasis.

Termorregulación:

Es el proceso que permite mantener la temperatura del cuerpo dentro de los rangos normales. En caso de temperatura corporal alta, el hipotálamo responde a través del comportamiento termorregulador de pérdida de calor (ya sea sudoración o vasodilatación)²⁰.

Regulación de la ingesta de alimentos:

El hipotálamo controla el apetito y la ingesta de alimentos a través del NArc, NPV, HDM e HL. El control del apetito es modulado por la intervención de diferentes hormonas y péptidos de la circulación periférica como: leptina, insulina, ghrelina y PYY⁷².

Regulación del contenido de agua corporal:

El hipotálamo regula el contenido de agua corporal a través de la secreción de la hormona antidiurética (ADH). En casos de pérdida de volumen sanguíneo y deshidratación, la hormona ADH se secreta desde el núcleo supraóptico, que tiene células osmorreceptoras, y se libera en la circulación. El péptido se dirige hacia su receptor específico en los riñones y disminuye la producción de orina con la posterior retención de agua en el organismo⁷¹.

Centro para el sistema nervioso autónomo:

El hipotálamo se encarga de regular los sistemas simpático y parasimpático. La región anterior del hipotálamo tiene un efecto excitador sobre el sistema simpático, mientras que las posteriores y laterales tienen un efecto excitador sobre el sistema parasimpático⁹.

Reproducción:

La función de reproducción de un organismo está asegurada por el eje hipotalámico-pituitario-gonadal. La hormona gonadotropina (GnRH) secretada por el hipotálamo estimula la producción de la hormona luteinizante (LH) y la hormona foliculo estimulante (FSH) en la subdivisión anterior de la glándula pituitaria. La acción de estas dos hormonas en las gónadas determina la producción de estrógenos y testosterona. El comportamiento en hombres y mujeres también está influenciado por

los esteroides sexuales. Las neuronas en el preóptico están involucradas en el comportamiento sexual masculino, mientras que las del tubo regional ejercen sus propiedades en las mujeres^{59, 2}.

El ritmo circadiano:

El núcleo supraquiasmático se encarga de recibir información electroquímica de la retina y junto con la glándula pituitaria están involucrados en el ritmo circadiano⁶⁵. El ritmo circadiano dentro del hipotálamo tiene participación a su vez en la regulación de la respuesta al estrés, la función tiroidea y el eje reproductivo⁷³.

Hipotálamo y regulación de la homeostasis energética

Una de las variadas funciones que ejecuta el hipotálamo es la regulación de la homeostasis energética, que se refiere al control entre la energía que se consume y el gasto energético a lo largo del tiempo¹⁴.

En los primeros experimentos enfocados al estudio de la homeostasis energética se reportó al HVM y el HL como centros clave en la regulación del apetito, sin embargo, en los últimos años, el NARc ha recibido una mayor atención y hoy en día es posiblemente la región cerebral mejor estudiada para el control neuronal del apetito y el metabolismo.

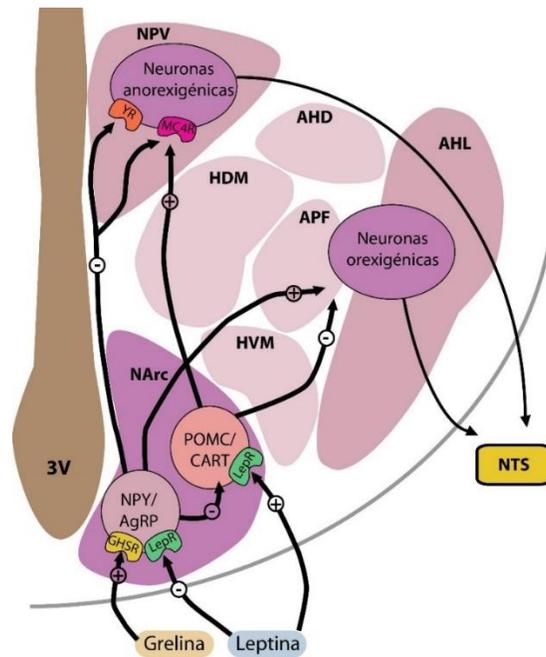
Los estudios detallados del NARc han revelado que está compuesto por dos poblaciones neuronales identificadas químicamente por los neuropéptidos que expresan. Se trata de neuronas orexigénicas y anorexigénicas. Las primeras se caracterizan por coexpresar el neuropéptido Y (NPY) y el péptido relacionado con agouti (AgRP), mientras que las segundas se caracterizan por coexpresar tanto al transcrito regulado por cocaína y anfetaminas (CART) como al neuropéptido proopiomelanocortina (POMC), este último es escindido en la hormona estimulante de melanocitos α (α -MSH) que es el péptido activo (Figura 2).

Ambas poblaciones neuronales (POMC y NPY/AgRP) son las primeras en recibir, coordinar y responder a los cambios en el estado metabólico, por lo que son llamadas neuronas de “primer orden”. Sin embargo, a pesar de comparten esta función y perfiles de actividad similares, por ejemplo, un tamaño de célula análogo y una excitabilidad neuronal basal similar⁶⁹, su respuesta frente a estímulos periféricos es opuesta.

Tanto las neuronas AgRP como POMC proyectan sus axones hacia el PVN, donde el efecto anoréxico del péptido α -MSH está mediado por los receptores de melanocortina 4 (MC4R) que ahí se expresan (Figura 2). Se sabe que las áreas NPV y AHL son ricamente abastecidas por axones del NARc. Tras varios estudios en el funcionamiento de estas zonas, se ha llegado a identificar al PVN como el “centro de saciedad”, mientras que el AHL recibe el reconocimiento de “centro del hambre”¹⁴.

Estas observaciones indican que tanto en el NPV como en el AHL se pueden sintetizar moléculas orexigénicas y anorexigénicas, respectivamente. Entre las moléculas anorexigénicas se encuentran la CRH y la TRH, mientras que las moléculas orexigénicas comprenden las orexinas A y B del AHL.

Las neuronas que conforman el NPV y el AHL son conocidas como neuronas de segundo orden ya que son considerados los efectores catabólicos secundarios río abajo del NARc. Esta idea está respaldada por el mecanismo antagónico que ejercen los neuropéptidos POMC/CART y AgRP/NPY en los receptores MC4R y NPYR (ubicados en el PVN y LHA)⁶³.



Modificado de (Flores, Maldonado, Berrendero, & Mangieri, 2013)

Figura 2. Representación esquemática del control homeostático de la ingesta de alimentos en el hipotálamo. La ghrelina liberada durante el ayuno del estómago y la leptina del tejido adiposo, entre otros mediadores, se unen a los receptores de las neuronas orexigénicas y / o anorexigénicas en el NArc del hipotálamo. Esto induce ya sea la liberación de los neuropéptidos orexigénicos NPY y AgRP, o bien, la liberación de los neuropéptidos anorexigénicos CART y el péptido α -MSH derivado de POMC. Estos neuropéptidos del NArc viajan a lo largo de los axones hacia las neuronas secundarias en otras áreas del hipotálamo, como el NPV y el AHL. Los efectos finales de estas cascadas de señalización son cambios en la sensación de hambre y saciedad en el núcleo del tracto solitario (NTS). NArc, núcleo arqueado; NPV, núcleo paraventricular; AHL, Área hipotalámica lateral; NTS, núcleo del tracto solitario; AHD, Área hipotalámica dorsal; HDM, Hipotálamo dorsomedial; APF, área perifornical; HVM, hipotálamo ventromedial; 3V, tercer ventrículo; NPY, neuropéptido Y; AgRP, péptido relacionado con Agouti; CART, transcripción regulada por cocaína y anfetamina; POMC, proopiomelanocortina; GHSR, receptor de ghrelina; LepR, receptor de leptina; YR, receptor de melanocortina 4.

Vías de señalización de neuropéptidos y hormonas en el hipotálamo

Las neuronas del NArc tienen acceso directo a señales periféricas, mediante la semipermeabilidad que esa zona tiene con la barrera hematoencefálica. Entre las señales periféricas que censan y frente a las que se generan una respuesta se encuentra: leptina, insulina, ghrelina y PYY (Figura 3).

La insulina es una hormona pancreática que se genera tras una elevada cantidad de glucosa en sangre. Por otra parte, la leptina es una hormona sintetizada en los adipocitos, después de que estos han sido estimulados por la insulina para que almacenen glucosa en forma de lípidos⁵⁰. La recepción de estas hormonas en el cerebro provoca la inhibición de la actividad de las neuronas NPY/AgRP mientras que estimulan la actividad anoréxica de POMC/CART para inhibir la ingesta de alimentos.

Estas hormonas viajan al fluido cerebral intersticial, donde pueden unirse a receptores neuronales de leptina (LEPR) o insulina (IR). Una vez que han sido reconocidas por sus receptores, se desencadena una cascada de señalización que a su vez promueve la síntesis de una serie de neuropéptidos involucrados con la conducta anorexigénica⁶¹.

Por el contrario, la ghrelina, que es secretada por el estómago y el duodeno, activa de las neuronas NPY/AgRP para promover la ingesta de alimentos. Para ejercer su acción orexigénica, la ghrelina llega al hipotálamo de tres maneras diferentes: i) cruzando sistémicamente la barrera hematoencefálica, ii) a través de las aferentes vagales y iii) a través de la síntesis y secreción hipotalámica local, ejerciendo así acciones paracrin⁴⁷.

El péptido YY (PYY) es sintetizado por las células L del tracto gastrointestinal inferior (GI) y se libera a la circulación después de una comida²⁶. El péptido tiene un efecto orexigénico cuando se administra centralmente, pero cuando se administra de manera periférica parece tener un efecto anorexigénico²⁶. Diversos estudios sugirieron que el efecto anorexigénico de PYY está mediado por la activación de las neuronas POMC^{7, 17}.

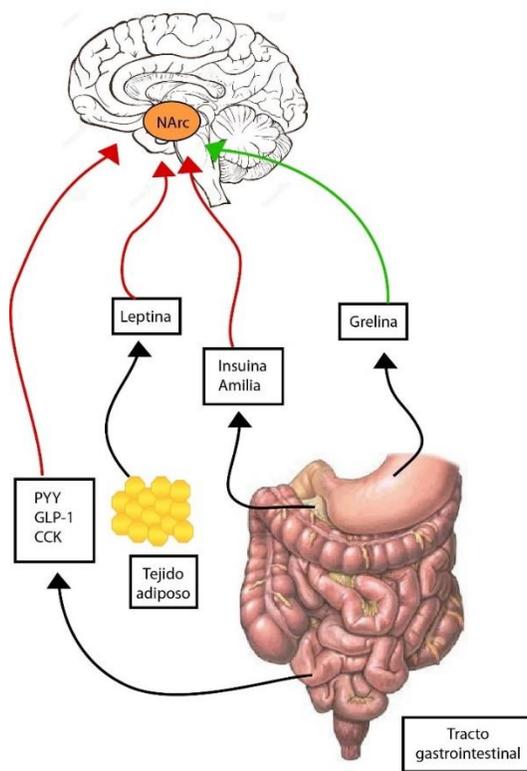


Figura 3. Regulación de la homeostasis energética entre el sistema nervioso central y las señales periféricas. El control hipotalámico de la homeostasis energética proviene de la capacidad de las neuronas hipotalámicas para orquestar respuestas conductuales, endocrinas y autónomas, a través de vías aferentes y eferentes hacia el tronco encefálico y la periferia. Las flechas rojas indican las señales periféricas que inducen la liberación de neuropéptidos NPY/AgRP. Las flechas verdes indican las señales periféricas que inducen la liberación de neuropéptidos POMC.

Activación e inhibición de las neuronas POMC/CART y NPY/AgRP.

La mayoría de las investigaciones que estudian la regulación del balance energético se han enfocado en evaluar la actividad de diversas señales periféricas sobre las poblaciones neuronales (POMC/CART y AgRP/NPY) en función de: 1) la expresión de sus neuropéptidos, 2) la hiperpolarización neuronal y 3) el aumento o la disminución de la ingesta de alimentos.

Gracias a esto ha sido posible obtener una amplia descripción de las características diferenciales de cada población neuronal.

Tomando como ejemplo a las neuronas POMC, estas se han caracterizado por inhibir la ingesta de alimentos y estimular el gasto de energía, esto se ha concluido después de estudiar la respuesta hacia las principales señales reguladoras de la homeostasis energética —insulina, leptina y glucosa, y los tipos de receptores que expresan.

La insulina por ejemplo, es considerada una hormona anorexigénica debido a que además de promover la pérdida de peso²⁴, también promueve la activación de las neuronas POMC mediante una despolarización de la membrana por la activación de canales llamados TRPC5 que se expresan altamente en estas neuronas⁶¹. Sin embargo, existen reportes que indican que esta hormona tiene una señalización alternativa mediada por fosfoinositol-3-quinasa (PI3K), mediante la cual es capaz de inhibir la actividad de algunas neuronas POMC⁷⁹.

La leptina (al igual que la insulina) es considerada una hormona anorexigénica que activa las neuronas POMC. Entre sus funciones se encuentra aumentar la frecuencia de los potenciales de acción en las neuronas por dos mecanismos: la despolarización (activación) a través de un canal catiónico no específico, y la inhibición reducida por neuropéptidos orexigénicos y neuronas locales GABA²¹. Una de las vías mediante la cual esta hormona estimula la actividad de las neuronas POMC es mediada por fosfoinositol-3-quinasa (PI3K)⁶¹. Pero la vía más estudiada es la activación de neuronas POMC/CART mediante JAK2/STAT3, la cual consiste primero en la fosforilación de los receptores de leptina mediante las proteínas (fosforiladas) Janus kinase 2 o JAK2⁵¹. Los receptores de leptina tienen un motivo de unión para la proteína STAT3. Una vez que STAT3 se une al receptor, éste es fosforilado, dimerizado y posteriormente translocado al núcleo para regular la transcripción de POMC (estimulando su expresión) y AgRP (inhibiendo su expresión)²⁵.

Por otra parte, la glucosa es un nutriente que también es detectado y genera una respuesta en las poblaciones neuronales del NArc, de hecho, las neuronas responden a la variación en las concentraciones de glucosa, los reportes clasifican esta variación como concentraciones altas o bajas. Por ejemplo, la respuesta que las neuronas POMC experimentan en esas condiciones se enlistan a continuación:

- La concentración alta de glucosa (25 mM) activa las neuronas POMC, por medio de:
 - Inhibición de la fosforilación de AMPK.
 - Aumento de la fosforilación de ERK1/2. Lo que promueve la activación de factores de transcripción que inducen la expresión de POMC⁸⁴
 - Unión de ATP a los canales de K_{ATP} sensibles a ATP⁵⁶
 - Aumento de la transcripción POMC, por la activación de los factores de transcripción NF- κ B / AP1³.
- La concentración baja de glucosa (5 mM) inhibe las neuronas POMC, por medio de:
 - Activación de la fosforilación de AMPK
 - La apertura de canales K_{ATP} ⁵⁶
 - La pérdida de detección de glucosa por UPC2 (Proteína mitocondrial desacoplante 2)⁵⁶

Por último, se muestra una tabla que resume la respuesta de las poblaciones neuronales POMC y AgRP hacia los principales estímulos extracelulares que han sido estudiados, así como los posibles receptores involucrados.

Tabla 1. Efecto de las señales extracelulares sobre las neuronas POMC/CART y AgRP/NPY.

Señal extracelular	Receptor involucrado	Efecto sobre las neuronas POMC		Referencia
		POMC	AgRP	
Leptina	LepR	Activa	Inhibe	21, 24, 31
Galanina	GalR1, GalR2	Inhibe	Activa	11,60
Orexina A	OX-1R, CB1R	Inhibe	Activa	48
Norepinefrina	RA: α 1A y α 2A	Inhibe	Activa	29; 55
péptido YY	Y1R, Y2R	Inhibe	-----	1,26
NPY	Y1R	Inhibe	Activa	10, 15
β -MSH	MC3R	Inhibe	Activa	16, 76

JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO.

A pesar de que existen diversos estudios en animales que han hecho posible llegar a tener un panorama general de cómo es que estas poblaciones neuronales (POMC/CART, AgRP/NPY) del NARC regulan la homeostasis energética, esto no ha sido suficiente para entender con detalle los mecanismos moleculares que subyacen a la activación e inhibición de estas poblaciones neuronales, o de cómo éstas integran las señales para responder con la síntesis y liberación de los neuropéptidos que producen.

Si bien es cierto que se conocen tanto las vías de señalización como los factores de transcripción que activan algunas señales extracelulares (leptina, glucosa, insulina) y su función en promover o inhibir la expresión de los neuropéptidos, aún quedan bastantes preguntas dirigidas no solo al tipo de vía de señalización que se activa y los factores de transcripción involucrados, sino también a: i) la cantidad de estímulos extracelulares requeridos para promover o inhibir la expresión de los neuropéptidos en cada población, ii) el efecto directo de una señal periférica sobre cada población neuronal, sin la influencia de señales paracrina interneuronales, iii) la existencia de algún grado de potencial de activación o inhibición de las poblaciones, dependiendo del tipo de señal extracelular expuesta y iv) la existencia de algún otro nivel de regulación en los mecanismos de procesamiento, traducción y liberación de los neuropéptidos.

Incógnitas como estas muestran que aún falta un gran camino de investigación para poder entender cómo funciona detalladamente el sistema de neuronas POMC/CART y AgRP/NPY en la regulación del balance energético. Con esto resulta evidente la necesidad de encontrar y establecer un modelo celular óptimo que ayude a en el estudio de estas interrogantes.

De hecho, un modelo celular *in vitro* que exprese un solo fenotipo (ya sea POMC/CART o AgRP/NPY) y que reproduzcan lo más fielmente las características de las poblaciones neuronales permitirá usarlo como herramienta de estudio para entender con detalle los procesos moleculares que regulan la homeostasis energética en respuesta directa a la administración de diferentes estímulos (excitadores o inhibidores). Además, sería bastante útil en el desarrollo de investigaciones

relacionadas con los procesos de regulación postranscripcional, regulación de la termogénesis y regulación del ritmo circadiano, así como en las pruebas para el descubrimiento, desarrollo y validación de nuevas terapias dirigidas a enfermedades y trastornos del SNC como el estrés y trastornos metabólicos, entre otros.

Ahora bien, la obtención de un modelo celular con un solo fenotipo implica la separación y selección de estas neuronas, sin embargo, estas poblaciones no pueden ser seleccionadas con base en sus diferencias morfológicas, ya que no existen y solo pueden ser identificadas por los neurotransmisores y péptidos que sintetizan y liberan^{36, 30}.

Se han hecho varios intentos para establecer modelos *in vitro* mediante la obtención de células progenitoras neuronales diferenciadas a neuronas del NArc (mediante protocolos de diferenciación optimizados). Sin embargo, estas células expresan tanto a POMC como a AgRP/NPY, se trata de poblaciones neuronales de NArc que expresan ambos neuropéptidos^{57, 78}.

Lo mismo ocurre con las pocas líneas celulares -aisladas de NArc de ratón- disponibles comercialmente; se trata de poblaciones mezcladas de las diferentes estirpes celulares que lo conforman.

Por lo que hasta el momento no se cuenta con modelos neuronales de células AgRP/NPY o POMC/CART en los que se pueda estudiar a nivel molecular las acciones de las señales y los receptores que actúan en cada una de manera independiente.

HIPÓTESIS

La separación de las poblaciones celulares de NArc permitiría obtener un modelo neuronal *in vitro* con un único fenotipo POMC/CART.

OBJETIVOS

Objetivo general

Obtener un modelo celular POMC/CART de NArc de ratón que exprese tanto los neuropéptidos como los receptores específicos.

Objetivo particular

1. Obtener monoclonas de la línea celular CLU507mHypo-kiss/GFP3.
2. Caracterizar la presencia de marcadores de diferenciación en las monoclonas a nivel de neuropéptidos específicos.
3. Determinar la presencia de receptores involucrados con la homeostasis energética, mediante la activación de sus vías de señalización.

MATERIALES Y MÉTODOS

Agentes farmacológicos

La hormona estimulante de melanocitos (M4135), el neuropéptido Y (N5017), la orexina A, (06012), la galanina (G0278), el glucagón (Y0000191), la colecistoquinina (C2175), la dl-norepinefrina (A7256), el péptido YY (P1306), la forskolina (F6886), el fura 2AM (F0888) y el HEPES (H3375) fueron obtenidos todos de SIGMA-ALDRICH.

Cultivo celular

Se usaron las líneas celulares:

- mHypoA-Kiss/GFP-3 No. de código: CLU507

- mHypoA-Kiss/GFP-1 No. de código: CLU505

De acuerdo con la información del proveedor (CEDERLANE), estas líneas celulares fueron generadas utilizando una tecnología de plataforma patentada que permite la creación de grupos de neuronas hipotálamicas inmortalizadas. El hipotálamo del ratón transgénico Kiss / GFP, lo microdisecionaron a partir de ratones hembra o macho, aislando el NArc y el núcleo anteroventral periventricular para los ratones hembra o usando todo el hipotálamo para los ratones macho. Es importante mencionar que estos ratones contenían un transgén eGFP impulsado por el promotor Kiss-1. Los cultivos primarios hipotálamicos los inmortalizaron por transferencia retroviral de SV40 T-Ag. Los cuatro grupos hipotálamicos que inmortalizaron, los clasificaron en un citómetro de flujo basado en fluorescencia GFP. La línea celular con código CLU 507, representan a toda la población de neuronas mHypoA-Kiss / GFP del NArc (mHypoA-Kiss / GFP-3) de ratones hembra. Mientras que la línea celular con código CLU 505, representa todas las neuronas hipotálamicas de ratones macho. Ambas clonas no se han subclonado más.

Las líneas celulares CLU 507 mHypoA-Kiss/GFP y CLU 505 mHypoA-Kiss/GFP fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, Performance plus), a 37°C y en una atmósfera con 5% de CO₂.

Las células C1PP fueron cultivadas con dos tipos de medio: DMEM bajo en glucosa (5 mM) y DMEM alta glucosa (25 mM), con 10% de SFB, A 37 °C y en una atmosfera con 5% de CO₂. Para el análisis de su fenotipo con diferentes sueros, se usaron las marcas Biowest y Performance Plus, con medio DMEM alta glucosa.

Citometría de flujo para separación de clonas de la línea celular CLU 507 mHypo-Kiss/GFP

Las clonas (provenientes de una única célula) de la línea celular CLU 507 mHypo-kiss/GFP se obtuvieron a partir del *sorting* por citometría de flujo (BD FACSMelody). Las células fueron separadas en placas de 96 pozos, partiendo de 1.5X10⁶ células/ml.

Las células fueron separadas por su tamaño y complejidad celular, empleando tres parámetros: SSC-A (dispersión lateral de luz), FSC-A (dispersión frontal de área) y FSC-H (dispersión frontal de altura).

Cada pozo de la placa se inspeccionó después de 8 y 24 h para asegurar la selección de clonas provenientes de célula única.

Extracción de RNA

El RNA total se extrajo usando la solución monofásica de isotiocianato de guanidina y fenol, comercialmente conocido como TRIzol (Ambion Technologies).

La extracción se realizó de dos formas: 1) Mediante el kit Direct-Zol RNA MiniPrep Plus (Zimoresearch R2072) siguiendo las instrucciones del fabricante. 2) Empleando cloroformo para obtener la separación de la solución en fase acuosa y orgánica y la precipitación con alcohol.

Cuantificación de la concentración y evaluación de la integridad de RNA total

La concentración de RNA y su pureza se determinó mediante un espectrofotómetro (Nanophotometer NP80, Implen).

La integridad del RNA se evaluó por medio de una electroforesis desnaturante de RNA con el protocolo TAE/formamida. Se uso un gel de agarosa al 1%. Las muestras de RNA fueron mezcladas con formamida (concentración final de 60% v/v), colorante de carga 10X (concentración final de 1% v/v) y 1 µl de bromuro de etidio (1 mg/ml) (20 µl de volumen final).

Las muestras fueron desnaturadas por calor a 65 °C por 5 min, e inmediatamente se pasaron a hielo por 5 min. La corrida electroforética se realizó a 90 V por 40 min. Los se capturó y analizó la fluorescencia emitida por las bandas del gel , mediante un fotodocumentador (BIO-RAD).

RT-PCR

El RNA se desnaturizó a 65 °C por 5 min. La síntesis de cDNA se realizó con la enzima M-Mulv RT (New england biolabs) siguiendo las especificaciones del proveedor y utilizando un primer dT anchor (CTAGTCTAGATCTGAATATATTCGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTN) (60 µM).

Los primers usados se muestran en la tabla 3. La corrida electroforética de los productos de PCR se realizó en un gel de agarosa al 2%, a 100 V por 90 min.

El kit “One step RT-PCR” (Qiagen) también fue usado en algunas reacciones de PCR, partiendo de la misma cantidad de RNA (1 µg/µl) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

Tabla 2. Secuencias de primers para la identificación de los mRNAs de los neuropéptidos.

Neuropéptido	Nombre del Primer	Secuencia	Temperatura de alineamiento	Tamaño del producto
AgRP	AFa	ATGCTGACTGCAATGTTGC	52° C	297pb
	ARb	CTTGGGACAGCAGGTACCT	52° C	
CART	CFa	ATGGAGAGCTCCCGCCTG	55° C	267 pb
	CRa	CTTTCCTCTTGAAGTGCTTGTGA	55° C	
NPY	NFa	ATGCTAGGTAACAAGCGAATGG	55° C	294 pb
	NRa	CTTGAAGACCCTCCATGTGGTG	55° C	
POMC	PFa	ATGCCGAGATTCTGCTACAGT	54° C	132 pb
	Para	ACGGAGAGCAACCTGCTG	54°c	

Tabla 3. Condiciones de la reacción

Condición		Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial		95° C	10 min
35 ciclos	Desnaturalización	95° C	30 s
	Alineamiento	Dependiendo del neuropéptido, ver tabla 3.	30 s
	Extensión	72° C	45 s
Extensión final		72° C	5 min

Extracción de proteínas

Las muestras se lisaron utilizando el buffer de lisis (Tris-HCl pH 7.4; triton x-100 0.1%; deoxicolato de sodio 0.1%; SDS 0.1%; NaCl [150 mM]; EDTA [1 mM]) e inhibidores de fosfatasa (PhosStop) y proteasas (Complete Mini). Las muestras homogenizadas se colocaron en agitación por 30 min a 4°C y posteriormente se centrifugaron a 18700 g por 20 min, a 4°C. Se recuperó el sobrenadante.

Cuantificación de proteínas por Bradford

La cuantificación de proteínas se realizó en microplaca (round 96, COSTAR) y fue preparada una curva estándar por triplicado, con una solución de albúmina de suero bovino (BSA 1 µg/µl) para obtener las siguientes concentraciones de proteína: 0 (blanco), 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 µg/µl. Se ocuparon diluciones seriadas para las muestras (1:2, 1:4, 1:6 y 1:8). Posteriormente se añadió el colorante de Bradford (Bio Rad) a cada pozo y después de 5 min a temperatura ambiente, se midieron las absorbancias a 595 nm. Se trazó la gráfica de la curva patrón y mediante la ecuación de la recta se calcularon las concentraciones.

Detección de neuropéptidos por WB

Las proteínas obtenidas, se separaron mediante la técnica de electroforesis unidimensional con el sistema SDS-PAGE de Laemmli (1970). Se usaron geles de acrilamida al 12%. las proteínas fueron desnaturalizadas con calor y β-mercaptoetanol (este último para romper los puentes disulfuro). Se corrió la electroforesis a 80 V durante 15 min y luego a 120 V durante una 1.5 h.

Las proteínas se transfirieron a membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad) a 300 mA por 2 h y se tiñeron con rojo de Ponceau para comprobar la transferencia de las proteínas. El bloqueo de las membranas se realizó con la solución PBS 1X, leche 5% por 2 h en agitación constante y a temperatura ambiente.

Para la inmunodetección de los péptidos se incubaron las membranas con el anticuerpo primario se toda la noche en agitación constante a 4 °C y posteriormente la membrana se lavó tres veces con PBS 1X, Tween 20 al 0.3% durante 10 min en agitación. Se agregó el anticuerpo secundario correspondiente y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente y después se lavó la membrana 2 veces con una solución de PBS 1X, Tween 20 0.3 %. El tercer lavado se hizo con PBS1X durante 10 min. —la información sobre lo anticuerpos se encuentra en la tabla 4—. Para la detección por quimioluminiscencia se utilizó el Luminata Forte Western HRP substrate (Merck Millipore).

Para la detección de β-Actina en la misma membrana, se realizaron tres lavados con PBS 1X, Tween 20 0.3 % en agitación durante 10 min y se continuó con la inmunodetección, dejando el anticuerpo

primario una 1 h a temperatura ambiente y en agitación constante. Posteriormente se añadió un anticuerpo secundario y se incubó por 2 h a temperatura ambiente.

Tabla 4. Especificaciones de los anticuerpos.

Anticuerpos primarios			
Anticuerpo	Proteína	Dilución en PBS1x, leche al 1%, tween 20 0.1%.	No. De catálogo
Anti-POMC	POMC	1:1000	ab94446
Anti-CART	CART	1:1000	ab213617
Anti-NPY	NPY	1:1000	ab180809
Anti-AgRP	AgRP	1:1000	ab194645
Anti-β Actina	β Actina	1:1000	ab8224
Anticuerpos secundarios			
Anti-Mouse	Mouse IgG	1:5000	ab6728
Anti-Rabbit	Rabbit IgG	1:5000	ab6721
Anti-Rat	Rat IgG	1:1000	ab6734

Determinación de $[Ca^{2+}]_i$

Un día antes de la determinación de la concentración de Ca^{2+} intracelular, las células se cambiaron a medio de ayuno (DMEM con 1% de SFB). Las células fueron incubadas con 2.5 μ M de Fura-2/AM durante 2 h. Las células se tripsinizaron para despegarlas del plato de cultivo y se lavaron tres veces para eliminar el FURA no incorporado. La medición de $[Ca^{2+}]_i$ se hizo en solución buffer Krebs-Ringer-HEPPES-glucosa con 0.05% de BSA a 37 °C en agitación continua, en un espectrofluorómetro. Los registros se hicieron cada 0.5 s a 340 nm y 380 nm de excitación y 510 de emisión, la concentración intracelular de calcio se calculó según Grynkiewicz²⁷ utilizando el software de PRISMA. Se evaluaron los estímulos extracelulares de epinefrina, norepinefrina, orexina A, NPY, y galanina.

Determinación de STAT3 fosforilado

Las células fueron cultivadas en placas de 6 pozos con medio DMEM y 10% de SFB a 37 °C. Se dejaron en ayuno por 12 h y posteriormente fueron estimuladas con leptina [1×10^{-6} M] en diferentes tiempos: 0, 5, 10, 15, 30, y 45 min a 37°C. Para la determinación de STAT3 total y fosforilado, se empleó el kit "STAT3 (pY705) + total STAT3 Elisa kit (abcam ab126459)". Este kit se basa en el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas *in vitro* para la medición de STAT3 pY705 y STAT3 total en células lisadas. Los 96 pozos de la placa están recubiertos por un anticuerpo pan STAT3. Las muestras son pipeteadas en los pozos y el STAT3 presente en las muestras se une al pozo por el anticuerpo inmovilizador. Los pozos son lavados y se agrega el anti-phospho-STAT3 (Y705) o un anti-total-STAT3 biotinilado, para detectar ya sea STAT3 fosforilado o STAT3 total. Los anticuerpos secundarios fueron HRP-conjugated anti-rabbit IgG o el HRP-streptavidin. El sustrato revelador fue TMB y uso H2SO4 2 M para detener la reacción. La lectura fue a 450 nm.

Determinación de AMPc

Las células C1 fueron cultivadas en placas de 6 pozos con medio DMEM y 10% de SFB a 37 °C. Se dejaron en ayuno por 12 h y posteriormente fueron estimuladas con Orexina A [100 nM] y forskolin

[10 μ M] por 10 min a 37 °C. Los niveles de AMPc fueron determinados usando el kit de AMPc (Cyclic AMPc ELISA Kit. Item No. 581001) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. La detección de la densidad óptica (OD) para cada tratamiento se realizó de inmediato en un lector de microplacas configurado a 405 nm con una corrección de longitud de onda establecida en 570 nm.

Secuenciación Sanger

Los transcritos de los neuropéptidos identificados se purificaron de gel usando el kit QIAquick Gel Extractin kit (Qiagen) y se secuenciaron en la Unidad de Secuenciación del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN).

Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron en el programa Prism 8 (GraphPad). La comparación del cambio en el patrón de expresión de neuropéptidos, tanto en la condición de diferente concentración de glucosa como en el efecto del tipo de SFB, se analizaron mediante una t de student para muestras independientes, con un nivel de significancia (σ) del 0.05%.

RESULTADOS

Obtener el modelo celular POMC/CART, implicó en primera instancia, la separación de las dos poblaciones involucradas en la regulación de la homeostasis energética. Posteriormente, se identificó el fenotipo del modelo celular mediante la detección de la expresión de los mRNAs y las proteínas correspondientes a los neuropéptidos POMC y CART.

Además, se monitoreo la actividad de algunos receptores característicos de este tipo de neuronas, para evaluar si nuestro modelo *in vitro* reproducía las características de la población neuronal *in vivo*.

Obtención de clones de la línea celular CLU 507 mHypoA-kiss/GFP-3

Se realizó la separación celular de la línea CLU507 mHypoA-kiss/GFP-3 mediante citometría de flujo, con la finalidad de obtener poblaciones celulares provenientes de una única célula (Figura 4. A).

Para asegurar que no existían diferencias morfológicas entre las poblaciones de la línea celular 507 C1 (es decir que se trataba de una población homogénea), se determinó su tamaño y complejidad, celular mediante los parámetros de dispersión FSC y SSC.

La Figura 4 B1 muestra que se trata de una línea celular con una población homogénea, con tamaños y complejidad celular similar. La complejidad celular incluye: granularidad, estructuras, organelos celulares, membranas citoplasmáticas y la rugosidad de la superficie celular.

Además de estos parámetros, también se evaluó la relación FSC-A vs FSC-H para discriminar entre células únicas (singletes) o células dobles (doublets). Esto aumentó la probabilidad de tener una única célula por pozo.

El histograma B3 muestra el umbral que se estableció para omitir señales de desechos o ruido electrónico. El umbral se fijó con el parámetro FSC y la fluorescencia de las células emitida por el marcador GFP-3.

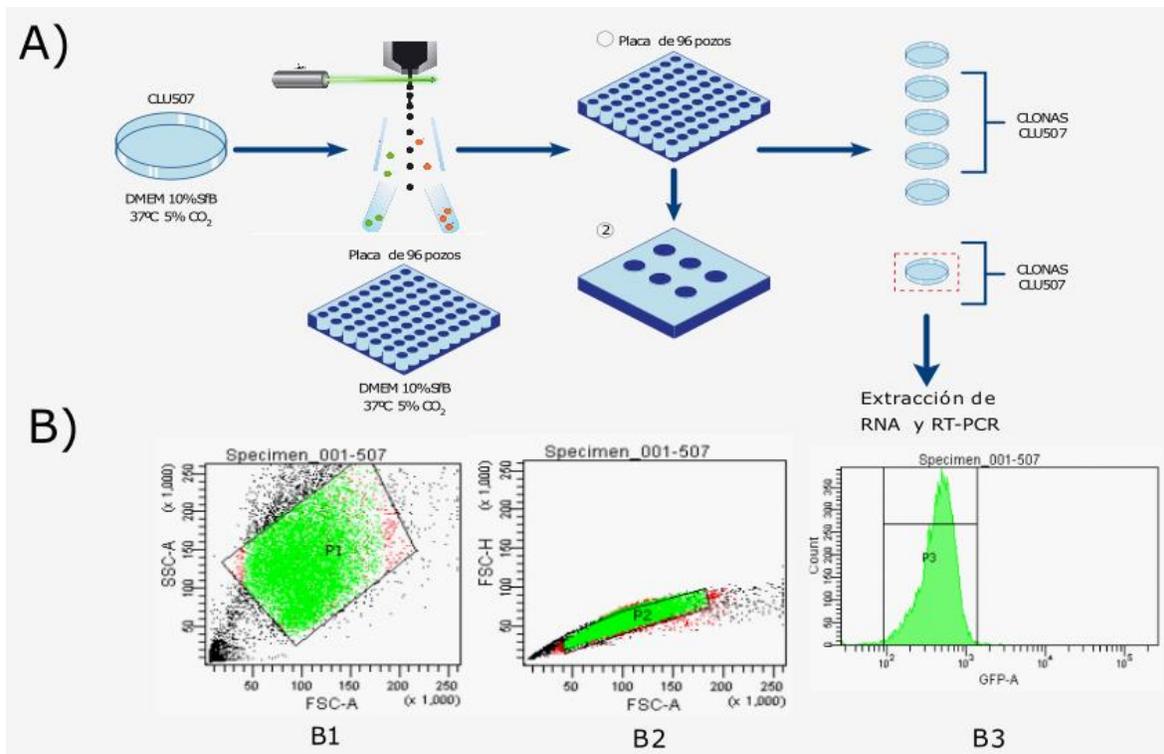


Figura 4. Aislamiento de clones por citometría de flujo. A) Procedimiento seguido para la obtención de clones de célula única, de la línea CLU 507 mHypoA-Kiss/ GFP-3. Las células fueron cultivadas con DMEM 10% de FBS, a 37° C, con 5% de CO₂. Después de obtener una adecuada confluencia fueron separadas mediante citometría de flujo, en placa de 96 pozos. Después de registrar la duplicación de las células en cada pozo, las células se pasaron a placas de cultivo con una superficie mayor, primero en placas de 6 pozos y después en placas con un área de crecimiento de 56.8 cm² (todo esto, para expandir las clones obtenidas). **B)** Datos de las características medias de toda la población celular CLU 507 mHypoA-Kiss/ GFP-3. Los histogramas muestran la información sobre: **B1)** El grado celular de diferenciación dentro de una población heterogénea, mediante la medición de los parámetros FSC y SSC. Las células más pequeñas aparecen en la parte izquierda y las más grandes en la parte derecha. **B2)** La discriminación de dobletes por la correlación entre los parámetros FSC-H y FSC-A. Las células que se encuentran cerca de la diagonal tienen una mayor probabilidad de ser separadas célula única. **B3)** Selección de células que presentan GFP-3. SSC, dispersión lateral o side scatter; FSC, dispersión frontal o forward scatter; C count, recuento de células; FSC-H, altura de la dispersión lateral o forward scatter height; FSC-A, área de la dispersión lateral o forward scatter area.

Expresión de neuropéptidos de las clones obtenidas

Para determinar el fenotipo de las clones obtenidas se analizó el patrón de expresión de los transcritos pertenecientes a los cuatro neuropéptidos característicos de estas poblaciones celulares, a partir de RT-PCR.

En todas las clones evaluadas se observó la presencia de los transcritos maduros de POMC (132 pb) y CART (267 pb), mientras que para NPY no se observó ningún transcrito y en AgRP se muestra una banda inusual con tamaño aproximado de entre 600 y 700 pb, dicha banda no tiene el tamaño esperado del transcrito maduro (297pb) (Figura 5 A).

Este resultado mostro que el fenotipo —a nivel de transcritos— de las clones analizadas era POMC/CART. Lo cual cuestionó la heterogeneidad de la línea celular CLU 507, por lo que se evaluó el patrón de expresión de los neuropéptidos POMC y AgRP (los más representativos), tanto en esta línea celular 507 como en una línea celular establecida a partir de todo el hipotálamo, llamada CLU

505. Los resultados concuerdan con el fenotipo observado en las clonas; se observa la presencia del transcrito maduro de POMC, así como la banda inusual para el transcrito de AgRP (Figura 5 B).

Los resultados anteriores sugerían que el fenotipo observado era propio de las líneas celulares por lo que se buscó analizar el patrón de expresión de los 4 neuropéptidos en hipotálamo de ratón, con la finalidad de conocer si el patrón de expresión era propio de las líneas celulares o también se presentaba en hipotálamo. La figura 5 C muestra de detección de los transcritos de los cuatro neuropéptidos en hipotálamo de ratón, se observan los transcritos maduros de POMC (132 pb) y NPY (294 pb) así como dos bandas de CART correspondientes a sus dos variantes (variante 1 de 264 pb y variante 2 de 351 pb), el transcrito maduro de AgRP (297 pb) y lo más importante, una banda de una longitud similar a la obtenida en el transcrito AgRP en las clonas analizadas.

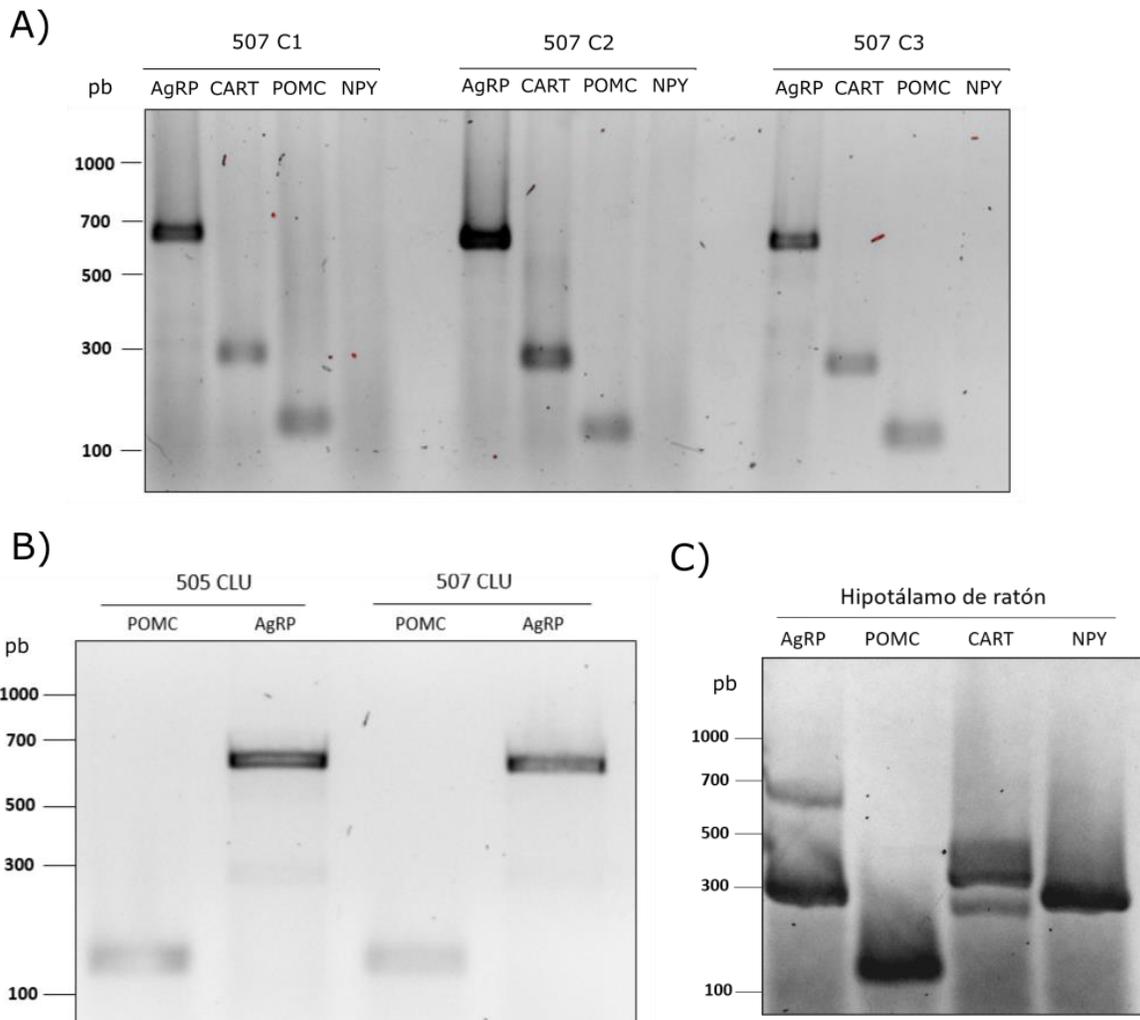


Figura 5. Patrón de expresión de los cuatro neuropéptidos en cultivos monoclonales de células CLU507. A) Las tres colonas evaluadas muestran el mismo patrón de bandas, caracterizado por la presencia de POMC (132 pb) y CART (267 pb), la ausencia tanto de AgRP maduro (297 pb) como de NPY (294 pb) y la presencia de una banda inusual en el transcrito de AgRP (aprox. entre 600 y 700 pb). pb= pares de bases. B) Patrón de expresión de los transcritos de POMC y AgRP en las líneas celulares CLU 507 mHypoA-Kiss/GFP-3 y CLU 505 mHypoA-Kiss/GFP-3. C) Patrón de expresión de los neuropéptidos maduros de POMC (132 pb), CART (variante 1 con 264 pb, variante 2 con 390 pb), NPY (294 pb) y AgRP

(297 pb), además de la obtención de la banda inusual de AgRP (aprox. entre 600 y 700 pb), en tejido hipotalámico de ratón.

Dado que el patrón de expresión de los neuropéptidos (a nivel de transcritos) no presentó diferencias entre las clonas obtenidas y la línea celular de la que se partió, resultaba innecesario continuar con el análisis de las colonas restantes, razón por la cual, para continuar con el análisis del fenotipo se seleccionó de manera aleatoria una de las clonas y se nombró como 507C1 —507, por la línea celular de origen y C1 por ser la primera analizada.

Las células 507C1 presentan un transcrito inmaduro de AgRP

El transcrito inmaduro de AgRP (que retiene los intrones) tiene una longitud de 635 pb, longitud similar a la banda observada en el carril correspondiente a AgRP. Para comprobar que el amplificado de AgRP corresponde a su transcrito inmaduro se realizó una digestión enzimática (como prueba preliminar), usando la enzima de restricción *HindIII* que tiene un único sitio de corte dentro del transcrito inmaduro de AgRP y genera dos productos de 267 y 368 pb. En la figura 6 A, se observan las dos bandas esperadas, así como un producto de 635pb correspondiente a la banda sin digerir.

Para probar qué producto inmaduro de AgRP provenía del mRNA y no de contaminación por DNA genómico (DNAg), se realizó una transcripción reversa utilizando un oligo dT en la reversotranscripción para identificar solo los transcritos poliadenilados, además se usó un control sin la retrotranscriptasa. Lo que obtuvimos fue un producto de aproximadamente 800 pb que corresponde al amplificado esperado con el oligo reverse Anchor de 813 pb, ambos controles evidenciaron que se trata de un mRNA poliadenilado y no de un producto por contaminación con DNAg (Figura 6. B).

Para comprobar que el producto obtenido de la amplificación con oligo reverse Anchor se trataba del mRNA de AgRP que retenía los intrones (lo llamaremos inmaduro en adelante), se mandó secuenciar por el método de Sanger. Con la secuenciación se confirmó que tanto las clonas como las líneas celulares CLU 505 y 507 presentan un transcrito inmaduro del transcrito del neuropéptido AgRP. En la figura 6 C, se muestra fragmentos representativos de la secuenciación que corresponden a zonas de splicing, entre cada exón e intrón. Al final del exón 4 se encuentra el sitio de corte de *HindIII*, en el fragmento de la secuenciación este indicado dicho sitio.

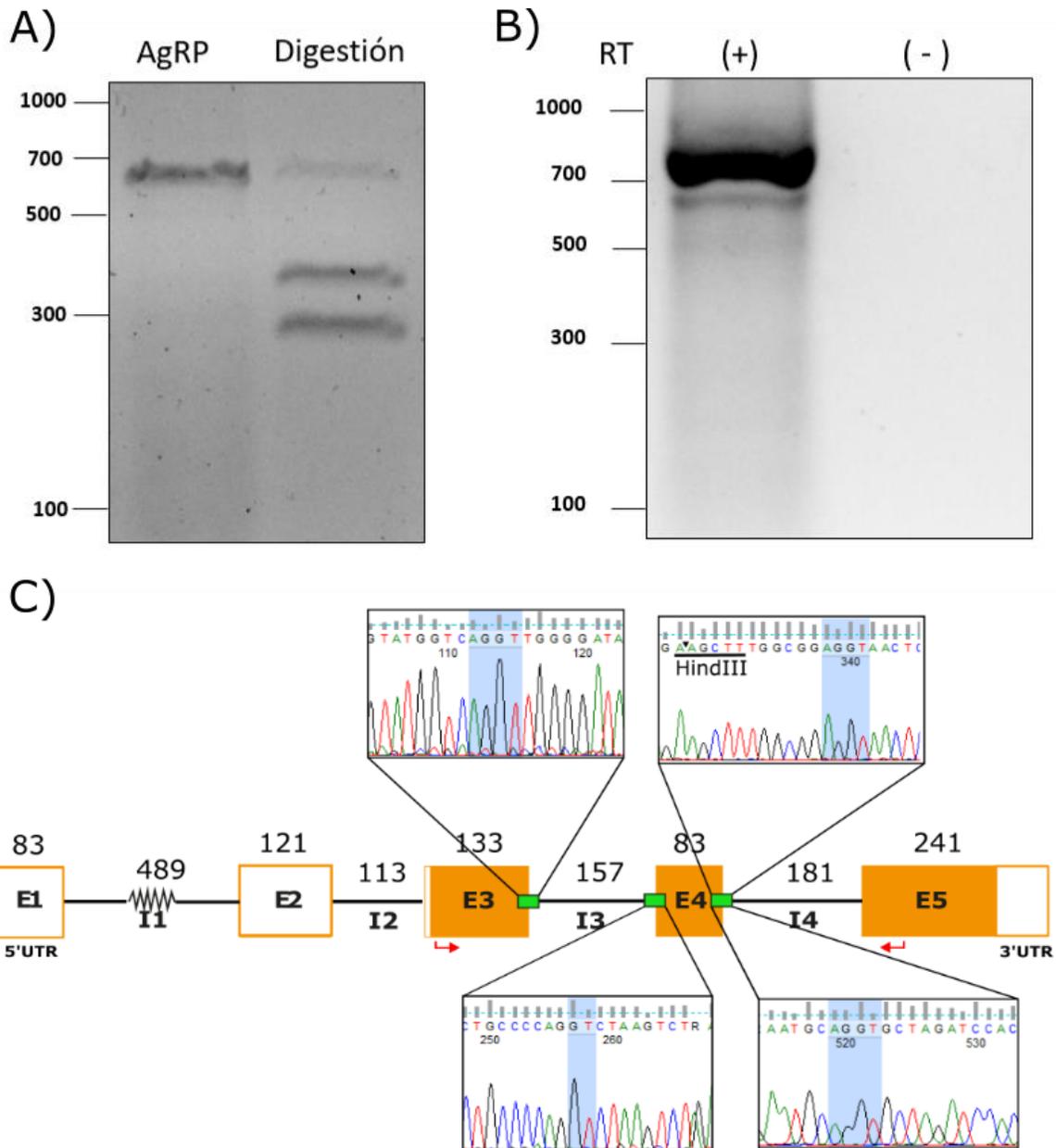


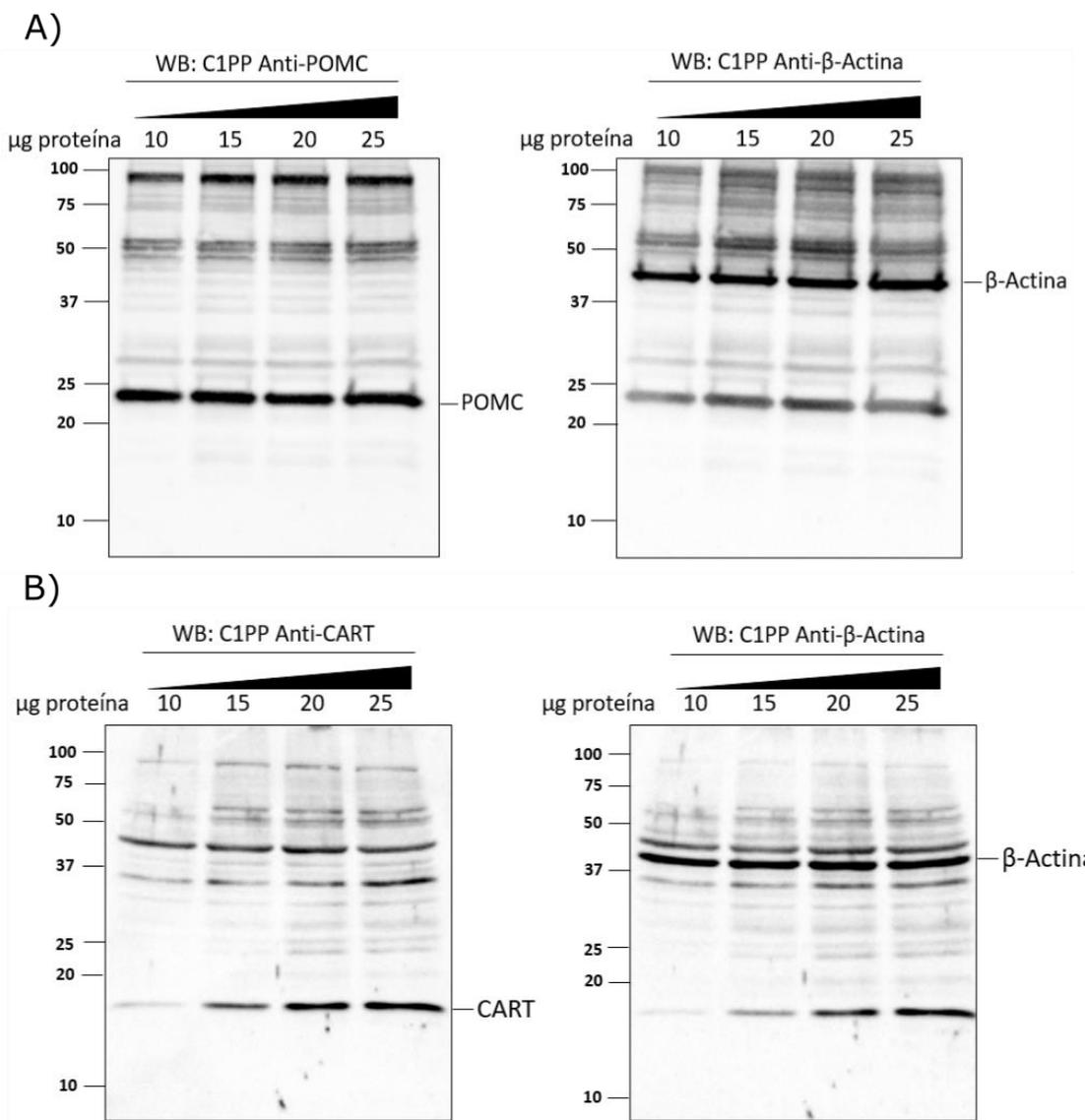
Figura 6. Confirmación de la presencia del transcrito inmaduro de AgRP en la clona 507 C1. **A)** Digestión enzimática de AgRP inmaduro con *HindIII*, en el primer carril se muestra el fragmento inmaduro de AgRP —de 635pb, en el segundo se observan los productos —de 267 y 368 pb— de la digestión enzimática con *HindIII*. **B)** Prueba con y sin RT. **C)** Secuenciación del fragmento purificado de AgRP inmaduro. Los extremos 5'UTR y 3'UTR son representados por recuadros blancos, la región codificante es representada con los recuadros naranja, los intrones son rallas negras y los sitios donde ocurriría el splicing de los intrones se encuentran señalados con recuadros verdes. Las flechas rojas representan la posición de los primers. Dentro de la ampliación de la secuencia correspondiente al tercer sitio de splicing se resalta el sitio de corte de la enzima *HindIII*.

La clona 507C1 expresa la proteína de POMC y CART

La presencia de los transcritos no asegura que las células estén traduciéndolos a la proteína, por lo que el fenotipo POMC/CART se comprobó mediante la inmunodetección de la proteína para ambos neuropéptidos.

Logramos detectar la proteína tanto de POMC (23 KDa) como de CART (14 KDa) en extractos de proteína total, que van desde los 10 a los 25 μg de proteína total; esta curva de concentración se realizó para tener una noción de la cantidad de proteína de la que podíamos partir (la extracción de células cultivadas en cajas de 60 mm de diámetro por 15 mm de altura) para tener una buena detección de los neuropéptidos. Lo que obtuvimos fue que los neuropéptidos se pueden identificar claramente con 10 μg de proteína total (Figura 7. A, B).

Además de probar la presencia de los dos neuropéptidos que habíamos identificado a nivel de transcrito maduro, también se buscó la inmunodetección de AgRP —del que solo se había visto el transcrito inmaduro— y NPY. Como era de esperarse, no se detectó la presencia de la proteína para ninguno de ellos (Figura 7. C, D).



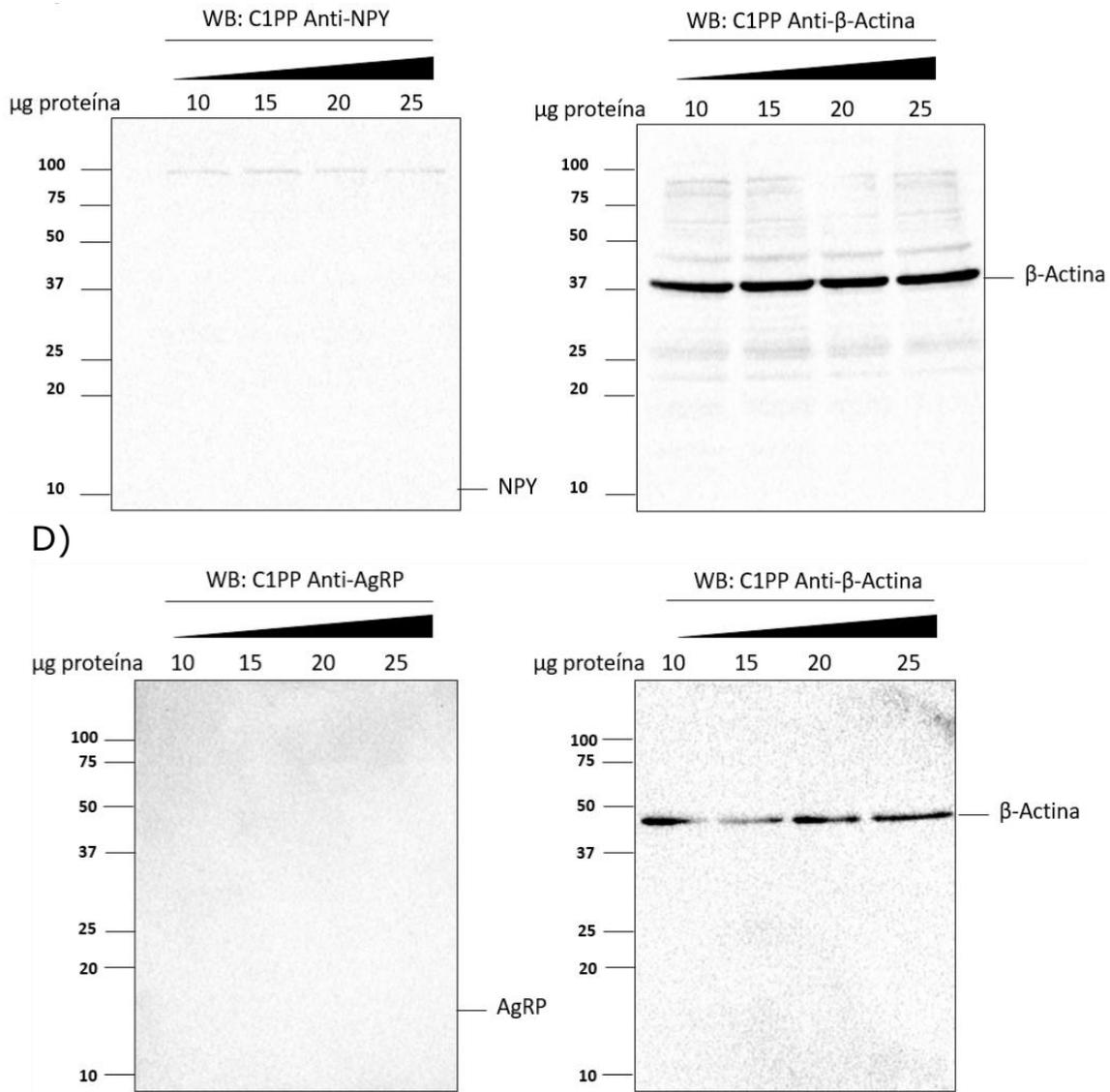


Figura 7. Inmunodetección de CART y POMC en células 507C1. A-B) Detección de POMC (23 KDa) y CART (17 KDa) en los extractos de proteína de células 507C1 cultivadas en placas con una área de crecimiento de 56.8 cm² y con medio suplementado con SFB Performance Plus. **C-D)** Membranas de para la detección de AgRP (14 KDa) y NPY (11 KDa). En ambas membranas no se detectó la presencia de los neuropéptidos, solo se detectó β -Actina. β -Actina se usó como control de carga en todas las membranas. Se usaron las mismas condiciones de cultivo celular que para los neuropéptidos POMC y CART.

Las células 507 C1 responden a norepinefrina y NPY.

Está bien establecido que tanto las neuronas POMC/CART como las AgRP/NPY tienen la función de regular la homeostasis energética, mediante la recepción, integración y transducción de señales periféricas de múltiples hormonas y nutrientes, además de otras moléculas.

Como parte de la caracterización del modelo celular, se evaluó la respuesta que presentaban las células 507 C1 (fenotipo POMC/CART) frente a estímulos hormonales como: norepinefrina y neuropéptido Y.

Para evaluar la presencia de receptores para norepinefrina y NPY, se determinó la movilización de $[Ca^{2+}]_i$. Se emplearon como controles de la movilización de Ca^{2+} intracelular, ATP 10 μ M y LPA 1 μ M.

Las células respondieron a 100 μ M norepinefrina y 1 μ M NPY, lo que sugirió la presencia y la actividad de receptores adrenérgicos y de receptores Y (Figura 8).

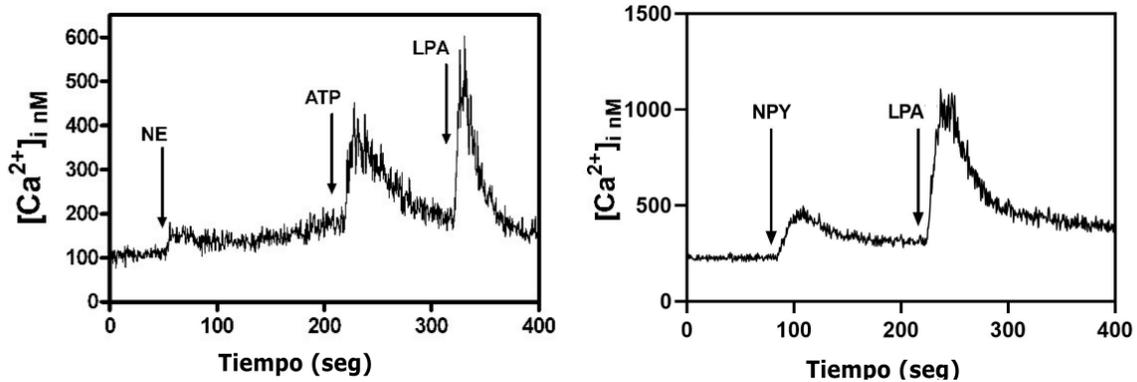


Figura 8. Respuesta de las células 507 C1 a estímulos hormonales: Las células 507 C1 fenotipo POMC/CART, estimuladas con 1×10^{-4} M de Norepinefrina (NE), gráfica izquierda y con 1×10^{-6} M de neuropéptido Y (NPY), gráfica de la derecha. El ATP 10 μ M y LPA 1 μ M fueron usados como controles.

Evaluación de la estabilidad del fenotipo de las células 507C1.

La concentración de glucosa no modifica el fenotipo de las células 507C1

Los resultados anteriores confirman la presencia del fenotipo POMC/CART y el transcrito inmaduro de AgRP, tanto en todas las clonas analizadas (incluida la 507 C1), como en la población celular de NARc que les dio origen (CLU 507), e incluso en la línea celular proveniente de hipotálamo completo (CLU505). Se trata de poblaciones que a pesar de que se esperaba que presentaran diferentes fenotipos, solo presentaban uno.

En la búsqueda de una posible explicación para estos resultados, lo primero que se investigó fue si el fenotipo POMC/CART maduro e inmaduro para AgRP, podría estar siendo determinado por la concentración de glucosa. Para estudiar esto, las células 507C1 fueron cultivadas con medio baja en glucosa (0.5 mM) por 2 meses, sin embargo, después de varias pruebas no encontramos cambios entre las células cultivadas con baja glucosa y las células control (cultivadas con medio alta glucosa, 25 mM) (Figura 9).

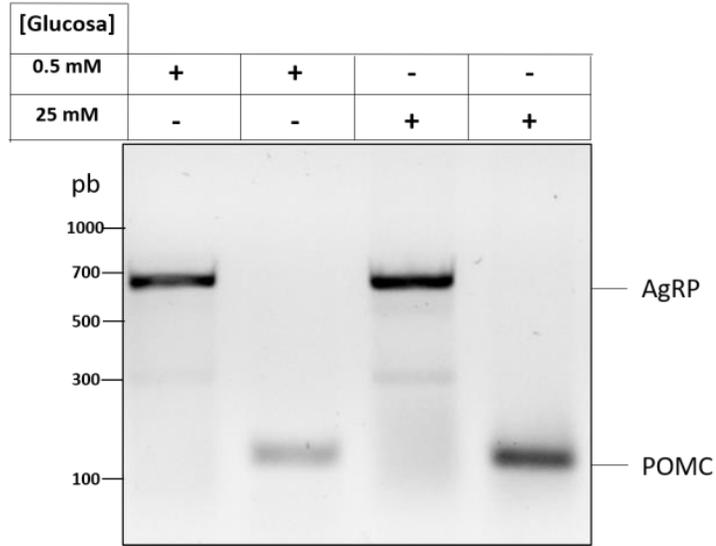


Figura 9. Células 507 C1 con el mismo fenotipo en presencia de alta y baja glucosa. Se evaluó la presencia de los péptidos POMC y AgRP en la clona 507C1 cultivada con medio bajo en glucosa, 0.5 mM. Como control se usó la clona 507 C1 con el medio de uso común, enriquecido en glucosa, 25 mM. El análisis de la D.O. de cada banda (n=4) indica que las células no presentan un cambio significativamente mayor para los patrones de expresión de POMC con alta y baja glucosa ($t(6)=0.20$, $p>0.05$). Se observó lo mismo para los patrones de expresión de bandas de AgRP (n=4) en presencia de concentración alta o baja de glucosa ($t(6)=0.797$, $p>0.05$).

Las células 507 C1 presentan cambios en su fenotipo

Dado que los niveles de glucosa usados no modificaron el fenotipo de las células, éstas continuaron en cultivo con medio DMEM enriquecido en glucosa. Sin embargo, después de aproximadamente 3 meses en cultivo se observó un patrón de expresión distinto al que se había detectado inicialmente, ya que, los transcritos amplificados de POMC y CART eran menos evidentes, mientras que para AgRP se presentaba dos amplificadas correspondientes al transcrito maduro (297 pb) y al inmaduro (635 pb), el inmaduro se observa con menor intensidad a la reportada anteriormente (Figura 10.).

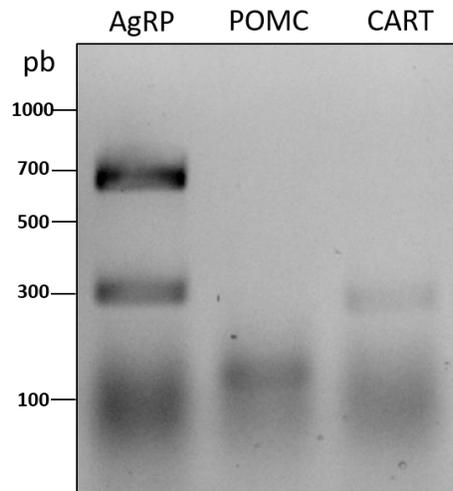


Figura 10. Coexpresión de AgRP y POMC. Después de 90 días de cultivo las células presentan una coexpresión de AgRP y POMC. El fragmento esperado para la forma madura de AgRP es de 300 pb. La banda de POMC de 132 pb aún es observada al igual que el amplificado de CART, pero con menor intensidad.

En este punto las células de la clona 507C1 habían cambiado su fenotipo a POMC⁺/AgRP⁺, es decir neuronas doble positivas para los fenotipos antagónicos.

Sin embargo, este fenotipo no se mantuvo estable por mucho tiempo ya que se evidencio otro cambio en las células que indicaba que el fenotipo había cambiado a AgRP⁺/POMC⁻ (Figura 11). En este último fenotipo se ve claramente el amplificado maduro, mientras que el inmaduro prácticamente desaparece, además de que POMC y CART dejan de amplificarse.

Estos resultados mostraron que las células 507C1 tenían variaciones en su fenotipo, lo que sugería la presencia de algún estímulo capaz de inducir el cambio en los patrones de expresión de los neuropéptidos.

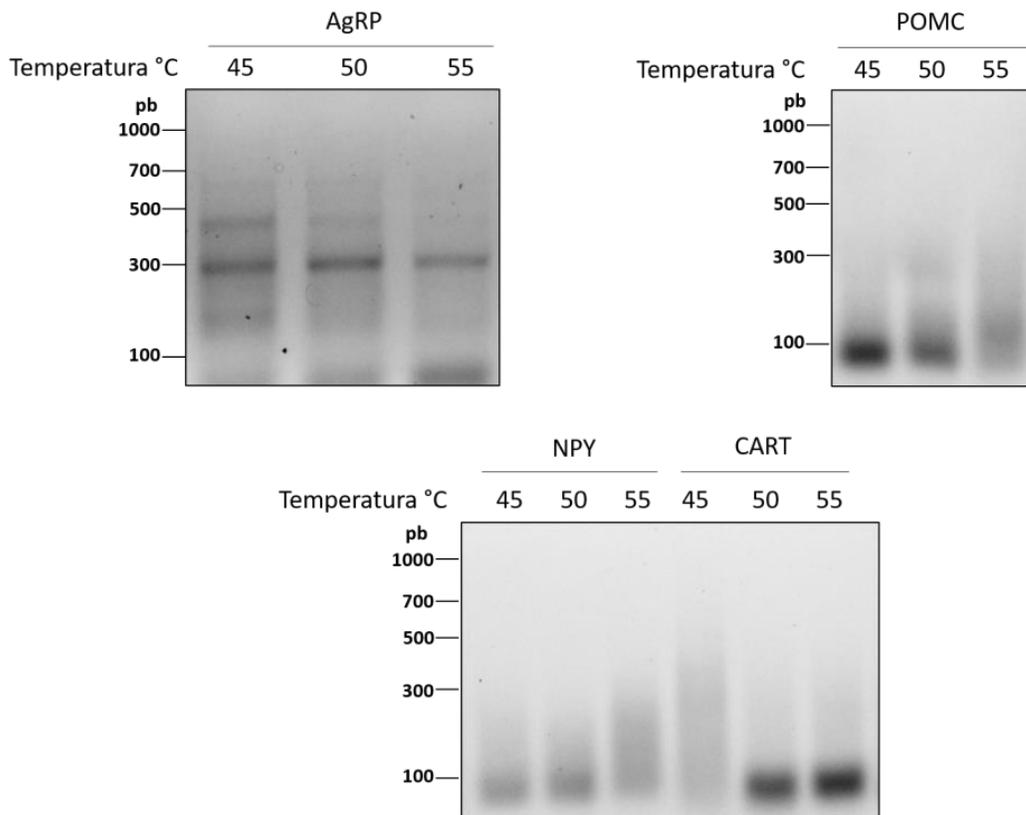


Figura 11. Fenotipo AgRP de las células 507C1. Se realizó un PCR de gradiente con el mismo rango de temperaturas que va de 45°C a 55°C para los cuatro neuropéptidos. Se muestran bandas correspondientes con el transcrito maduro de AgRP (297 pb). No se obtuvieron las bandas esperadas de POMC (132 pb), NPY (294 pb) y CART (264 pb).

Haciendo una recopilación, podemos decir que las células 507C1 han pasado de ser POMC/CART y POMC⁺/AgRP⁺, a ser ahora AgRP.

Revisión de los procesos de diferenciación de las células de NArc.

En la búsqueda de una explicación para los cambios de fenotipo que presentaron las células 507C1, se investigaron diferentes protocolos de diferenciación de células de NArc, ya sea a partir de células madre embrionarias (hESC) o de células madre pluripotenciales inducidas (iPSC), además de los posibles factores involucrados en la diferenciación a cada uno de los fenotipos, destacándose los

microRNAs como los principales factores que influyen en la expresión de los diferentes fenotipos para las células neuronales POMC/CART y AgRP/NPY del NArc.

El resultado del análisis e integración de los diferentes protocolos de diferenciación, permitió establecer un esquema que resume los principales factores de transcripción involucrados con la obtención de células hipotalámicas y posteriormente las poblaciones de NArc correspondientes a POMC/CART y AgRP/NPY. Además, el esquema aporta los rangos de tiempos del uso de los factores de transcripción, el tipo de progenitor obtenido tras cada factor usado, los porcentajes de las poblaciones de NArc obtenidas en determinado tiempo y algunos microRNAs que se han reportado involucrados con la expresión de los fenotipos (Figura 12).

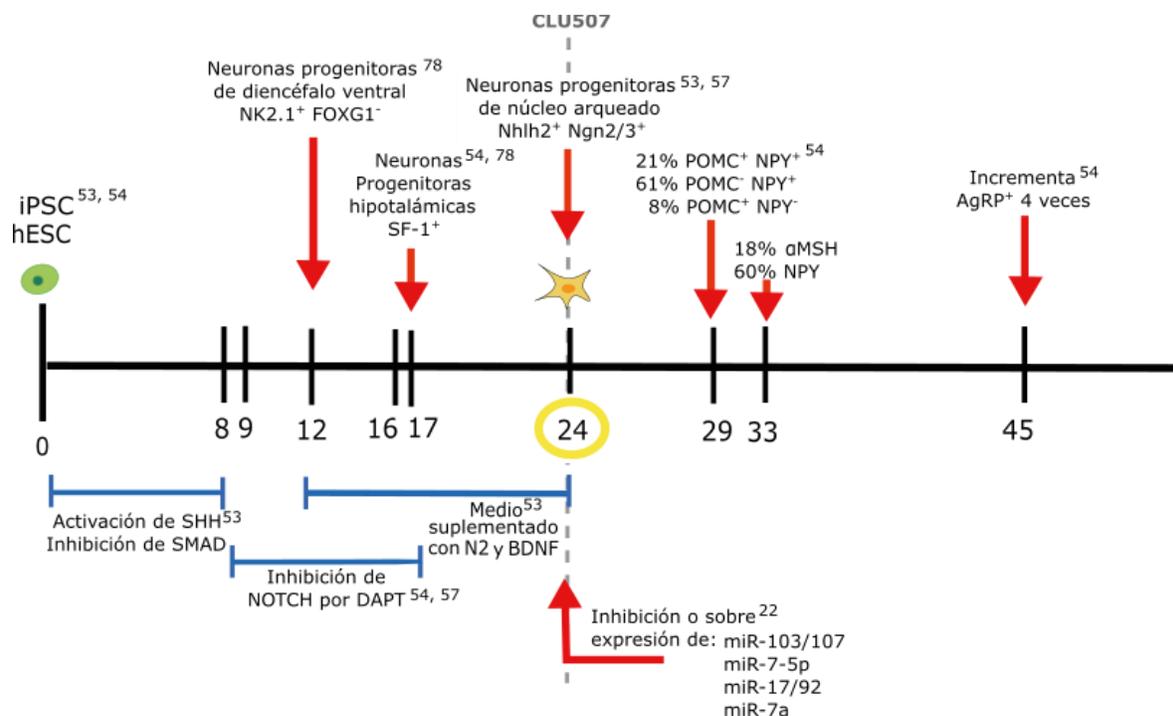


Figura 12. Resumen gráfico de las condiciones para la diferenciación de las células de NArc a partir de células madre embrionarias (hESC) o de células pluripotenciales inducidas (iPSC). Se muestra en negro: 1) las acotaciones que señalan los diferentes tratamientos y su duración –inhibición o estimulación de vías. 2) los números indican el número de días desde el inicio del protocolo de diferenciación. 3) las flechas indican el grado de diferenciación de las células según los diferentes marcadores que expresan.

El tipo de SFB no promueve cambio en los patrones de expresión en las células 507C1.

Como se observó en el esquema anterior, tanto los factores de transcripción como los microRNAs son fundamentales para determinar el fenotipo de las poblaciones celulares del NArc. Entre las condiciones de cultivo uno de los elementos que representa una especie de caja negra—por lo poco caracterizado de sus componentes, es el SFB. Se sabe que tiene una gran cantidad de factores de transcripción además de microRNAs, sin embargo, no se sabe con precisión sus concentraciones reales. En fechas recientes, ha surgido la controversia de si los microRNAs presentes en el SFB que son idénticos a los humanos—condición que se cumple para miR-103/107, miR-17/92, miR-7-5p y miR-7a, pueden estarse transfiriendo a las células en cultivo y tener efectos biológicos. Además, por resultados obtenidos en el laboratorio, sabemos que las diferentes marcas de SFB difieren en las especies y concentraciones de microRNAs que contienen; por lo que nos planteamos la pregunta de

si el tipo de SFB usado en cultivo podría tener alguna relación con el cambio de fenotipo de las células POMC⁺ a AgRP⁺

Como una primera aproximación y para reducir el número de fenómenos analizados con esta condición, se estudió de manera particular lo que ocurría con los transcritos maduro e inmaduro de AgRP.

Las células 507C1 fueron cultivadas con SFB Performance Plus y SFB Biowest. El primer resultado observado (después de 2 semanas en cultivo) mostró que las células expresaban ambos transcritos, tanto el inmaduro como el maduro, en ambas condiciones, por lo que se hicieron 10 duplicados biológicos para evaluar si los cambios observados entre la detección de los transcritos en cada tipo de suero eran significativos. Los resultados estadísticos hacen evidente que los cambios no son significativos ($p > 0.05$).

Estos resultados no señalan al SFB como el causante del cambio de fenotipo, sin embargo, tampoco nos permiten descartar absolutamente que algún componente —presente en forma inconstante entre lotes de SFB, pudiera ser el responsable. Es claro que existe una variable involucrada con el cambio de los patrones de expresión de los transcritos que no logramos determinar (Figura 13 A, B).

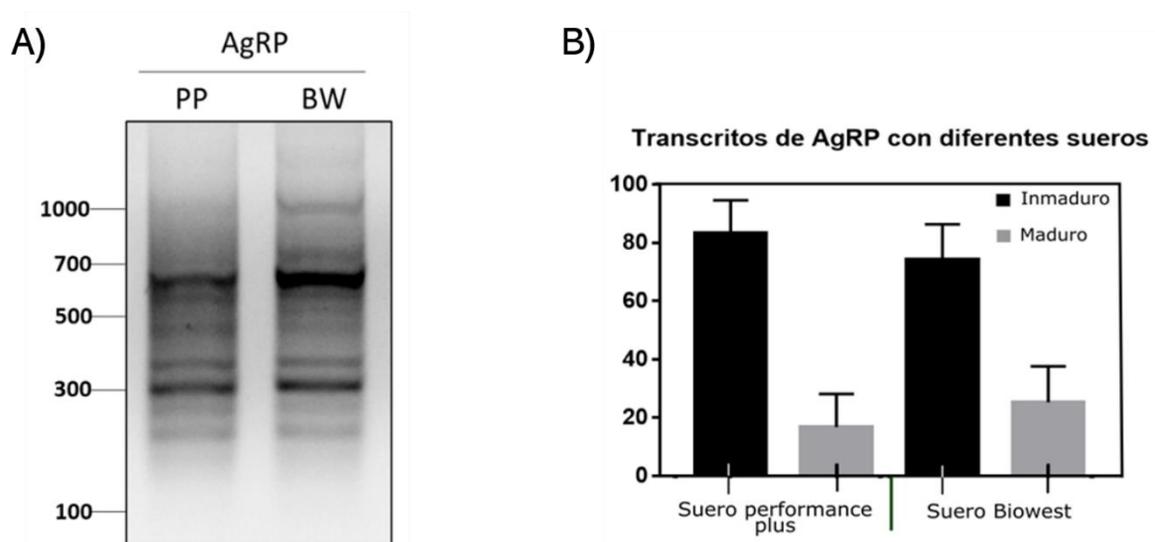


Figura 13. Detección del transcrito maduro e inmaduro de AgRP en células 507 C1 cultivadas con SFB PP y BW. En el panel A) Gel representativo de uno de los 9 duplicados que se realizaron para evaluar la posible relación entre el tipo de SFB usado y la detección de los amplificadores de AgRP. Los primeros dos carriles corresponden a los amplificadores obtenidos con primers específicos diseñados para identificar el mRNA de AgRP. Los dos últimos carriles corresponden a los amplificadores obtenidos con un primer forward específico para AgRP (AFa, los primers se encuentran descritos en la tabla 3) y el primer reverse anclor. B) Cuantificación por densitometría de los amplificadores de AgRP de muestras de células crecidas en SFB Performance Plus PP o crecidas en SFB marca Biowest BW. Los valores corresponden a la media expresada en porcentaje de la relación madura e inmadura en cada tratamiento. $p > 0.05$

DISCUSIÓN

La separación por célula única de la línea celular CLU 507 mHypo-kiss/GFP3 proveniente NARc de ratón, mediante citometría de flujo, permitió obtener un modelo celular con fenotipo POMC/CART. Dicho modelo mostro dos características interesantes, la primera de ellas consistió en la presencia de un mRNA centinela de AgRP, mientras que la segunda indica que el modelo celular es capaz de adquirir diferentes fenotipos en función de un estímulo extracelular, dichos estímulos hasta el momento no son los niveles de glucosa o el tipo de SFB. A continuación, discutiremos los resultados que obtuvimos.

Las células CLU 507 fueron separadas por cell sorting a través de citometría de flujo, ya que esta técnica, a diferencia del cultivo primario representaba una ventaja en el tiempo y el uso de recursos.

Esto es debido a que en un cultivo primario las células en general experimentan un número finito de divisiones celulares, tienen una vida útil limitada, e incluso pueden no proliferar en absoluto en cultivo, lo que restringiría la estabilidad del modelo celular. Además, la mayoría de los cultivos primarios se derivan de células o tejidos inmaduros que se diferencian y maduran *in vitro*, lo que implica el uso de factores de transcripción y al final de la diferenciación es difícil obtener cultivos de un único tipo de célula³².

Para prevenir esta limitante usamos la línea celular CLU 507 mHypoA-Kiss/GFP-3 que representa toda la población de neuronas del NARc (neuronas POMC/CART y neuronas AgRP/NPY), esta línea celular fue generada a partir del aislamiento del NARc de un ratón hembra, de 2 meses de edad, con un transgén eGFP controlado por el promotor Kiss-1 (Kiss / GFP).

Los datos obtenidos en el citómetro de flujo (Figura 6. B1 y B2) indican que la población celular CLU 507 no presenta diferencias morfológicas, lo que era de esperarse, ya que, de acuerdo con lo reportado, la única manera de diferenciar las poblaciones celulares del NARc es mediante la identificación de los patrones de expresión y liberación de neuropéptidos^{36, 30}. A causa de esto, las células solo pudieron ser separadas por selección de célula única, bajo el establecimiento de un umbral que se encargaba de omitir señales inespecíficas (Figura 6. B3), lo que aumentaba el porcentaje de éxito en la obtención de clonas provenientes de una sola célula.

En total logramos aislar 20 clonas de las cuales esperábamos encontrar dos tipos de clonas unas con el fenotipo POMC/CART y otras con el fenotipo AgRP/NPY. Sin embargo, tras su análisis encontramos que todas presentaban el fenotipo correspondiente a POMC/CART y además el transcrito de AgRP mostraba un patrón de expresión inusual; se observaba un amplificado que no correspondía a un transcrito maduro, sino que parecía pertenecer a su transcrito inmaduro que retenía al menos los dos intrones (Figura 7. A).

La explicación del resultado anterior sugería dos opciones, la primera de ellas consistía en que el número de las clonas analizadas no representaba un resultado significativo con respecto al total de las clonas obtenidas, pues los resultados correspondían tan solo al 25% de total de las clonas. La segunda opción era la posibilidad de que la línea celular CLU 507 presentara una población homogénea, es decir con un único fenotipo.

Para confirmar o refutar la segunda posibilidad optamos por detener el análisis de las clonas y en su lugar analizar el fenotipo de las células CLU 507, usamos esta estrategia en lugar de la conclusión

del análisis de las clonas ya que nos proporcionaba datos inmediatos y concluyentes. Evaluamos solo los principales neurotransmisores que asignaban el fenotipo, es decir AgRP y POMC.

Lo que esperábamos ver en el análisis del patrón de expresión de los transcritos, de la línea celular CLU 507, era la presencia de todos los transcritos maduros, como prueba de la heterogeneidad de la población. No obstante, el patrón de expresión de los transcritos fue exactamente el mismo que el de las clonas analizadas (Figura 7. B). Lo que indicaba dos cosas importantes: 1) que el resto de las clonas presentaría el mismo fenotipo ya que las células CLU 507 en realidad son una población homogénea y 2) que las CLU 507 no representan en realidad a todo el NARc.

La ausencia del fenotipo AgRP en la línea celular CLU 507 sugiere dos posibles explicaciones. La primera de ellas consiste en que las células, podrían haber sufrido una desdiferenciación caracterizada justo por la pérdida de la expresión de sus principales genes involucrados con el establecimiento de su fenotipo. Además, estudios en los procesos de diferenciación/desdiferenciación de células inmortalizadas mencionan que este tipo de líneas presentan una desdiferenciación progresiva que puede deberse al número de pases en cultivo e incluso a la dilución que se realiza en cada pase^{39, 70}. La segunda explicación de la ausencia de fenotipo AgRP, sugiere la presencia de algunos factores extracelulares involucrados con la inhibición de la expresión del fenotipo AgRP^{22, 49}.

Ahora bien, dado que el objetivo del proyecto era establecer el modelo celular POMC/CART del NARc de ratón, con los resultados anteriores probamos que a nivel de transcrito ya teníamos el fenotipo POMC/CART, lo siguiente que debíamos probar era si estos transcritos eran traducidos y que neuropéptidos expresaba.

Sin embargo, antes de continuar con la identificación de las proteínas, fue necesario explicar el patrón de expresión del transcrito de AgRP dentro del modelo POMC/CART, ya que resultaba interesante la sugerencia de que se trataba del transcrito inmaduro.

Para analizar esto seleccionamos de manera aleatoria una de las clonas aisladas —507 C1, ya que era indistinto trabajar con cualquiera por tener el mismo fenotipo.

La primera aproximación que confirmó que se trataba del transcrito inmaduro de AgRP, fueron los resultados de la digestión enzimática con *HindIII* (Figura 8. A), posteriormente se comprobó que no era un producto proveniente de DNAg (Figura 8. B) pues el uso del oligo dT anchor permitió ver que se trataba de un mRNA poliadenilado. La confirmación final vino con la secuenciación que mostro los fragmentos correspondientes tanto a exones como a intrones (Figura 8. C).

Este resultado indica que la maduración del transcrito de AgRP no sigue los mecanismos convencionales de splicing. Se trata probablemente de un splicing alternativo por retención de intrones (RI), ya que como su nombre lo indica, existe una retención de los intrones en un mRNA maduro⁸¹.

Cabe mencionar que este tipo de splicing trae como consecuencia, en la mayoría de las ocasiones, la degradación de los mRNAs producidos mediante la vía NMD o nonsense mediated decay^{42, 81}, por lo que su identificación resulta difícil³⁵. Sin embargo, el detectar claramente el transcrito, sugiere que probablemente se encuentre retenido y acumulado en el núcleo, evitando así la degradación por NMD que opera en el citoplasma.

El que esto ocurra nos hace suponer que se trata de un mRNA centinela, que está listo para ser procesado y traducido sobre demanda, como respuesta rápida de la célula frente a cambios específicos, lo que permitiría la obtención de proteínas más rápido de lo que se haría en una síntesis *de novo*. De hecho, existen reportes de mecanismos similares durante la neurogénesis⁸³, la diferenciación de granulocitos⁸⁰, la eritropoyesis terminal⁵⁸ y la activación de las células T⁵². Lo anterior sugiere que el transcrito de AgRP presenta una mayor complejidad reguladora.

Además, algunos grupos de investigación han demostrado que el splicing alternativo por IR es un mecanismo conservado (entre varias especies de vertebrados) que afecta genes funcionalmente relacionado en humanos y ratones^{12,67}. No obstante, la conservación solo ha sido demostrada a nivel de tejido como el SNC y el cerebro¹³, pero hace falta un análisis exhaustivo del RI en un tipo celular altamente purificado y funcionalmente definido como el que se obtuvo en este proyecto.

Por otro lado, el fenotipo POMC/CART se confirmó con la identificación de los neuropéptidos POMC y CART mediante su inmunodetección y la ausencia de las proteínas AgRP y NPY (Figura 9.). Era de esperarse que el transcrito AgRP no se detectara dado la RI y los mecanismos que evitan la traducción de este tipo de transcritos (retención nuclear y la vía NMD).

La presencia del mRNA centinela de AgRP en el modelo POMC/CART, planteaba la posibilidad de que el fenotipo migrara de POMC/CART a AgRP como respuesta a una señal extracelular. Por lo tanto, la modificación en los niveles de glucosa representaba una primera aproximación a la prueba de estabilidad de nuestro modelo. Ya que, en primer lugar, se trata de una señal frente a la cual tanto las neuronas POMC/CART como las AgRP/NPY responden, ya sea excitándose (altas concentraciones de glucosa 25 mM conducen a un aumento en la frecuencia de disparo) o inhibiéndose (bajas concentraciones de glucosa 5 mM conducen una disminución en la frecuencia de disparo)⁵⁶. En segundo lugar, el cultivo de la línea celular CLU 507 en medio enriquecido en glucosa, sugiere la principal causa de la presencia de un solo fenotipo (POMC/CART) en la línea celular CLU 507, y probablemente en el modelo celular 507 C1.

La glucosa se ha reportado como un modulador positivo de las neuronas POMC porque su incremento provoca la excitación de las neuronas POMC lo que conduce a la activación de los circuitos neuronales que transmiten la señal de saciedad³⁴. La excitación o activación de las neuronas POMC por alta concentración de glucosa se da por la despolarización de la membrana de POMC y el aumentando su actividad eléctrica^{4,8}.

Por otra parte, también, se ha reportado que niveles altos de glucosa inducen la transcripción de POMC^{5,56} e inhiben la de AgRP¹⁹. Mientras que, bajas concentraciones de glucosa incrementan la expresión del mRNA de AgRP y NPY y reducen la expresión del mRNA de POMC⁵⁰.

Los datos anteriores permiten suponer que la presencia del fenotipo POMC/CART (tanto en el modelo celular 507 C1 como en su línea celular de origen CLU 507) se debe a que las células se cultivaron con medio DMEM enriquecido en glucosa. Sin embargo, ya sea para confirmar la idea anterior o para probar si es posible modificar el fenotipo de las células 507C1, la disminución en el nivel de glucosa representa una primera aproximación para probar que la estabilidad de las células está en función de factores extracelulares.

Los resultados que obtuvimos (Figura 10.) muestran que el cultivo de las células 507 C1 en medio con baja glucosa no genera cambios en el patrón de expresión mRNAs para POMC y AgRP.

Esto indica, de manera preliminar, que el fenotipo de las células 507 C1 permanece estable frente a cambios en la concentración de glucosa, lo que no concuerda con lo reportado, en donde la reducción de los niveles de glucosa hasta 0.5 mM, de células que normalmente se mantienen en DMEM con glucosa de 25 mM, induce progresivamente la expresión de AgRP^{5, 19, 45, 50, 56}. El resultado no asegura que el modelo celular pueda preservar su estabilidad ante este nutriente; ya que, en primer lugar, se desconoce qué tan buena es la señalización intracelular en respuesta al nutriente, es decir, no sabemos si las proteínas y metabolitos involucrados están funcionando de manera adecuada o si presentan alguna modificación que impida su actividad; por ejemplo, el grupo de Parton et al., 2007, ha reportado que una modificación en la sensibilidad de los canales de K_{ATP} hacia el ATP, afecta la tolerancia a la glucosa en neuronas POMC, aumentándola, es decir que a bajas concentraciones de glucosa las neuronas no presentan cambio en su actividad eléctrica. En segundo lugar, suponemos que podrían existir otros factores extracelulares que podrían estar regulando la estabilidad del modelo celular.

Puesto que la glucosa no modificó el fenotipo, las células continuaron en cultivo con medio enriquecido en glucosa y 10 % SFB.

Antes de poder evaluar la influencia de algún otro factor extracelular en la estabilidad de las células 507 C1, obtuvimos dos resultados inesperados (Figuras 11 y 12) que mostraron la migración del fenotipo POMC/CART, al fenotipo AgRP, pasando por un fenotipo intermedio POMC/AgRP⁺.

Ambos resultados indicaron que el fenotipo del POMC/CART de las células 507 C1 podía cambiar y que el transcrito inmaduro de AgRP es procesado. La diferencia entre ellos es que, en el primer cambio de fenotipo (Figura 11.) observamos aún el transcrito de POMC y un procesamiento incompleto del mRNA inmaduro de AgRP —representado por la presencia de ambos transcritos. Mientras que, en el segundo cambio de fenotipo (Figura 12.) ya no observamos el transcrito maduro de POMC, pero si el de AgRP lo que indica un procesamiento completo de su mRNA inmaduro.

Estas diferencias sugieren que debe existir otro nivel de regulación, que sea independiente de los factores de transcripción antagónicos (como STAT3 y FoxO1) a la expresión de los neuropéptidos, pues —como se ve en el primer cambio de fenotipo— la transcripción de uno no inhibe la del otro, contrario a lo que se ha reportado⁷⁷.

Datos similares a nuestros resultados han sido reportados, tanto en protocolos de diferenciación neuronal y neurogénesis hipotalámica^{53, 54, 78}, como en estudios de secuenciación de RNA por célula única⁴³, en donde, se han obtenido poblaciones neuronales que coexpresan ambos neuropéptidos “POMC y AgRP— y son llamadas neuronas doble positivas o POMC⁺/AgRP⁺. Además, se ha reportado que ambas poblaciones neuronales (POMC y AgRP/NPY) tienen un progenitor común con la capacidad de generar fenotipos alternativos^{53, 78}, lo que podría explicar el cambio de fenotipo en las células 507 C1, si estas se encontraran en un estado de desdiferenciación (como habíamos sugerido).

El esquema de protocolos de diferenciación (Figura 13.) muestra que el desarrollo de los progenitores POMC y AgRP permanece regulado por los mismos factores de transcripción; la expresión de NKX2-1 y la inhibición de FOXG1 que establece a las células como progenitoras ventrales del diencefalo, la inhibición de NOTCH y la expresión de SF-1 que conducen a un fenotipo neuronal hipotalámico, y finalmente, la expresión de los factores Nhlh2 y Ngn2/3 que indican la presencia de los precursores neuronales del NArc POMC o AgRP.

Los últimos factores de transcripción son los que pueden estar involucrados con el cambio de fenotipo de las células 507 C1. El factor de transcripción Nhlh2 está involucrado con la expresión de PC1, enzima encargada de procesar POMC³⁸. Mientras que, el factor de transcripción Ngn3, se ha reportado que promueve el desarrollo de neuronas POMC e inhibe el desarrollo de neuronas NPY/AgRP⁵⁷. Por lo tanto, solo modificaciones en el factor Ngn3 representan una alternativa de estudio del cambio de fenotipo de las células 507 C1.

Por otra parte, como ya se mencionó, una propiedad característica de precursores neuronales POMC, es que pueden diferenciarse en otras poblaciones neuronales del NARc—como las neuronas AgRP—y durante este proceso perder la expresión de POMC⁶⁴. El mecanismo molecular subyacente a este fenómeno permanecía desconocido hasta que el grupo de Croizier et al. demostró que los microRNAs, miR-103 y miR-107 (Figura 13.), funcionan como un interruptor (switch) en el desarrollo de los progenitores POMC hacia neuronas NPY. Lo anterior indica que alteraciones tanto en el factor de transcripción Ngn3, como en los microRNAs, representaban una buena explicación al cambio de fenotipo en las células 507 C1.

Ahora bien, nuestro grupo de investigación ha encontrado que el SFB tiene una composición de microRNAs que varía de acuerdo con la marca. Por ejemplo, el SFB Biowest se caracteriza por tener una mayor proporción de miR-103 y miR-107 en su composición total de microRNAs. Esto sugiere que su uso en cultivo promueva una posible inhibición de la expresión de POMC. Por esta razón las células 507 C1 fueron cultivadas con SFB performance plus y SFB Biowest.

Existía la posibilidad de que el tipo de suero en el cultivo pudiera participar directamente con el cambio de fenotipo. Sin embargo, los resultados indican que si bien las células presentan un cambio de fenotipo de POMC/CART a POMC+/AgRP+, dicho cambio no parece ser disparado por el tipo de SFB usado (Figura 14. A). Inclusive no hay diferencias significativas en cuanto a la proporción de transcrito maduro e inmaduro entre las dos condiciones de suero usado (Figura 14B).

Por otra parte, este nuevo cambio de fenotipo es diferente al que se observó anteriormente ya que, las células no llegan a ser completamente AgRP+. Esto sugiere que la población POMC+/AgRP+ que observamos, podría ser el resultado de células en las que la transcripción de POMC nunca se silencia por completo, incluso después de la diferenciación. Por su parte, los dos cambios de fenotipo que observamos por primera vez en las células 507 C1, sugiere que se trataba de células AgRP+ recientemente comprometidas, razón por la cual vemos un fenotipo intermedio POMC+/AgRP+ en el que la expresión de POMC aún no ha sido suprimida por completo.

Al observar que el tipo de SFB no es determinante para el cambio de fenotipo, las células continuaron cultivándose con las condiciones iniciales, es decir DMEM enriquecido en glucosa con 10% de SFB performance plus.

Por último, el establecimiento del modelo celular POMC/CART implicaba tanto la determinación de los patrones de expresión de los neuropéptidos orexigénicos y anorexigénicos, como la identificación de receptores específicos de estas neuronas.

Dado que el fenotipo celular que nos interesaba era el POMC/CART, evaluamos la señalización de las células antes de que su fenotipo cambiara, es decir cuando son POMC/CART. Todo esto con el objetivo de tener una caracterización de las señales extracelulares que este tipo de células pueden procesar y con esto saber los tipos de receptores que expresan.

Analizamos la respuesta de las células frente a las hormonas norepinefrina y péptido YY. La movilización de calcio intracelular por la norepinefrina y el NPY muestran que las células 507 C1 si responden a estas señales, lo que sugiere la presencia de los receptores adrenérgicos y Y1R. Sin embargo, la señal que desencadena NPY es más intensa que la que se observa con norepinefrina, incluso a una concentración más baja, lo que indica que probablemente las células sean más sensibles a la presencia de NPY que a la presencia de norepinefrina (Figura 12).

CONCLUSIONES

Obtuvimos un modelo celular POMC/CART que presenta un fenotipo mutable, lo que sugiere que se podría tratar de una población celular que tiene características de progenitores neuronales POMC con la capacidad de diferenciarse a varios tipos neuronales como los que reportamos —POMC⁺/AgRP⁺ y AgRP⁺. El factor involucrado con el establecimiento de un determinado fenotipo aún se desconoce, pero podemos descartar los cambios en las concentraciones de glucosa, o el tipo de SFB como los agentes causales. Además, es posible que el o los factores que estén regulando la diferenciación, también regulen el procesamiento del mRNA centinela de AgRP.

Por otro lado, la señalización del modelo 507 C1 POMC/CART, indica que las células expresan receptores adrenérgicos y receptores de NPY, característicos de las neuronas POMC/CART, lo cual hace al modelo útil o ventajoso para el estudio de los mecanismos moleculares que subyacen a la regulación de su activación e inhibición. Sin embargo, es necesario continuar con la identificación de la presencia y participación de más receptores. Inclusive, la señalización intracelular y el repertorio de receptores de membrana se tendría que evaluar en los modelos celulares con los otros dos fenotipos.

En conclusión, el modelo celular POMC/CART que obtuvimos, proporciona nuevas áreas de estudio en la búsqueda de los factores y mecanismos involucrados con la regulación del proceso de diferenciación hacia un determinado fenotipo peptidérgico final.

PERSPECTIVAS

Evaluación de la presencia de receptores de Leptina, orexina A, galanina y péptido YY.

Para conocer si las células 507 C1 (fenotipo POMC/CART) responden a leptina, se evaluó la activación de la vía JAK-STAT a través de la inmunodetección por ELISA del factor de transcripción STAT3 fosforilado. La inmunodetección se realizó a diferentes tiempos de estimulación con la hormona.

La estimulación de las células se efectuó con 1 μ M de leptina, lo que esperábamos observar era que leptina indujera la activación de STAT3 en el hipotálamo después de 15 min con una respuesta máxima a los 30 min³³. No obstante, los resultados que obtuvimos no son contundentes ya que a pesar de que se muestran una respuesta máxima a los 5 min y después de este tiempo una disminución (Figura 14. A), la desviación estándar es muy elevada al igual que el error estándar de estimación de dicha medida (σ_{ξ} = 0.96). Un aumento en la cantidad de muestras proporcionaría datos mas certeros que ayuden a tener una mejor estimacion del efecto de la leptina sobre la poblacion de la linea celular 507 C1.

Por último, se evaluó la señalización de los receptores para las hormonas galanina, orexina A, epinefrina y péptido YY mediante el análisis de los niveles de cAMP. La señalización que desencadenan las hormonas galanina y NPY lleva a la inhibición de la enzima adenilato ciclasa, por lo que se usó forskolina para aumentar los niveles de cAMP y así poder observar si sobre esos niveles aumentados las hormonas eran capaces de disminuirlos. Por su parte, la señalización de las hormonas orexina A y epinefrina desencadenan un aumento en los niveles de AMPc, por lo que no fue necesaria la preestimulación con forskolina.

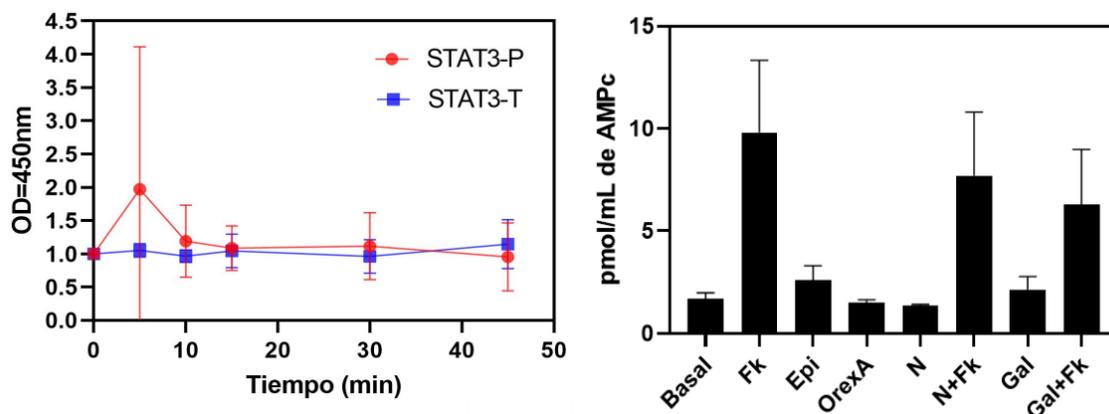


Figura 14. Evaluación de la señalización de leptina, epinefrina, orexina A, galanina y péptido YY. A) Determinación de la presencia del factor de transcripción STAT3P a diferentes tiempos de estimulación con leptina 1×10^{-6} M; 0, 5, 10, 15, 30 y 45 min ($n=5$). Se observa un pico de activación a los 5 min, con un $\sigma_{\xi} = 0.96$, con un $IC_{95\%} = 1-2.9$. **B)** Determinación de la inhibición de adenilato ciclasa por epinefrina (Epi, péptido Y (N), Galanina (Gal) y Orexina A, la estimulación durante 2 minutos con 1μ M de forskolina eleva 3.5 veces la producción de AMPc en las células 507 C1 (fenotipo POMC/CART). En presencia de forskolina la estimulación durante 10min con 1×10^{-7} M de NPY y 1×10^{-7} M Galanina redujeron los niveles de AMPc. La hormona Orexina A 1×10^{-6} M, no presentaron aumento en los niveles de AMPc, mientras que epinefrina 1×10^{-6} M, muestra un aumento discreto con respecto a los niveles basales.

Los resultados muestran que tanto galanina como neuropéptido YY tienden a disminuir la actividad de adenilato ciclasa, mientras que la epinefrina dio una señal discreta en la activación del adenilato ciclasa y la orexina A no dio señal alguna (Figura 14. B).

En la Figura 14. B, se presenta la cuantificación de los niveles de AMPc—modulados por la activación o por la inhibición de la proteína adenilato ciclasa, mediada por receptores acoplados a proteína Gs (señales de la epinefrina y la Orexina A) o por los receptores acoplados a proteína Gi (señales de Galanina y Neuropéptido Y).

La activación de los receptores para NPY, parece tener un efecto discreto, probablemente porque los receptores Y dentro de estas células se acoplen a proteína Gq o haya pocos receptores⁷⁴. Por su parte la galanina presenta un efecto mayor en a la inhibición del adenilato ciclasa, lo que sugiere que se están expresando receptores acoplados a proteínas Gi en las células 507 C1. La orexina A se probó sin forskolina, porque había reportes de que sus receptores se acoplaban a proteínas Gs⁴¹, sin embargo, también existe la evidencia de que los receptores se podrían acoplar tanto a proteínas Gi como Gq⁶⁶. Por lo tanto, sería necesario evaluar el acoplamiento de los receptores a estas proteínas.

Estabilización del modelo celular 507 C1 POMC/CART

Varios factores afectan la diferenciación de las células hipotalámicas del NArc, sin embargo, algunos factores parecen ser más selectivos en cuanto a la obtención de un tipo de población. Por ejemplo, la presencia de los factores de transcripción neurogenin 3 (Ngn3)⁵⁷ y T-box 3 (Tbx3)⁶² que promueven un aumento en la neurogénesis dirigida hacia neuronas POMC. Por este motivo, la sobreexpresión de estos factores de transcripción en los progenitores neuronales POMC, mediante el uso de vectores virales, representaría una buena alternativa para dirigir la neurogénesis hacia la obtención de neuronas POMC.

Por otro lado, conocer que los microRNAs en las neuronas POMC o AgRP tienen una participación no solo en la regulación de la vía de transducción de leptina^{23, 68}, sino también en la determinación del fenotipo peptidérgico final²². Permite sugerir que elevando los niveles de microRNAs, podríamos estabilizar el fenotipo POMC/CART. El aumento en los niveles de estos microRNAs se realizaría mediante el uso de vectores lentivirales, ya que, a diferencia de uso de los microRNAs sintéticos, se pueden obtener líneas celulares estables para la expresión de un determinado microRNA —lo que es necesario para mantener estable la expresión de POMC/CART; además, con esta estrategia sería posible seleccionar las células que fueron transfectadas, mediante GFP o selección con puromicina, lo que permitirá asegurar la obtención de una población que sobreexpresa esos microRNAs y con un fenotipo estable de POMC/CART.

Análisis del procesamiento del mRNA inmaduro de AgRP

La identificación del transcrito inmaduro de AgRP, poliadenilado, nos llevó a suponer que se trata de un mRNA centinela que la célula usa como mecanismo de respuesta rápida a cambios en su microambiente. Sin embargo, quedan varias preguntas en busca de respuestas, por ejemplo, ¿qué señal induce su procesamiento? o ¿Por qué es posible detectar el transcrito inmaduro y maduro al mismo tiempo? La primera pregunta creemos que se puede responder a la par de que se identifique el factor que promueve la estabilización del modelo en un fenotipo final, ya que por ejemplo si se tratase de los microRNAs, entonces sería interesante evaluar la presencia del transcrito maduro e inmaduro frente a niveles bajos y elevados de los miRNAs.

Una vez identificada la señal, lo siguiente sería evaluar donde ocurre el procesamiento del transcrito inmaduro. Nosotros hipotetizamos que el transcrito inmaduro de AgRP se encuentra en el núcleo, pues lo podemos detectar fácilmente, lo que no ocurre con la mayoría de los mRNAs que retienen intrones y son transportados al citoplasma, ya que son degradados inmediatamente NMD al detectar codones de stop prematuros^{28, 37}. Sin embargo, hay evidencia que indica que algunos transcritos inmaduros poliadenilados son transportados al citoplasma y procesados por un segundo mecanismo de splicing mediado por el complejo de spliceosoma menor^{40, 75}. Por lo tanto, sería necesario realizar un fraccionamiento subcelular que haga posible evaluar qué proporción de transcrito maduro e inmaduro está en el núcleo y en el citoplasma. Con esto podríamos tener una aproximación del mecanismo de procesamiento que usa la célula e implementar otros métodos para conocer porque dicho mecanismo no procesa todo el mRNA inmaduro y mantiene una reserva (que se pueden detectar, incluso como fenotipo estable).

Knock-out de AgRP en la línea celular CLU 507

Un método alternativo para obtener caracterizar y estabilizar el modelo celular POMC/CART, sería realizar un knock-out del gen de AgRP, mediante CRISPR / Cas9.

El grupo de Sefton et al., han diseñado y probado cuatro RNA guía (sgRNA), que flanquean toda la secuencia codificante de la proteína (Fig. 1). Dos sgRNA los colocaron en el extremo 5' y los otros dos en el extremo 3' del gen, lo que da como resultado la escisión del gen completo. Estos diseños se podrían usar y continuar con los siguientes pasos, o bien crear unos nuevos, apoyados de sitios web como: Sanger WTSI (<http://www.sanger.ac.uk/htgt/wge/>) o CRISPR (www.crispor.tefor.net).

Los siguientes pasos consistirían en: 1) la síntesis de sgRNAs mediante transcripción *in vitro*, 2) Diseño de primers control para confirmar la delección del gen AgRP, 3) construcción de los plásmidos de expresión de Cas9 y sgRNAs, 4) Transfección de las células, 5) Separación de las clonas transfectadas por FACS, 6) Secuenciación Sanger para confirmar la delección en toda la clona.

Función de la modificación m6A del mRNA en el procesamiento de señales extracelulares que modulan el metabolismo energético.

Se ha planteado que la modificación m6A del mRNA es un mecanismo dinámico de regulación postranscripcional, ya que se puede eliminar, modificar o incluso reparar, dependiendo de las necesidades de adaptación de la célula hacia su microambiente⁴⁶.

Las proteínas que participan en este mecanismo son denominadas; escritoras —que generan la metilación, borradoras —que remueven la metilación, y lectoras —que reconocen la metilación. Los procesos involucrados en la regulación de la función de estas proteínas y en la obtención de diferentes patrones de metilación de mRNAs aún permanecen desconocidos. Sin embargo, por el dinamismo del mecanismo es posible suponer que las proteínas escritoras y borradoras se regulan coordinadamente, en función de la respuesta que desencadena cualquier cambio en el microambiente de la célula.

El marco ideal para probar esto podría ser el sistema coordinado de señales orexigénicas y anorexigénicas, ya que al ser estímulos extracelulares con acciones antagónicas u opuestas en una determinada población celular —como el modelo POMC/CART, nos permitiría.

1. Evaluar si se generan nuevos patrones de metilación en respuesta a estas señales y su posible participación en la coordinación de la actividad de las proteínas escritoras y borradoras.
2. Determinar si los patrones de metilación son diferentes en función del tipo de estímulos (orexigénico u anorexigénico) y si tales patrones se modifican bajo el estímulo opuesto.
3. Dar los indicios de la velocidad de recambio de patrones m6A en el RNA.

BIBLIOGRAFÍA

- 1 Acuna-Goycolea, C., & Van den Pol, A., (2005). Peptide YY 3 – 36 inhibits both anorexigenic proopiomelanocortin and orexigenic neuropeptide Y neurons: implications for hypothalamic regulation of energy homeostasis. *J. Neurosci.*, 25, 10510–10519. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2552-05.2005>
- 2 Alexander, S., et al., (1996). Dynamics of the regulation of the hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis determined using a nonsurgical method for collecting pituitary venous blood from horses. *Front. Neuroendocrinol.*, 17, 1-50. <http://doi.org/10.1006/frne.1996.0001>.
- 3 Asaba, K., et al., (2007). High glucose activates pituitary proopiomelanocortin gene expression : possible role of free radical-sensitive transcription factors. *Diabetes Metab. Res. Rev.*, 23, 317–323. <https://doi.org/10.1002/dmrr.677>.
- 4 Ashford, M. L. J., et al., (1990). Glucose-induced excitation of hypothalamic neurones is mediated by ATP-sensitive K + channels. *Eur. J. Appl. Physiol.*, 415, 479–483. <https://doi.org/10.1007/bf00373626>
- 5 Bady, I., et al., (2006). Evidence from glut2-null mice that glucose is a critical physiological regulator of feeding. *American Diabetes Association*, 55, 988–995. <https://doi.org/10.2337/diabetes.55.04.06.db05-1386>
- 6 Bakos, J., et al., (2016). The role of hypothalamic neuropeptides in neurogenesis and neurogenesis. *Neural. Plast.*, 201, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2016/3276383>
- 7 Batterham, R. L., et al., (2002). Gut hormone PYY 3-36 physiologically inhibits food intake. *Nature*, 418, 650–654. <https://doi.org/10.1038/nature00887>.
- 8 Belgardt, B. F., et al., (2009). Hormone and glucose signalling in POMC and AgRP neurons. *J. Physiol.*, 587, 5305–5314. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.179192>
- 9 Benarroch, E. E. (2004). The Central Autonomic Network: Functional Organization, Dysfunction, and Perspective. *Mayo Clin Proc.*, 68, 988–1001. [https://doi.org/10.1016/s0025-6196\(12\)62272-1](https://doi.org/10.1016/s0025-6196(12)62272-1)
- 10 Boberger, C., et al., (1997). Subtypes Y1 and Y2 of the neuropeptide Y receptor are respectively expressed in pro-opiomelanocortin-and neuropeptide-Y-containing neurons of the rat hypothalamic arcuate nucleus. *Neuroendocrinology*, 66, 393–408. <https://doi.org/10.1159/000127265>
- 11 Bouret, S., et al., (2000). Expression of GalR1 and GalR2 galanin receptor messenger ribonucleic acid in proopiomelanocortin neurons of the rat arcuate nucleus : effect of testosterone. *Endocrinology*, 141, 1780–1794. <https://doi.org/10.1210/endo.141.5.7469>
- 12 Boutz, P. L., et al., (2015). Detained introns are a novel, widespread class of post-transcriptionally spliced introns. *Genes and Dev.*, 29, 63–80. <https://doi.org/10.1101/gad.247361.114>
- 13 Braunschweig, U., et al., (2014). Widespread intron retention in mammals functionally tunes transcriptomes. *Genome Res.*, 24, 1774–1786. <https://doi.org/10.1101/gr.177790.114>.
- 14 Bray, G. A., et al., (1990). Neuroendocrine control of the development of obesity: understanding gained from studies of experimental animal models. *Front. Neuroendocrinol.* 11, 128–181.

- 15 Broberger, C., et al., (1999). Changes in neuropeptide Y receptors and pro-opiomelanocortin in the anorexia mouse hypothalamus. *J. Neurosci.*, *19*, 7130–7139. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-16-07130.1999>
- 16 Butler A. (2006). The melanocortin system and energy balance. *Peptides*, *27*, 281–90. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2005.02.029>.
- 17 Challis, B. G., et al., (2003). Acute effects of PYY 3 – 36 on food intake and hypothalamic neuropeptide expression in the mouse. *Biochem Biophys Res Commun.*, *311*, 915–919. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.10.089>
- 18 Chen, R., et al., (2017). Single-cell rna-seq reveals hypothalamic cell resource hypothalamic cell diversity. *Cell Rep.*, *18*, 3227–3241. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.03.004>
- 19 Cheng, H., et al., (2008). Inhibition of agouti-related peptide expression by glucose in a clonal hypothalamic neuronal cell line is mediated by glycolysis, not oxidative phosphorylation. *Endocrinology*, *149*, 703–710. <https://doi.org/10.1210/en.2007-0772>
- 20 Contreras, C., et al., (2017). Traveling from the hypothalamus to the adipose tissue: The thermogenic pathway. *Redox Biolo.*, *12*, 854–863. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.04.019>
- 21 Cowley, A. M., et al., (2001). Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Lett. Nature*, *411*, 480–484. <https://doi.org/10.1038/35078085>
- 22 Croizier, S., et al., (2018). Central Dicer-miR-103 / 107 controls developmental switch of POMC progenitors into NPY neurons and impacts glucose homeostasis. *ELife*, *7*, 1–17. <https://doi.org/doi.10.7554/eLife.40429>.
- 23 Derghal, A., et al., (2015). Leptin is required for hypothalamic regulation of miRNAs targeting POMC 3'UTR. *Front. Cell. Neurosci.*, *9*, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00172>
- 24 Dodd, G. T., et al., (2014). Leptin and insulin act on POMC neurons to promote the browning of white fat. *Cell*, *160*, 88–104. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.12.022>
- 25 Ernst, M. B., et al., (2009). Enhanced Stat3 activation in pomc neurons provokes negative feedback inhibition of leptin and insulin signaling in obesity. *J. Neurosci.*, *29*, 11582–11593. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5712-08.2009>
- 26 Ghamari-langroudi, et al., (2005). PYY 3 – 36 inhibits the action potential firing activity of POMC neurons of arcuate nucleus through postsynaptic Y 2 receptors. *Cell Metab.*, *2*, 191–199. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.08.003>
- 27 Grynkiewicz, G., et al., (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.*, *260*, 3440–3450.
- 28 Gudipati, R. K., et al., (2012). Extensive degradation of RNA precursors by the exosome in wild-type cells. *Mol. Cell*, *48*, 409–421. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.08.018>
- 29 Hagemann, L. F., et al., (1998). Food intake after adrenaline and noradrenaline injections into the hypothalamic paraventricular nucleus in pigeons. *Physiol. Behav.*, *64*, 645–652. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(98\)00121-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(98)00121-8)

- 30 Haskell, C., et al., (1999) Characterization of the neuroanatomical distribution of agouti-related protein (AGRP) immunoreactivity in the rhesus monkey and the rat. *Endocrinology*, 140, 1408–1415. <https://doi.org/10.1210/endo.140.3.6544>
- 31 Hill, J. W., et al., (2010). Direct insulin and leptin action on pro-opiomelanocortin neurons is required for normal glucose homeostasis and fertility. *Cell Metab.*, 11, 286–297. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.03.002>
- 32 Honegger, P. (2001). Overview of cell and tissue culture. *Curr. Protoc. Pharmacol.* (1st ed., pp. 12.1-12.12). Switzerland. Retrieved from <https://doi.org/10.1002/0471141755.ph1201s04>
- 33 Hu, T., et al., (2001). Leptin-induced nuclear translocation of STAT3 immunoreactivity in hypothalamic nuclei involved in body weight regulation. *J. Neurosci.*, 21, 2413–2424. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-07-02413.2001>
- 34 Hu J., et al., (2014). Glucose rapidly induces different forms of excitatory synaptic plasticity in hypothalamic POMC neurons. *Plos one*, 9, 1-10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105080>
- 35 Jacob, A. G., & Smith, C. W. J. (2017). Intron retention as a component of regulated gene expression programs. *Hum. Genet.*, 136, 1043–1057. <https://doi.org/10.1007/s00439-017-1791-x>
- 36 Jacobowitz, D.M. & O'Donohue, T. I., (1978). α -Melanocyte-stimulating hormone: immunohistochemical identification and mapping in neurons of rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 6300–6304. <https://doi.org/10.1073/pnas.75.12.6300>
- 37 Jaillon, O., et al., (2008). Translational control of intron splicing in eukaryotes. *Nature*, 451, 359–363. <https://doi.org/10.1038/nature06495>
- 38 Jing, E., et al., (2004). Deletion of the Nhlh2 transcription factor decreases the levels of the anorexigenic peptides melanocyte-stimulating hormone and thyrotropin-releasing hormone and implicates prohormone convertases i and ii in obesity. *Endocrinology*, 145, 1503–1513. <https://doi.org/10.1210/en.2003-0834>
- 39 Kim, B., et al., (2000). Dedifferentiation of conditionally immortalized hepatocytes with long-term in vitro passage. *Exp. Mol. Med.*, 32, 29–37. <https://doi.org/10.1038/emm.2000.6>
- 40 Konig, H., et al., (2007). Splicing segregation : The minor spliceosome acts outside the nucleus and controls cell proliferation. *Cell*, 131, 718–729. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.09.043>
- 41 Kukkonen, J. P., & Leonard, C. S. (2014). Orexin/hypocretin receptor signalling cascades. *Br. J. Pharmacol.*, 171, 314–331. <https://doi.org/10.1111/bph.12324>
- 42 Kurosaki, T., & Maquat, L. E. (2016). Nonsense-mediated mRNA decay in humans at a glance. *J. Cell Sci.*, (January), 1–7. <https://doi.org/10.1242/jcs.181008>
- 43 Lam, B. Y. H., et al., (2017). Heterogeneity of hypothalamic pro-opiomelanocortin-expressing neurons revealed by single-cell RNA sequencing. *Mol. Metab.*, 6, 383–392. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2017.02.007>
- 44 Lechan, R. M., & Toni, R. (2016). Functional anatomy of the Hypothalamus and pituitary. In K. R. Feingold (Ed.), *Endocrinology Book* (pp. 576–613). Endotext. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279126/>

- 45 Li, A.-J., & Ritter, S. (2004). Glucoprivation increases expression of neuropeptide Y mRNA in hindbrain neurons that innervate the hypothalamus. *Eur. J. Neurosci.*, *19*, 2147–2154. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03287.x>
- 46 Meyer, K. D., & Jaffrey, S. R. (2014). The dynamic epitranscriptome: N6-methyladenosine and gene expression control. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, *15*, 313–326. <https://doi.org/10.1038/nrm3785>
- 47 Mihalache, L., et al., (2016). Effects of ghrelin in energy balance and body weight homeostasis. *Horm.-Int. J. Endocrino.*, *15*, 186–196. <https://doi.org/10.14310/horm.2002.1672>.
- 48 Morello, G., et al., (2016). Orexin-A represses satiety-inducing POMC neurons and contributes to obesity via stimulation of endocannabinoid signaling. *PNAS*, *113*, 4759–4764. <https://doi.org/10.1073/pnas.1521304113>
- 49 Morrison, C. D., et al., (2019). Leptin inhibits hypothalamic Npy and Agrp gene expression via a mechanism that requires phosphatidylinositol 3-OH-kinase signaling. *Am. J. Physiol.-Endo. M.*, *289*, 1051–1057. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00094.2005>
- 50 Mueller, W. M., et al., (1998). Evidence that glucose metabolism regulates leptin secretion from cultured rat adipocytes. *Endocrinology*, *139*, 551–558. <https://doi.org/10.1210/endo.139.2.5716>
- 51 Munzberg, H., et al., (2015). Role of signal transducer and activator of transcription 3 in regulation of hypothalamic proopiomelanocortin gene expression by leptin. *Endocrinology*, *144*, 2121–2131. <https://doi.org/10.1210/en.2002-221037>
- 52 Ni, T., et al., (2016). Global intron retention mediated gene regulation during CD4 + T cell activation. *Nucleic Acids Res.*, *44*, 6817–6829. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw591>
- 53 Padilla, S. L., et al., (2010). Pomc-expressing progenitors give rise to antagonistic neuronal populations in hypothalamic feeding circuits. *Nat. Med.*, *16*(4), 403–405. <https://doi.org/10.1038/nm.2126>
- 54 Padilla, S. L. (2011). Growing up POMC : Pro-opiomelanocortin in the developing brain. Columbia Academic Commons. <https://doi.org/https://doi.org/10.7916/D80G3S3V>
- 55 Paeger, L., et al., (2017). Antagonistic modulation of NPY / AgRP and POMC neurons in the arcuate nucleus by noradrenalin. *ELife*, *6*, 1–18. <https://doi.org/10.7554/eLife.25770>
- 56 Parton, L. E., et al., (2007). Glucose sensing by POMC neurons regulates glucose homeostasis and is impaired in obesity. *Nature*, *449*, 229–233. <https://doi.org/10.1038/nature06098>
- 57 Pelling, M., et al., (2011). Differential requirements for neurogenin 3 in the development of POMC and NPY neurons in the hypothalamus. *Dev. Biol.*, *349*, 406–416. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.11.007>
- 58 Pimentel, H., et al., (2016). A dynamic intron retention program enriched in RNA processing genes regulates gene expression during terminal erythropoiesis. *Nucleic Acids Res.*, *44*, 838–851. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1168>
- 59 Plant, T. M. (2016). The hypothalamo-pituitary-gonadal axis. *J. Endocrinol.*, *226*, 1–25. <https://doi.org/10.1530/JOE-15-0113>

- 60 Poulain, P., et al., (2003). Direct inhibitory action of galanin on hypothalamic arcuate nucleus neurones expressing galanin receptor Gal-R1 mRNA. *Neuroendocrinology*, 78, 105–117. <https://doi.org/10.1159/000071966>
- 61 Qiu, J., et al., (2014). Insulin excites anorexigenic proopiomelanocortin neurons via activation of canonical transient receptor potential channels. *Cell Metab.*, 19, 682–693. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.03.004>
- 62 Quarta, C., et al., (2019). Functional identity of hypothalamic melanocortin neurons depends on Tbx3. *Nat. Metab.*, 1, 222–235. <https://doi.org/10.1038/s42255-018-0028-1>
- 63 Reichenbach, A., et al., (2013). Hypothalamic Control of Appetite and Energy Metabolism. In B. Dudas (Ed.), *The Human Hypothalamus: Anatomy, Functions and Disorders* (1st ed., pp. 247 - 281). New York: Nova Science Publishers.
- 64 Sanz, X. E., et al., (2015). Fertility-regulating Kiss1 neurons arise from hypothalamic POMC-expressing progenitors. *J. Neurosci.*, 35, 5549–5556. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3614-14.2015>
- 65 Saper, C. B., et al., (2005). Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms. *Nat. Rev. Neurosci.*, 437, 1257–1263. <https://doi.org/10.1038/nature04284>
- 66 Scammell, T. E., & Winrow, C. J. (2011). Orexin receptors: pharmacology and therapeutic opportunities. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 51, 243–266. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010510-100528>.
- 67 Schmitz, U., et al., (2017). Intron retention enhances gene regulatory complexity in vertebrates. *Genome Biol.*, 18, 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1339-3>
- 68 Schneeberger, M., et al., (2015). Hypothalamic miRNAs: emerging roles in energy balance control. *Front. Neurosci.*, 9, 1–5. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00041>
- 69 Sohn, J., et al., (2013). Neuronal circuits that regulate feeding behavior and metabolism. *Trends Neurosci.*, 39, 504–512. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.05.003>
- 70 Staveren, W., et al., (2007). Human thyroid tumor cell lines derived from different tumor types present a common dedifferentiated phenotype. *Cancer Res*, 67, 8113–8121. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-4026>
- 71 Swaab, D. F., (2004). Neuropeptides in hypothalamic neuronal disorders. In K. Jeon (Ed.), *International review of cytology* (Vol. 240, pp. 305–325). [https://doi.org/doi:10.1016/s0074-7696\(04\)40003-5](https://doi.org/doi:10.1016/s0074-7696(04)40003-5)
- 72 Timper, K., & Brüning, J. C. (2017). Hypothalamic circuits regulating appetite and energy homeostasis: pathways to obesity. *Dis. Models Mech.*, 10, 679–689. <https://doi.org/10.1242/dmm.026609>
- 73 Tonsfeldt, K. J., & Chappell, P. E. (2012). Clocks on top : The role of the circadian clock in the hypothalamic and pituitary regulation of endocrine physiology. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 349, 3–12. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.07.003>
- 74 Troke, R., et al., (2013). Pyy and receptors. In A. J. Kastin (Ed.), *Handbook of Biologically Active Peptides* (pp. 1160–1165). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385095-9.00157-3>

- 75 Turunen, J. J., et al., (2013). The significant other: splicing by the minor spliceosome. *John Wiley & Sons, Ltd*, 4, 61–76. <https://doi.org/10.1002/wrna.1141>
- 76 Oswal A. & Yeo G. (2007). The leptin melanocortin pathway and the control of body weight: lessons from human and murine genetics. *Obes. Rev.*, 8, 293–306. <https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2007.00378.x>
- 77 Varela, L., & Horvath, T. L. (2012). Leptin and insulin pathways in POMC and AgRP neurons that modulate energy balance and glucose homeostasis. *EMBO Rep.*, 13, 1079–1086. <https://doi.org/10.1038/embor.2012.174>
- 78 Wang, L., et al., (2016). Efficient generation of hypothalamic neurons from human pluripotent stem cells. *Curr. Protoc. Hum. Genet.*, 90, 21.5.1–21.5.14. <https://doi.org/10.1002/cphg.3>
- 79 Williams, K. W., et al., (2010). Segregation of acute leptin and insulin effects in distinct populations of arcuate proopiomelanocortin neurons. *J. Neurosci.*, 30, 2472–2479. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3118-09.2010>
- 80 Wong, J., et al., (2013). Orchestrated intron retention regulates normal granulocyte differentiation. *Cell*, 154, 583–595. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.06.052>
- 81 Wong, J., et al., (2015). Intron retention in mRNA: No longer nonsense. *Bioessays Prospects & Overviews*, 38, 41–49. <https://doi.org/10.1002/bies.201500117>
- 82 Xie, Y., & Dorsky, R. I. (2017). Development of the hypothalamus: conservation, modification and innovation. *Development*, 144, 1588–1599. <https://doi.org/10.1242/dev.139055>
- 83 Yap, K., et al., (2012). Coordinated regulation of neuronal mRNA steady-state levels through developmentally controlled intron retention. *Genes Dev.*, 26, 1209–1223. <https://doi.org/10.1101/gad.188037.112>
- 84 Zhang, J., et al., (2015). ERK1/2 mediates glucose-regulated POMC gene expression in hypothalamic neurons. *J. Mol. Endocrinol.*, 54, 125–135. <https://doi.org/10.1530/JME-14-0330>