




Universidad de Concepción

Dirección de Postgrado

Facultad de Ciencias Biológicas

Programa de Magíster en Bioquímica y Bioinformática



Rol de 2-AG en tanicitos y su participación durante la ingesta alimenticia

Tesis para optar al grado de Magíster en Bioquímica y Bioinformática

ALEJANDRA ELIZABETH PALMA CHÁVEZ

CONCEPCIÓN-CHILE

2019

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Biología Celular de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

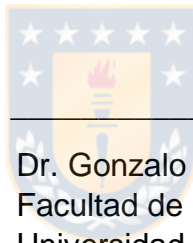
Profesor Guía

Dr. Fernando Sepúlveda B.
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Profesor Co-Guía

Dra. María de los Ángeles García R.
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora:



Dr. Gonzalo Yevénes C.
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dra. Gloria Arriagada I.
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Andrés Bello

Director de Programa

Dra. E. Amparo Uribe P.
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

TABLA DE CONTENIDO

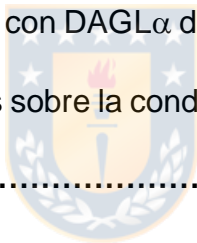
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
ÍNDICE DE TABLAS.....	XI
ABREVIATURAS.....	XII
RESUMEN.....	XVII
ABSTRACT.....	XVIII
I INTRODUCCION.....	1
1.1 El sistema endocanabinoide.....	1
1.1.1 Expresión de los genes del SE en el Sistema nervioso central (SNC).....	5
1.1.2 SE en el núcleo arqueado y su relación con la ingesta alimenticia.....	6
1.1.3 Interacción tanicito-neurona y sistema endocanabinoide.....	9
1.2 Estrategias moleculares para estudiar el funcionamiento de tanicitos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>: shARN y su utilización mediante adenovirus.....	12
2. Planteamiento general del problema.....	15
3. Hipótesis.....	17
4. Objetivo general.....	17
4.1. Objetivos específicos.....	17
II MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
1. Animales de experimentación.....	18
2. Cultivos celulares.....	18
2.1 Cultivo de HEK 293A.....	18
2.2 Cultivo de HEK 293T.....	19
2.3 Cultivo primario de tanicitos hipotalámicos de rata.....	19

3. Procesamiento histológico.....	20
3.1 Fijación.....	20
3.2 Procesamiento criogénico y obtención de cortes por congelación.....	20
4. Inmunofluorescencia.....	21
4.1 Inmunohistoquímica para cortes de tejido.....	21
4.2 Análisis inmunocitoquímico de tanicitos transducidos con AdshDAGL α o Adsh β gal	21
4.3 Microscopía confocal.....	23
4.4 Microscopía confocal espectral.....	23
4.5 Procesamiento de imágenes y cuantificación de la expresión de DAGL α en ensayos de inmunohistoquímica.....	24
5. RT-PCR convencional y RT-PCR en tiempo real.....	24
5.1 Extracción de ARN total.....	24
5.2 Transcripción reversa del ARN total (RT).....	25
5.3 Amplificación de ADNc mediante PCR.....	26
5.4 RT-PCR cuantitativo en tiempo real (qRT-PCR).....	26
5.5 Electroforesis en gel de agarosa.....	27
6. Ensayos de inmunodetección de proteínas.....	28
6.1 Obtención de extractos de proteínas totales.....	28
6.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida y electrotransferencia.....	28
6.3 Inmunodetección de las proteínas.....	29
7. Generación del vector adenoviral pdc311.2shDAGLα-EGFP.....	30
7.1 Selección de la secuencia blanco para shARN de DAGL α	30

7.2 Amplificación y purificación de los vectores pDC311.2-OFF-EGFP, pDC311.2sh β gal-EGFP y pBHGlox Δ 1,3Cre.....	31
7.3 Ensayo de restricción de los vectores adenovirales pDC311.2-OFF-EGFP.....	32
7.4 Purificación por gel del vector adenoviral pDC311.2-OFF-EGFP.....	32
7.5 Clonamiento de shARN DAGL α en el vector shuttle adenoviral pDC311.2-OFF-EGFP purificado.....	33
7.6 Transformación bacteriana.....	34
7.7 Verificación del inserto shARN mediante ensayo de restricción y secuenciación...	34
8. Generación de Adenovirus AdshDAGLα y Adshβgal.....	35
8.1 Transfección de células HEK293T con plásmido pdc311.2-shDAGL α -EGFP y pdc.311.2-sh β gal-EGFP.....	35
8.2 Generación de adenovirus en HEK293A.....	35
9. Ensayos de transducción adenoviral <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>.....	39
9.1 Ensayo de transducción adenoviral en cultivo primario de tanicitos hipotalámicos	39
9.2 Evaluación de la capacidad de transducción de AdshDAGL α y Adsh β gal en cultivo primario de tanicitos.....	40
9.3 Evaluación de la sobrevivencia celular en cultivo primario de tanicitos transducidos con AdshDAGL α y Adsh β gal.....	41
9.4 Transducción <i>in vivo</i>	41

9.5 Evaluación de la expresión de neuropéptidos hipotalámicos en respuesta a la inyección i.c.v. de glucosa en animales que fueron transducidos con Adsh β gal y/o AdshDAGL α	44
9.6 Evaluación de la expresión de neuropéptidos hipotalámicos en respuesta a la inyección i.c.v. de glucosa en animales con el inhibidor de DAGL α O-7460.....	44
9.7 Evaluación de la ingesta alimenticia en animales tratados con el inhibidor de DAGL α O-7460.....	47
10. Análisis estadístico.....	48
III RESULTADOS.....	49
1. Estudio de la expresión de genes del SE en cultivos primarios de tanicitos en hipotálamo basal.....	49
2. Generación de un adenovirus que porte un shARN para el silenciamiento de DAGL α ...	53
3. Inhibición de la expresión endógena de DAGL α en tanicitos cultivados <i>in vitro</i> utilizando partículas adenovirales.....	58
4. Evaluación <i>in vivo</i> de la transducción del adenovirus AdshDAGL α o Adsh β gal en tanicitos de rata.....	64
5. Efecto de la transducción del adenovirus AdshDAGL α o Adsh β gal sobre la expresión y localización de DAGL α en hipotálamo basal.....	67
6. Evaluación del efecto de la infección i.c.v de AdshDAGL α o Adsh β gal sobre la expresión de neuropéptidos orexigénicos y anorexigénicos producidos en el núcleo arqueado hipotalámico.....	73

7. Evaluación del efecto del inhibidor de DAGL α O-7460 sobre la expresión de neuropéptidos orexigénicos y anorexigénicos producidos en el núcleo arqueado hipotalámico.....	76
8. Análisis del efecto del inhibidor O-7460 de la enzima productora de 2-AG sobre la ingesta alimenticia.....	79
IV DISCUSIÓN.....	85
1. Rol de SE en el hipotálamo basal en la ingesta alimenticia.....	85
2. Estrategias moleculares y farmacológicas para estudiar el SE en el hipotálamo.....	87
3. Modificación de la producción de neuropéptidos hipotalámicos críticos para la conducta alimenticia en ratas con DAGL α de tanicitos inhibidas.....	89
4. Efecto de DAGL α de tanicitos sobre la conducta alimenticia.....	91
V REFERENCIAS.....	93



INDICE FIGURAS

Figura 1.	Representación esquemática de los componentes clásicos y no clásicos del sistema endocanabinoide (SE).....	4
Figura 2.	Esquema interacción tanicito neurona.....	11
Figura 3.	Representación esquemática del proceso de transducción adenoviral de un shARN	14
Figura 4.	Diseño y generación de un adenovirus shDAGL α	38
Figura 5.	Representación esquemática del posicionamiento de cánula en el cerebro de rata.....	43
Figura 6.	Procedimiento experimental diseñado para los estudios <i>in vivo</i>	46
Figura 7.	Análisis de genes del SE desde un RNAseq de cultivo de tanicitos en respuesta a glucosa.....	51
Figura 8.	Caracterización de la expresión de DAGL α en diferentes regiones cerebrales y en cultivo de tanicitos mediante qRT-PCR.....	52
Figura 9.	Verificación de la inserción del sh en el vector de expresión pDC311.2-off-EGFP.....	55
Figura 10.	Evaluación de la expresión de EGFP mediante transfección de shARN en HEK293T.....	56
Figura 11.	Verificación del armado del virus evaluando el efecto citopático.....	57
Figura 12.	Porcentaje de transducción y sobrevida de cultivo de tanicitos transducidos con AdshDAGL α y Adsh β gal.....	60

Figura 13.	Análisis de expresión de ARNm de DAGL α en cultivo primario de tanicitos transducidos con AdshDAGL α y Adsh β gal.....	61
Figura 14.	Inmunocitoquímica de DAGL α en cultivos primarios de tanicitos hipotalámicos transducidos por 96 horas con AdshDAGL α o Adsh β gal.....	62
Figura 15.	Inmunodetección de DAGL α en cultivo primario de tanicitos hipotalámicos transducidos por 96 horas con AdshDAGL α o Adsh β gal.....	63
Figura 16.	Los tanicitos son transducidos por el AdshDAGL α <i>in vivo</i>	65
Figura 17.	Inmunohistoquímica de DAGL α en 3V del hipotálamo de ratas transducidas con AdshDAGL α o Adsh β gal.....	66
Figura 18.	Análisis de expresión de ARNm de DAGL α en hipotálamos de ratas transducidos por 120 horas con AdshDAGL α o Adsh β gal.....	69
Figura 19.	Inmunodetección de DAGL α en hipotálamos de ratas transducidos con AdshDAGL α o Adsh β gal.....	70
Figura 20.	Inmunohistoquímica y cuantificación de la expresión DAGL α en 3V del hipotálamo de ratas transducidas por 120 horas con AdshDAGL α o Adsh β gal.....	71
Figura 21.	Efecto de AdshDAGL α o Adsh β gal i.c.v sobre los niveles de neuropéptidos orexigénicos y anorexigénicos producidos en el NA.....	75
Figura 22.	Efecto de O-7460 i.c.v sobre los niveles de neuropéptidos orexigénicos y anorexigénicos producidos en el NA.....	78
Figura 23.	Inhibición de DAGL α disminuye la duración del primer evento alimenticio y no la ingesta de alimentos.....	81

Figura 24. La velocidad alimenticia se encuentra disminuida en animales DAGL α inhibidos..... 83



INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Anticuerpos primarios utilizados en ensayos de inmunofluorescencia.....	22
Tabla 2.	Anticuerpos secundarios utilizados en ensayos de inmunofluorescencia.....	22
Tabla 3.	Partidores utilizados para RT-PCR convencional y qRT-PCR.....	28
Tabla 4.	Oligos shARN sintetizados para la inhibición de DAGL α	31
Tabla 5.	Resumen de resultados ensayos de comportamiento.....	84



ABREVIATURAS

2-AG	:	2-araquidonilglicerol
3D	:	tres dimensiones
3V	:	tercer ventrículo
ACEA	:	araquidonoil cloroetilamida
ADN	:	ácido desoxirribonucleico
ADNasa	:	enzima desoxirribonucleasa
ADNc	:	ácido desoxirribonucleico copia
ADP	:	adenosin difosfato
Adsh β gal	:	adenovirus que codifica un ARN horquilla contra β -galactosidasa
AdshDAGLa	:	adenovirus que codifica un ARN horquilla contra DAGLa
AEA	:	anandamida o araquidonoiletanolamida
AgRP	:	péptido relacionado a agoutí
AMPc	:	adenosín monofosfato cíclico
ARNasa	:	enzima ribonucleasa
ARNi	:	ácido ribonucleico de interferencia
ARNm	:	ácido de ribonucleico mensajero
As	:	Antisentido
ATP	:	adenosin trifosfato
BSA	:	albúmina de suero bovino
CART	:	transcrito regulado por cocaína y anfetamina
CB1R	:	receptor de cannabinoides tipo 1
CB2R	:	receptor de cannabinoides tipo 2

cy3	:	cianina 3
cy5	:	cianina 5
DAG	:	Diacilglicerol
DAGL	:	diacilglicerol lipasa
DAGL α	:	diacilglicerol lipasa alfa
DAGL β	:	diacilglicerol lipasa beta
DD	:	doble digestión
DMEM	:	medio mínimo de Eagle modificado por Dulbecco
DMN	:	núcleo dorsomedial
dNTPs	:	Desoxirribonucleótidos
dsARN	:	ARN de doble cadena
DTT	:	Ditiotreitol
EA	:	eventos de alimentación
EDTA	:	ácido etilendiaminotetracético
EGFP	:	proteína fluorescente verde
EM	:	eminencia media
FAAH	:	hidrolasa de amidas y ácidos grasos
GABA	:	ácido gamma-aminobutírico
GFAP	:	proteína ácida fibrilar glial
GFP	:	proteína fluorescente verde
Gi	:	proteína G inhibitoria
GK	:	glucoquinasa
GLUT2	:	Transportador facilitativo de glucosa 2



GPCRs	:	receptores acoplados a proteína G
GPR55	:	receptor 55 acoplado a proteína G
HB	:	hipotálamo basal
HCl	:	ácido clorhídrico
HRP	:	peroxidasa de rabano picante
IDT	:	integrated DNA technologies
i.c.v	:	inyección intracerebroventricular
ifu/mL	:	unidades infectivas por mililitro
i.p	:	inyección intraperitoneal
K ⁺	:	potasio
KCl	:	cloruro de potasio
LB	:	medio de cultivo Luria Bertani
LBBC	:	Laboratorio de Biología Celular y Citogenética
LCR	:	líquido cefalorraquídeo
LDH	:	enzima láctico deshidrogenasa
LH	:	hipotálamo lateral
LHA	:	área hipotalámica lateral
MAGL	:	monoacilglicerol lipasa
MCS	:	sitio de múltiple clonamiento
MCT1	:	transportador de monocarboxilato tipo 1
MCT2	:	transportador de monocarboxilato tipo 2
MCT4	:	transportador de monocarboxilato tipo 4
MEM	:	medio mínimo esencial de Eagle



MgCl ₂	:	cloruro de magnesio
MIP	:	proyección de máxima intensidad
α-MSH	:	hormona alfa estimulante de los melanocitos
NA	:	núcleo arqueado
Na ₂ HPO ₄	:	hidrógeno fosfato de sodio
NaCl	:	cloruro de sodio
NAPE	:	N-acil fosfatidiletanolamina
NAPE-PLD	:	N-acil fosfatidiletanolamina fosfolipasa D
NPV	:	núcleo paraventricular
NPY	:	neuropéptido Y
NTS	:	núcleo del tracto solitario
NVM	:	núcleo ventromedial
PAGE	:	electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	:	pares de base
PBS	:	tampón fosfato salino
PCR	:	reacción de la polimerasa en cadena
PFA	:	Paraformaldehído
pH1	:	promotor H1
PLC	:	fosfolipasa C
PLCβ	:	fosfolipasa C isoforma beta
PN	:	post natal
POMC	:	derivado de la pro-opiomelanocortina
pUb	:	promotor de ubiquitina humano



qRT-PCR	:	retrotranscripción y PCR cuantitativo
RT	:	Retrotranscripción
SD	:	sin digerir
SDS	:	dodecilsulfato de sodio
SE	:	sistema endocanabinoide
SFB	:	suero bovino fetal
shARN	:	ácido ribonucleico de horquilla corta
sn	:	Sentido
SNC	:	sistema nervioso central
SV40-polyA	:	señal de poliadenilación del virus SV40
TAE	:	tampón tris acetato EDTA
TBS	:	tampón tris salino
TEMED	:	N,N,N',N'-Tetrametiletilenediamina
THC	:	tetrahidrocanabinol
T _m	:	temperatura de fusión
Tris	:	2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
TRPV1	:	receptor de potencial transitorio V1
VMN	:	núcleo ventromedial
WB	:	<i>western blot</i>
WT	:	wild type



RESUMEN

El sistema endocannabinoides (SE) es un sistema de señalización ampliamente expresado en el cerebro y tejidos periféricos involucrados en la ingesta alimenticia como por ejemplo, el hipotálamo. En el hipotálamo, específicamente en el núcleo arqueado se encuentran grupos de neuronas con funciones antagónicas que modulan la ingesta alimenticia. Estas son las neuronas orexigénicas (NPY/AgRP) que promueven la ingesta alimenticia y las neuronas anorexigénicas (POMC/CART) que promueven saciedad. Está muy bien descrito que estas neuronas se mantienen estrecho contacto con células gliales glucosensoras que rodean el 3V del hipotálamo llamadas tanicitos, estas son fundamentales a la hora de modular la ingesta alimenticia en base a los niveles de nutrientes como glucosa. Si bien, se ha descrito la expresión de diferentes componentes del SE en el hipotálamo como por ejemplo, receptores cannabinoides, enzimas de síntesis y degradación de endocannabinoides, solo existe una investigación que indica que en los tanicitos se expresa la enzima DAGL α , encargada de producir el endocannabinoide 2-AG, sin existir evidencia sobre el rol de esta enzima de tanicitos en la conducta alimenticia. En esta tesis disminuimos la expresión de la DAGL α de tanicitos mediante un adenovirus shARN $DAGL\alpha$. Además, utilizamos como estrategia farmacológica un inhibidor enzimático selectivo para esta enzima. Se observó que el adenovirus presenta aproximadamente un 50% de inhibición tanto en ARNm como de proteína en estudios *in vivo* a 120 horas de transducción. Los niveles de neuropéptidos anorexigénicos y orexigénicos no responden de la misma manera que el adenovirus control, y tampoco responden con el inhibidor a altas concentraciones de glucosa i.c.v. Además, el estudio preliminar de comportamiento alimenticio indica que los animales DAGL α inhibidos se encuentran en un estado de menor hambre y/o mayor saciedad que ratas control después de un ayuno prolongado. Los resultados de este trabajo de tesis, sugieren que la alteración en los niveles de neuropéptidos en ayuno como en saciedad son mediados por el silenciamiento de DAGL α en los tanicitos, lo que apoya la hipótesis de que la enzima productora de 2-AG jugaría un rol relevante en la conducta alimenticia no descrito hasta la fecha.

ABSTRACT

The endocannabinoid system (ECS) is a signaling system widely expressed in the brain and peripheral tissues involved in food intake such as the hypothalamus. In the hypothalamus, specifically in the arcuate nucleus are a groups of neurons with antagonistic functions to modulate food intake. These are the orexigenic neurons (NPY/AgRP) that promote food intake and the anorexigenic neurons (POMC/CART) that promote satiety. It is well described that these neurons maintain close contact with glial glucosensor cells that surround the 3V of the hypothalamus called tanycytes, these are fundamental when modulating food intake based on levels of nutrients such as glucose. Although the expression of different components of ECS in the hypothalamus has been described, such as cannabinoid receptors, however, synthesis enzymes and endocannabinoid degradation, there is only one research that indicates that tanycytes express DAGL α the 2-AG producing enzyme, with no evidence of the role of this tanycyte enzyme in dietary behavior. In this thesis, we decreased the expression of tanycyte DAGL α using an adenovirus shARN_{DAGL}. In addition, we used as a pharmacological strategy a selective enzymatic inhibitor for this enzyme. We found that adenovirus presents approximately 50% inhibition in both mRNA and protein in in vivo studies at 120 hours of adenoviral transduction. Levels of anorexigenic and orexigenic neuropeptides do not respond in the same way as adenovirus control, nor do they respond with the inhibitor to high concentrations of glucose i.c.v. Also, the preliminary study of dietary behavior indicates that inhibited DAGL α animals are in a state of less hunger and more satiety than control rats after a prolonged fast. The results of this thesis suggest that the alteration in the levels of neuropeptides in fasting and satiety are mediated by the silencing of DAGL α in tanycytes, which supports the hypothesis that the producing 2-AG enzyme from glial cells critic sensing of glucose would play a relevant role in eating behavior not described to date.

I INTRODUCCIÓN

1.1 El sistema endocanabinoide.

El sistema endocanabinoide (SE) es un sistema de señalización, que está compuesto por receptores clásicos de endocannabinoides, los endocannabinoides y las enzimas asociadas a su síntesis y degradación (Mukhopadhyay & Howlett, 2001). Actualmente, se han descrito 2 tipos de receptores clásicos: Receptor tipo 1 (CB1R), el primer receptor de canabinoide clonado (Matsuda *et al.*, 1990); y el receptor tipo 2 (CB2R) que fue clonado tres años después (Munro *et al.*, 1993). Ambos receptores están acoplados a proteínas G inhibitorias (Gi) y su activación genera: I) la disminución de la actividad de la adenilato ciclasa, II) disminución de los niveles de AMPc y III) inhibición de los canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje, mediante un mecanismo que involucra al dímero beta/gamma (Gβγ), entre otros (Rhee *et al.*, 1998; Demuth & Molleman, 2006; Stella 2009; Howlett *et al.*, 2010; Zou & Kumar, 2018). CB2R presentan un 44% de homología de secuencia con el receptor de CB1R a nivel de proteína (Zou & Kumar, 2018). Además de los receptores el SE está compuesto por ligandos endógenos, llamados endocannabinoides, donde hasta el momento se han identificado siete: éter de 2-arachidonyl-glycerol (éter noladín) (Hanus *et al.*, 2001), *N*-arachidonoyl-dopamina (NA-DA) (Bisogno *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2002), virodamine (Porter *et al.*, 2002), *N*-homo-g-linolenylethanolamine (HEA) y *N*-docosatetraenylethanolamine (DEA) (Hanus *et al.*, 1993; Pertwee *et al.*, 1994). Los mejores caracterizados son la anandamida (AEA) (Devane *et al.*, 1992) y, el 2-araquidonilglicerol (2-AG) (Sugiura *et al.*, 1995; Mechoulam *et al.*, 1995). Ambos endocannabinoides exhiben diferencias en la selectividad del receptor, donde AEA se une a CB1R y CB2R con mayor

afinidad que 2-AG (Mackie *et al.*, 1993), actuando solo como un agonista parcial, mientras que 2-AG actúa como un agonista completo (Gonsiorek *et al.*, 2000; Savinainen *et al.*, 2001). Además ambos endocannabinoides se producen según la demanda en respuesta a un aumento de la concentración de Ca^{+2} intracelular (Katona & Freund, 2008; Kano *et al.*, 2009; Castillo *et al.*, 2012). Algunos autores proponen que, existirían ciertas diferencias en el tipo de secreción de ambos endocannabinoides ya que, algunas evidencias sugieren que 2-AG se secreta por liberación inducida, es decir podría ser preformado y reclutado en vesículas hasta que sea necesario (Alger & Kim, 2011), esto se basa que la utilización de inhibidores sintéticos de la enzima diacilglicerol lipasa (DAGL) encargada de la síntesis de 2-AG, no bloquea las respuestas dependientes de 2-AG (Chevaleyre & Castillo, 2003).

Además, se ha informado que tanto AEA como 2-AG interactúan con receptores distintos a CB1R y CB2R. Entre los receptores no clásicos, está TRPV1, que es activado por AEA (Tognetto *et al.*, 2001), esta interacción ligando-receptor genera un LTD (del inglés "long term depression") (Szallasi & Di Marzo, 2000; Castillo *et al.*, 2012). El receptor acoplado a proteína G55 (GPR55) es modulable por 2-AG y fitocannabinoides presentes en variedades de *Cannabis sativa* (Mackie, 2008; Di Marzo & de Petrocellis., 2012).

La síntesis y la degradación de endocannabinoides son procesos relevantes para el funcionamiento del SE. La síntesis de AEA la realiza la enzima N-acilfosfatidiletanolamina fosfolipasa D (NAPE-PLD) a partir de N-acilfosfatidiletanolamina (NAPE) (Pacher *et al.*, 2006). Mientras que la enzima responsable de la síntesis de 2-AG es la diacilglicerol lipasa (DAGL), y usa como sustrato diacilglicerol (DAG) (Murataeva *et al.*, 2013), de esta se enzima se describen dos isoformas la alfa y la beta las que se diferencian principalmente en su expresión durante el desarrollo (Bisogno *et al.*, 2003; Mulder *et al.*, 2008; Keimpema *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2010).

La degradación de la AEA es mediada por la ácido graso amida hidrolasa (FAAH), que degrada AEA en ácido araquidónico y en etalonamina, a su vez la enzima encargada de la degradación de 2-AG es la monoacilglicerol lipasa (MAGL) (Blankman *et al.*, 2007), la cual la degrada en ácido araquidónico y glicerol (Freund *et al.*, 2003;). En su conjunto estas proteínas de síntesis y degradación son parte muy relevante del SE, regulando directamente los niveles de endocannabinoides principales ligandos endógenos de los receptores CB1R, CB2R, TRPV1 y GPR55 (Fig. 1).



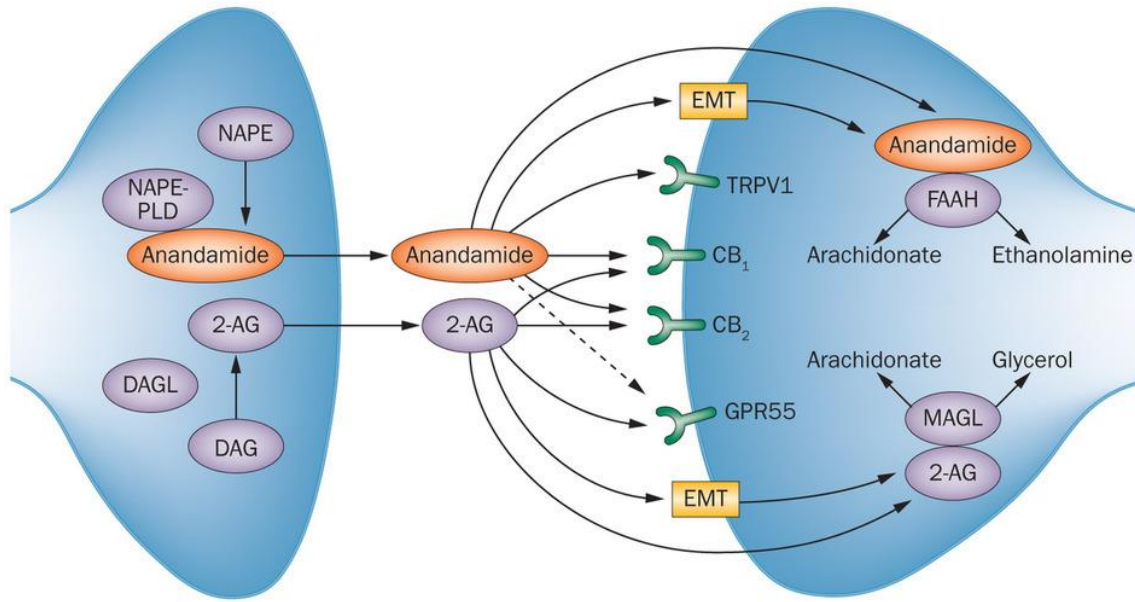


Figura 1. Representación esquemática de los componentes clásicos y no clásicos del sistema endocanabinoide (SE).

La figura muestra los componentes clásicos: CB1R, CB2R, NAPE-PLD, DAGL α , FAAH y MAGL. Adicionalmente se muestran los componentes no clásicos del SE como sería los receptores TRPV1 y el GPR55. Modificado de Komorowski & Stepień (2007).

1.1.1 Expresión de los genes del SE en el Sistema Nervioso Central (SNC).

El receptor CB1 está extensamente expresado en el cerebro, incluidas las áreas asociadas con la regulación de la homeostasis de energía, como el hipotálamo, el tronco encefálico, núcleo accumbens y el sistema cortico-límbico. También está presente en los órganos periféricos metabólicamente relevantes, como el hígado, páncreas, músculo esquelético y tejido adiposo (Pagotto *et al.*, 2006; Di Marzo *et al.*, 2009; Bermudez-Silva *et al.*, 2015). Por otra parte, inicialmente se postulaba que el receptor CB2 se expresa exclusivamente en células del sistema inmune (Klein, 2005; Mackie, 2006; Suarez *et al.*, 2008), sin embargo, estudios posteriores muestra que en el SNC expresa CB2R. Por ejemplo, se ha informado que CB2R se localiza principalmente en células microgliales y macrófagos residentes del SNC participando de la respuesta inmune cerebral y procesos de inflamación (Mackie, 2008). En humanos, se han identificado dos isoformas del CB2R, una isoforma que se expresa predominantemente en testículos y en menor grado en el SNC. La otra isoforma se expresa principalmente en el bazo y a niveles de expresión muy bajos en el cerebro (Liu *et al.*, 2009). No existe completa claridad sobre los mecanismos que expliquen estas diferencias de expresión para CB2R. Sin embargo, otros autores han informado la expresión de CB2R en otros tejidos periféricos como: páncreas, tejido adiposo, músculo esquelético, músculo cardíaco (Cavuoto *et al.*, 2007; Edwards *et al.*, 2016).

Las enzimas de síntesis y degradación han sido menos estudiadas que los receptores, sin embargo, se ha reportado que se expresan principalmente en el cerebro. Se ha informado la localización, mediante inmunohistoquímica de la enzima NAPE-PLD en el cerebro, principalmente en el hipocampo y cerebelo (Nyilas *et al.*, 2008; Cristino *et al.*, 2008), y en menor grado en regiones relevantes para el balance energético como es el hipotálamo (Suárez *et al.*,

2008; Di Marzo, 2011; Reguero *et al.*, 2014). Estudios sobre la expresión de las isoformas de DAGL (α o β), han reportado que su expresión cambia durante el desarrollo del cerebro. En estadios embrionarios se expresa la isoforma β , en cambio la isoforma α se expresa principalmente en el cerebro del ratón adulto (Bisogno *et al.*, 2003; Bisogno *et al.*, 2005; Mulder *et al.*, 2008; Keimpema *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2010; Murataeva *et al.*, 2013). Por otra parte, otros estudios indican que ambas enzimas de degradación se encuentran expresadas en áreas del cerebro como, hipocampo, corteza, cerebelo y ganglio basales, sustancia negra y tálamo anterior (Suárez *et al.*, 2008), y participarían en múltiples procesos relevantes para la fisiología humana como por ejemplo: comportamiento alimenticio, respuesta inflamatoria, dolor, entre otros (Wilkerson *et al.*, 2010; Hsu *et al.*, 2012; Reguero *et al.*, 2014).

1.1.2 SE en el núcleo arqueado y su relación con la ingesta alimenticia

Los componentes del SE se han estudiado en los principales núcleos hipotalámicos involucrados en regulación de la ingesta alimenticia como es el núcleo arqueado (NA). En este núcleo hipotalámico existen poblaciones de neuronas que cumplen funciones antagónicas críticas para la ingesta alimenticia. Las neuronas NPY/AgRP coexpresan neuropéptido Y (NPY) y el péptido relacionado con agouti (AgRP) promoviendo la ingesta alimenticia (Krashes *et al.*, 2011), mientras que las neuronas POMC coexpresan proopiomelanocortina y el transcrito regulado por cocaína y anfetamina (CART), los cuales inducen saciedad. En condiciones de balance energético negativo (niveles de nutrientes bajos), neuronas NPY/AgRP son directamente activadas por moléculas inductoras de ingesta alimenticia (orexigénicas) como grelina, favoreciendo la búsqueda de alimentos o recursos nutricionales (Dietrich & Horvath., 2013; Mandelblat-Cerf *et al.*, 2015). La activación de neuronas NPY/AgRP media sus efectos

liberando el neurotransmisor inhibitorio GABA a neuronas anorexigénicas POMC, inhibiendo los mecanismos de saciedad (Cowley *et al.*, 2001). Existe evidencia que indica que el SE juega un rol crítico en este tipo de proceso homeostático. Por ejemplo, la administración subcutánea o intraperitoneal (i.p) de AEA incrementa la ingesta alimenticia en ratas pre-saciadas (Williams *et al.*, 1999; Hao *et al.*, 2000). Otros estudios han demostrado que la administración central de cannabinoides promueve hiperfagia a través de la activación de los CB1R y que la administración de antagonistas de CB1R reduce la ingesta alimenticia y el peso corporal en ratones (Rinaldi-Carmona *et al.*, 1994; Cota., 2007). Además, se ha demostrado que la administración del fitocanabinoide Δ^9 -THC, potente activador de CB1R, causa hiperfagia y aumenta la preferencia hacia alimentos altos en glucosa en ratas (Brown *et al.*, 1977; Williams *et al.*, 2002). De manera muy interesante, un estudio realizado por Koch *et al* (2015), demostró que la activación de los CB1R en neuronas POMC promueven la ingesta alimenticia. Esta acción inducida por endocannabinoides es contraria al mecanismo clásico descrito para neuronas POMC, donde el procesamiento de POMC genera la α -hormona estimulante de melanocitos (α -MSH) para promover saciedad. Koch *et al* (2015), demostraron que una sub-población de neuronas POMC procesan de manera alternativa el prepropéptido POMC produciendo β -endorfinas que conducen a un aumento de la ingesta alimenticia. El procesamiento diferencial de POMC en el NA inducido por cannabinoides es un mecanismo que involucra receptores CB1 presente en las somas de las neuronas POMC del NA, receptores para opioides en el núcleo paraventricular (NPV), donde la proteína mitocondrial UCP2 (proteína desacoplante 2) juega un rol relevante. Por ejemplo, en animales control la activación de CB1R en el NA produce liberación de β -endorfinas en el NPV, sin embargo, en animales *knockout* para UCP2 no se observa este procesamiento alternativo de POMC (Koch *et al.*, 2015). Por otro lado, pese a que neuronas

orexigénicas NPY/AgRP del NA hipotalámico no expresan el ARNm para CB1R en los cuerpos celulares (somas), la proteína CB1R se expresaría en terminales pre-sinápticos que llegan a estas neuronas, sugiriendo fuertemente que la activación de CB1R podría indirectamente regular neuronas orexigénicas (NPY/AgRP) para favorecer la ingesta alimenticia (Herkenham *et al.*, 1990; Cota *et al.*, 2003; Morozov *et al.*, 2017).

Las hormonas que controlan la ingesta alimenticia regulan a su vez los niveles de endocannabinoides. Se ha demostrado que durante el efecto orexigénico inducido por grelina, en condiciones de ayuno los niveles de 2-AG hipotalámico están elevados. Mientras que, la administración leptina producen una disminución significativa de los niveles de este endocanabinoide en el hipotálamo (Kirkham *et al.*, 2002; Kola *et al.*, 2008; Di Marzo *et al.*, 2011). De esta forma, existe bastante evidencia para indicar que SE es un sistema de señalización importante en el balance energético regulando directamente el funcionamiento de neuronas anorexigénicas POMC/CART u orexigénicas NPY/AgRP del NA.

Por otro lado, se han descrito otras áreas hipotalámicas relevantes para la ingesta alimenticia que también expresan algunos componentes del SE. Por ejemplo, se ha encontrado inmunoreactividad asociada a CB1R en los núcleos hipotalámicos como el NPV, en el núcleo ventromedial (VMN), en el núcleo dorsomedial (DMN) y en el área hipotalámica lateral (LHA). Este sistema de señalización es fundamental para la regulación del balance energético y por ello actualmente se están estudiando posibles blancos terapéuticos para enfermedades que son de gran importancia a nivel mundial como la obesidad y la diabetes.

1.1.3 Interacción tanicito-neurona y sistema endocanabinoide

El NA y VMN existen poblaciones neuronales que están en estrecho contacto con células tipo glía radial denominadas tanicitos (Akmayev & Popov, 1977; Flament-Durand & Brion, 1985; Chauvet *et al.*, 1995.). Los tanicitos son las principales células astro-gliales modificadas presentes en el hipotálamo basal (García *et al.*, 2001, García *et al.*, 2003, Millán *et al.*, 2010) y se clasifican en cuatro tipos principalmente según su localización en el tercer ventrículo (3V) en $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ y $\beta 2$ (Akmayev & Popov, 1977). Tanicitos $\alpha 1$ y $\alpha 2$ se localizan cercanos al VMN, mientras que tanicitos $\beta 1$ se localizan dentro de la pared lateral inferior del 3V tomando contacto con las neuronas del NA a través de sus procesos celulares (García *et al.*, 2001). Tanicitos $\beta 2$ se encuentran en la base del 3V que recubre la eminencia media (EM) (García *et al.*, 2001). Ambos tanicitos α y β expresan varias moléculas glucosensoras relevantes para la ingesta alimenticia y el sensing de nutrientes incluyendo el transportador de glucosa 2 (GLUT2), transportadores de monocarboxilatos 1, 2 y 4 (MCT1, 2, 4) y canales de K^+ sensibles a ATP (K_{ATP}) (Fig. 2A). La modificación de la expresión de estas proteínas en tanicitos produce cambios en los mecanismos glucosensores y en la ingesta alimenticia de modelos animales (Navarro *et al.*, 1996; García *et al.*, 2003; Millán *et al.*, 2010; Elizondo-Vega *et al.*, 2016; Uranga *et al.*, 2017; Barahona *et al.*, 2018). En particular, una diferencia interesante entre α y β tanicitos es que se ha observado una alta expresión de GLUT2 y glucoquinasa (GK) en el polo proximal de tanicitos $\beta 1$ in vivo, a diferencia de los tanicitos α (García *et al.*, 2003). La localización específica de los tanicitos $\beta 1$, la cual se encuentra en contacto directo con el LCR, y su destacada expresión GLUT2/GK apoyan firmemente la idea de que estas células tienen una alta capacidad de incorporar y metabolizar la glucosa. Se ha propuesto que tanicitos $\beta 1$ podría captar y metabolizar glucosa a lactato a través de la vía glicolítica, y posteriormente exportar

lactato, a las neuronas de la NA, a través de transportadores de monocarboxilato (MCTs) de tipo 1 y/o 4 (Fig. 2B) (García *et al.*, 2003; Millán *et al.*, 2010; Cortés-Campos *et al.*, 2011; Cortés-Campo *et al.*, 2013). La expresión del SE en tanicitos del hipotálamo basal ha sido muy poco estudiada, sin embargo, existe una investigación realizada por Suárez *et al.* (2010), en la cual exploró la expresión de los componentes del SE en tanicitos de rata. En estos estudios se logró detectar inmunoreactividad asociada a la expresión de la enzima DAGL α en tanicitos localizados en el 3V y en la EM. No se observó la expresión de ningún otro componente del SE y no existen hasta la fecha más estudios que evalúen la expresión del SE en tanicitos de esta región cerebral. Se desconoce si este tipo celular produce algún endocanabinoide, como el 2-AG.

Pese a que existe solo un estudio que ha abordado el SE en tanicitos, este sistema de señalización ha sido estudiado en otros tipos de células gliales como astrocitos y microglías. En estos tipos celulares se ha demostrado la producción del endocanabinoide 2-AG y su participación en procesos de plasticidad neuronal y respuesta inflamatoria (Witting *et al.*, 2004; Walter *et al.*, 2004; Castillo *et al.*, 2012; Dietrich & Horvath, 2013). Hasta la fecha, se desconocen los mecanismos celulares y moleculares del SE de tanicitos, siendo necesario: I) dilucidar cuál es el rol del SE en este tipo celular, II) comprender el rol de la señalización del SE en la comunicación tanicito-neurona y III) el potencial efecto de la señalización del SE de tanicitos en la regulación del comportamiento alimenticio.

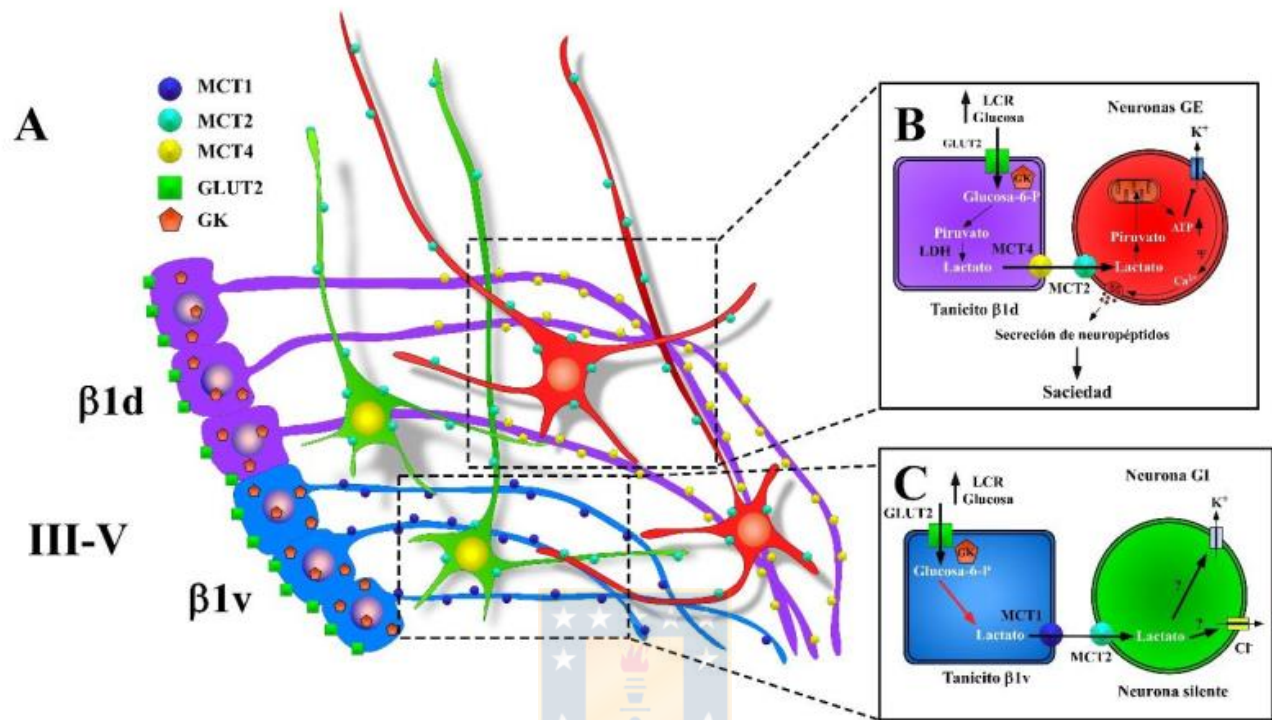


Figura 2. Esquema interacción tanicito neurona

A: Representación esquemática de la localización de MCT4 (círculos amarillo) en procesos de tanicitos $\beta 1d$ (morado), MCT1 (círculos azules) en procesos de tanicitos $\beta 1v$ (celeste), y MCT2 (círculos verde claro) en neuronas orexigénicas (verde), y en neuronas anorexigénicas (rojo) del NA. **B:** Esquema de la representación del acoplamiento glíaneurona basado en la transferencia de lactato propuesto para el mecanismo sensor de glucosa cerebral entre neuronas GE y tanicitos. **C:** Esquema basado en la propuesta de interacción entre neuronas GI (orexigénicas) y tanicitos $\beta 1v$ en respuesta a incrementos en la concentración de glucosa en el LCR. III-V: tercer ventrículo; $\beta 1d$ y $\beta 1d$: tanicitos; LCR: líquido céfalo-raquídeo; GK: glucoquinasa; LDH: láctico deshidrogenasa. Modificado de Elizondo-Vega *et al.*, 2015.

1.2 Estrategias moleculares para estudiar el funcionamiento de tanicitos *in vitro* e *in vivo*: shARN y su utilización mediante adenovirus

El silenciamiento génico por ARN de interferencia (ARNi) es un proceso biológico, evolutivamente conservado, guiado por ARNs de doble cadena (dsARN “double stranded ARN”) que reconocen transcritos diana por complementariedad de secuencia. Este proceso conduce al silenciamiento génico, ya sea, degradando los ARNm o bien impidiendo la traducción de los mismos. Producto de estos efectos, los shRNAi producen el silenciamiento génico de genes específicos, siendo este de gran utilidad para el desarrollo de investigación en el laboratorio. Esta técnica permite producir cambios en la expresión de genes específicos y evaluar el o los efectos biológicos que causan dentro de la célula, tejido u organismo.

Existen diferentes ARNi, los cuales se caracterizan por tener una corta longitud, de alrededor de 21-25 nucleótidos con el fin de no activar el sistema de defensa mediado por interferones el cual usualmente lleva a la muerte celular (Stark *et al.*, 1998). Un ejemplo de ARNi es el shARN (*short harpin* ARN), el cual posee una región codificante para el gen de interés y es transfectado directamente a la célula mediante un plásmido. El shARN presenta una secuencia de doble hebra con una estructura de horquilla que es sintetizado en el núcleo de la célula. El proceso de silenciamiento comienza cuando la secuencia del shARN se transcribe y luego de un primer proceso de maduración mediado por el complejo Drosha/DGCR8, el pre-shARN es exportado al citoplasma mediante Exportina5/Ran. En el citoplasma es clivado por la endonucleasa ARNasalll (Dicer) en un fragmento de 21-25 nucleótidos (Zhang *et al.*, 2004), originando el shARN maduro, finalmente la doble hebra del shARN es separada por medio del complejo Argo/RISC, donde una hebra será complementaria al ARN blanco, y esto provoca la degradación del ARNm mediante clivaje o cuerpos P (Fig. 3).

El avance en el conocimiento de los siARN ha permitido desarrollar diversas herramientas con el fin de facilitar la inserción de los siARN a la célula, entre ellas se encuentran los vectores virales. Entre los vectores virales los adenovirus son ampliamente utilizados, ya que, permiten insertar secuencias de gran tamaño, alrededor de 8-10 Kb. Además, la producción de los adenovirus es muy eficiente alcanzando títulos altos (10^{12} ifu/mL) y una buena capacidad de infección en distintos tipos celulares (Becker *et al.*, 1994; Berns *et al.*, 1995). Por otro lado, una ventaja es que las partículas adenovirales se inyectan directamente en el cerebro, pudiendo utilizar partículas adenovirales que presenten un tropismo celular específico. Por ejemplo, por células gliales vs neuronas. A su vez, existen otros tipos de partículas virales como los lentivirus, que a diferencia de las partículas adenovirales, estas poseen un mayor tropismo por células neuronales (Duale *et al.*, 2005).

Estas características de los adenovirus y la posibilidad de inyectarlos directamente al tercer ventrículo a través de técnicas de estereotaxia, fueron fundamentales para escogerlos como la herramienta para inhibir la expresión de DAGL α específicamente en tanicitos.

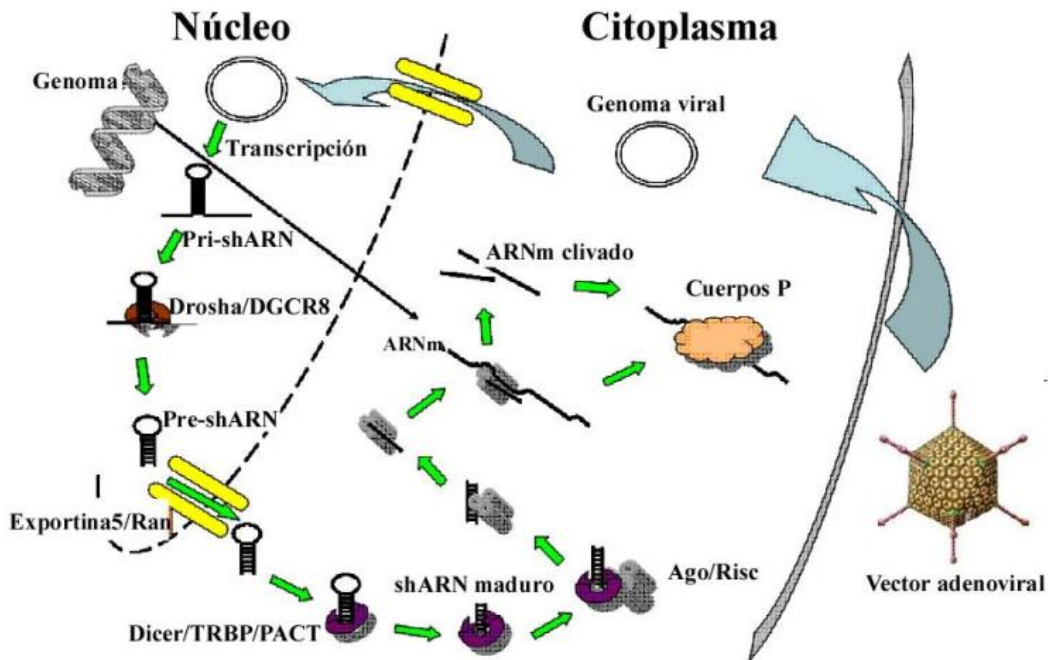


Figura 3. Representación esquemática del proceso de transducción adenoviral de un shARN.

Al llegar el vector con el shARN al citoplasma, mediado por transducción adenoviral, es transportado al núcleo para su transcripción. El transcrito primario es procesado por el complejo Drosha/DGCR8 y forma un pre shARN, el cual es transportado al citoplasma a través de exportina 5 para unirse al complejo Dicer/TRBP/PACT, el que permite finalizar el proceso de maduración. El shARN maduro en el complejo Dicer/TRBP/PACT se asocia con la proteína Argonauta (Ago) la cual a su vez interacciona con la proteína RISC. Finalmente, esta asociación permite que el shARN cumpla su función como ARN de interferencia ya sea degradando el ARNm blanco o suprimiendo la traducción a través de cuerpos P. Modificado de Tang 2005.

2. PLANTEAMIENTO GENERAL DEL PROBLEMA

El sistema endocanabinoide se encuentra altamente expresado en áreas del cerebro que están involucradas en la ingesta alimenticia como por ejemplo el hipotálamo, tronco encefálico, sistema límbico, regiones corticales relevantes para el funcionamiento cognitivo, entre otras. En este sentido, existe evidencia experimental que señalan que el hipotálamo cumple un rol fundamental en la regulación de la ingesta alimenticia y el control de la homeostasis de glucosa. En el hipotálamo basal, cercanos a las paredes del 3V se localizan algunos de los núcleos neuronales hipotalámicos más relevantes para la ingesta alimenticia. Por ejemplo, el núcleo arqueado (Oomura & Yoshimatsu, 1984; Schwartz *et al.*, 2000; García *et al.*, 2003). En el NA se encuentran poblaciones de neuronas con funciones antagónicas que son las encargadas de regular la ingesta. Estas son las neuronas NPY/AgRP (neuronas orexigénicas) y las neuronas POMC/CART (neuronas anorexigénicas). En este sentido, los tanicitos conectan metabólicamente y funcionalmente los niveles de nutrientes en el LCR con neuronas del NA mediante sus procesos para regular la ingesta alimenticia (Recabal *et al.*, 2018)

Los tanicitos tienen la particularidad que detectan cambios en la concentración de glucosa cerebral desde el LCR, metabolizan la glucosa parcialmente mediante la vía glucolítica a lactato el cual va impactar en neuronas del NA (Elizondo-Vega *et al.* 2016; Elizondo-Vega *et al.*, 2018).

Ahora bien, si existe una escasa o casi nula evidencia científica que evalúe el rol del SE presente en células gliales como los tanicitos, en el Laboratorio de Biología Celular se dispone de datos de RNAseq realizado a partir de cultivos *in vitro* de tanicitos bajo distintas concentraciones de glucosa extracelular. El análisis realizado por nuestro laboratorio de RNAseq a partir de cultivos de tanicitos muestra que existe un número de copias de moléculas

de ARNm para la maquinaria necesaria de síntesis y degradación de 2-AG, no así para CB1R, CB2R u otro componente del SE. A su vez, también estarían en un alto número de copias las proteínas PLC β y otros GPCRs capaces de elevar el Ca²⁺ intracelular como es el receptor P2Y1. La presencia de PLC β y el aumento de Ca²⁺ son críticos para la síntesis de 2-AG en varios tipos celulares (Witting *et al.*, 2004; Dietrich & Horvarth 2013)

En su conjunto, estos antecedentes nos sugieren que en tanicitos se podrían sintetizar el endocanabinoide 2-AG y este a su vez es el ligando endógeno de CB1R, el cual podría regular el funcionamiento de neuronas POMC, entre otros posibles mecanismos. Esta potencial interacción ligando-receptor (2-AG/CB1R) provocaría la regulación de la ingesta alimenticia mediada por neuronas del NA. Sin embargo, los mecanismos celulares y moleculares asociados a los componentes del SE en tanicitos han sido pobremente estudiados.

De esta forma, se ha propuesto que los tanicitos presentan toda la maquinaria para la síntesis y degradación 2-AG. Este endocanabinoide impactaría en la producción de neuropéptidos en las neuronas del NA, afectando la ingesta alimenticia mediante un mecanismo dependiente de CB1R.

Con estos antecedentes, proponemos como hipótesis que **“La señalización mediada por la enzima productora de 2-AG de tanicitos regula la producción de neuropéptidos críticos para la ingesta alimenticia”**.

3. HIPÓTESIS

Planteamos como hipótesis que “**La señalización mediada por la enzima productora de 2-AG de tanicitos regula la producción de neuropéptidos críticos para la ingesta alimenticia**”.

4. OBJETIVO GENERAL

- Diseñar una herramienta molecular para disminuir la expresión de DAGL α en tanicitos y evaluar el efecto de modificar la producción de 2-AG en tanicitos sobre la ingesta alimenticia en ratas.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Generar un adeno-sh-EGFP para disminuir los niveles de expresión de DAGL α en tanicitos.
2. Evaluar el efecto de AdshDAGL α sobre la expresión de DAGL α en tanicitos *in vitro* e *in vivo*.
3. Determinar el efecto de la disminución de DAGL α en tanicitos sobre la ingesta alimenticia.

II MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales de experimentación

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley adultas de ambos sexos y de 1 día postnatal (PN). Los animales se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura 20-25°C, con un fotoperiodo 12/12 horas luz/oscuridad y libre acceso al agua y alimento.

Los animales fueron manejados siguiendo las normas de bioseguridad del manual de CONICYT 2017 y los procedimientos fueron aprobados por el comité de ética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción.

2. Cultivo celulares

Los cultivos de células se realizaron a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad. Los procedimientos de obtención y expansión de células se realizaron en un gabinete de bioseguridad clase II. Las células fueron almacenadas por congelamiento en nitrógeno líquido.

2.1 Cultivo de HEK 293A

Para la generación del adenovirus se utilizó la línea celular HEK 293A, que corresponde a una línea celular derivada de riñón humano embrionario, transfectadas establemente con el gen E1 adenoviral (serotipo 5). Las células se usaron en pasajes tempranos (3-12) y se cultivaron en placas Petri de 10 cm de diámetro (Corning® Costar®) con 10 mL de medio de cultivo DMEM 25 mM glucosa (DMEM-HG) (Gibco® Invitrogen, Life Technologies) suplementado con 10% v/v de suero bovino fetal (SBF) (Invitrogen), 0,1 mM de aminoácidos no esenciales (Gibco® Invitrogen, Life Technologies), penicilina 100 U/mL, estreptomycin 100 µg/mL y fungizona 2,5 µg/ mL (Gibco® Invitrogen, Life Technologies), con cambio de medio de cultivo cada dos días.

Cuando las células en cultivo alcanzaron un 80-90% de confluencia, se expandieron utilizando densidades de siembra de 8000 cél/cm². El recuento y la estimación de la viabilidad celular fueron realizados por el método de exclusión con azul de tripán 0,2% p/v.

2.2 Cultivo de HEK 293T

La línea celular HEK 293T fue utilizada para los ensayos de transfección del plásmido pDC311.2shDAGL α -EGFP y para la titulación de partículas adenovirales. Células de pasajes tempranos fueron cultivadas en medio DMEM-HG (Gibco® Invitrogen, Life Technologies), suplementado con SBF 10% v/v, penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100 μ g/mL, glutamina 2 mM y fungizona 2,5 μ g/mL, con cambio de medio de cultivo cada dos días. Se utilizaron densidades de siembra de 8000 cél/cm², y se mantuvieron hasta alcanzar un 80-90% de confluencia. El recuento y la estimación de la viabilidad celular fueron realizados por el método de exclusión con azul de tripán 0,2% p/v.

2.3 Cultivo primario de tanicitos hipotalámicos de rata

Los cultivos primarios fueron obtenidos de ratas Sprague-Dawley de 1 día post-natal y mantenidos a 37°C y 5% de CO₂ en incubadora. La región hipotalámica del cerebro de ratas fue microdisecionada, realizando dos cortes transversales, uno a nivel del quiasma óptico y otro inmediatamente antes de los cuerpos mamilares, disecando el área diecenfálica ventral. Posteriormente, el tejido se sometió a disgregación enzimática por 20 minutos a 37°C en presencia de tripsina 0,25% (p/v) (Gibco BRL) y EDTA 0,20% (p/v) (Sigma), y luego a disgregación mecánica en solución de plantado MEM (Gibco BRL) suplementado con 10% (v/v) de SBF (Gibco BRL), glutamina 2 mM, penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100 μ g/mL, glucosa 2 Mm, fungizona 2,5 μ g/mL y DNasa 2 mg/mL (Sigma). El tejido disgregado se centrifugó a 500

g por 5 minutos a temperatura ambiente; el pellet obtenido se resuspendió en solución de plantado sin ADNasa. Posteriormente, se realizó el recuento y estimación de la viabilidad celular, por el método de exclusión con azul de tripán. Las células obtenidas se sembraron en frascos de cultivo T25 (Corning® Costar®) a una densidad aproximada de 1×10^5 células. Transcurrido un tiempo de 3 horas, se reemplazó el medio de cultivo por MEM suplementado con 10% (v/v) de SBF (Gibco BRL), glutamina 2 mM, penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100 µg/mL, glucosa 2 mM y fungizona 2,5 µg/mL. Los cultivos celulares se mantuvieron por dos semanas. El medio de cultivo suplementado fue reemplazado cada 48 horas.

3. Procesamiento histológico.

3.1. Fijación.

Cerebros de ratas (sin tratar o canuladas e infectadas con AdshDAGL α o Adsh β gal) fueron extraídos y fijados por inmersión para-formaldehído (PFA) 4% p/v, preparado en tampón fosfato 100 mM pH 7,4, durante 30 minutos. Posteriormente, se realizaron dos cortes coronales en las muestras de cerebro, para facilitar la penetración del fijador, y se mantuvieron a 4°C por 48 horas, para luego transferirlos a una solución de sacarosa al 30% p/v a 4°C por 72 horas. Pasado este tiempo se procedió a realizar el procesamiento criogénico y obtención de cortes por congelación.

3.2. Procesamiento criogénico y obtención de cortes por congelación.

Las muestras de cerebro fijadas con PFA 4% p/v por inmersión y mantenidas en sacarosa fueron embebidas en el medio para tejidos criopreservados (Leica Microsystems, Nussloch, Germany), congeladas con CO₂ y mantenidos a -20°C hasta el momento de realizar los cortes

histológicos de 40 μm en un micrótomo de congelamiento (Microm HM520), los que serán utilizados en ensayos de inmunofluorescencia en cortes flotantes.

4. inmunofluorescencia

4.1 Inmunohistoquímica para cortes de tejido.

Se utilizaron cortes de 40 μm de hipotálamo de ratas adultas obtenidas por microtomía de congelación. Los cortes fueron lavados tres veces en solución tampón Tris-fosfato 10 mM (pH 7,8) por 10 minutos, luego se permeabilizaron con Tritón X-100 1% v/v en Tris-fosfato 10 mM (pH 7,8) por 20 minutos. La mezcla de anticuerpos preparada en Tris-BSA 1% Tritón X-100 0,2% v/v se incubó por 16 horas y a 4° C en las diluciones correspondientes (Tabla 1). Posterior a la incubación con el primer anticuerpo las muestras se lavaron 5 veces por 5 minutos en tampón Tris-fosfato 10 mM (pH 7,8) e incubadas durante 2 horas con los segundos anticuerpos unidos a fluoróforos (Tabla 2), diluidos en Tris-BSA 1%. La incubación se realizó en una cámara húmeda a temperatura ambiente y en oscuridad. Luego, las muestras fueron lavadas 5 veces por 5 minutos en tampón Tris-fosfato 10 mM (pH 7,8) y montadas con medio de montaje para fluorescencia (Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA). Como tinción nuclear se utilizó Hoechst con una dilución de 1:1000.

4.2 Análisis inmunocitoquímico de tanicitos transducidos con AdshDAGL α o Adsh β gal

Las células fueron cultivadas en cubreobjetos de vidrio 12 mm recubiertos con poliL-lisina 0,2 mg/mL (Merck) en placas de cultivo de 12 o 24 pocillos (TrueLine®). Las preparaciones fueron lavadas en tampón PBS (pH 7,4) y fijadas durante 30 minutos en paraformaldehído (PFA) al 4% p/v preparado en el mismo tampón. Posteriormente, las células fueron lavadas 5 veces por 5 minutos con tampón Tris-fosfato 10 mM (pH 7,8) y permeabilizadas con Tritón X-100 al 0,2%

(Sigma) por 10 minutos. Las células se incubaron con el anticuerpo primario (Tabla 1) diluido en tampón Tris-fosfato 10 mM (pH 7,8) BSA 1%, en cámara húmeda durante toda la noche. Una vez transcurrido este tiempo, los preparados se lavaron tres veces por 10 minutos en tampón Tris-fosfato 10 mM (pH 7,8) con BSA al 1% y se incubaron con el anticuerpo secundario (Tabla 2) marcado con un fluoróforo durante 2 horas. Como tinción de contraste fue utilizada una tinción nuclear con TOPRO-3 (1:1000) y/o Hoechst (1:1000) utilizando el mismo procedimiento anterior. Finalmente se realizaron cinco lavados de 3 minutos cada uno con Tris-fosfato 10 mM (pH 7,8), y se realizó el montaje con 10 μ L de solución líquida de montaje fluorescente (DAKO). Como control se realizó el mismo procedimiento pero en ausencia del anticuerpo primario.

Tabla 1. Anticuerpos primarios utilizados en ensayos de inmunofluorescencia

Anticuerpo	Especie	Dilución	Origen
Anti-DAGLα	Ratón	1:1000	Santa Cruz Biotechnologies
Anti-vimentina	Pollo	1.400	Milipore

Fuente: Elaboración propia

Tabla 2. Anticuerpos secundarios utilizados en ensayos de inmunofluorescencia

Anticuerpo	Especie	Dilución	Origen
Anti-ratón-Cy3	Burro	1:200	Jackson IR
Anti-pollo-Cy5	Burro	1:200	Jackson IR

Fuente: Elaboración propia

4.3 Microscopía confocal.

Muestras de cultivos celulares o cortes de tejidos con inmunofluorescencia fueron analizados utilizando un microscopio confocal LSM700 (Zeiss), equipado con tres líneas de láser sólidos, de 488, 555 y 639 nm, y dos detectores de alta sensibilidad, lo que permite obtener imágenes en distintos planos focales de hasta tres marcadores fluorescentes. Las imágenes fueron adquiridas mediante el software ZEN 2011 (Zeiss) con un tamaño de 1024 x 1024 x 16 bits. Los parámetros que modifican la intensidad de fluorescencia capturada por el equipo, como potencia de láser y ganancia digital fueron seteados con muestras sin marcar. Para el análisis de la proteína fluorescente verde (EGFP) en cortes hipotalámicos, se realizó una reconstrucción de proyección de máxima intensidad (MIP) de las estructuras que presentan cierto volumen. Las imágenes fueron adquiridas en distintos planos z, los que apilados en un z-stack son superpuestos para generar una imagen de 3 dimensiones (3D) que corresponde a la MIP.

4.4 Microscopía confocal espectral.

Para aquellas muestras en donde se utilizaron más de tres marcadores fluorescentes, se utilizó para su análisis un microscopio confocal espectral LSM780 NLO (Zeiss). Este equipo posee cinco líneas de láser sólidos de 405, 458, 488, 514, 561 y 633 nm y un detector policromático que permite la separación espectral y la detección simultánea de hasta 10 marcadores fluorescentes. Las imágenes fueron adquiridas mediante el software ZEN 2011 (Zeiss) con un tamaño de 1024 x 1024 x 16 bits y los parámetros de intensidad de fluorescencia fueron ajustados con muestras sin marcar.

4.5 Procesamiento de imágenes y cuantificación de la expresión de DAGL α en ensayos de inmunohistoquímica.

Las reconstrucciones tridimensionales fueron obtenidas utilizando directamente el software de adquisición de imágenes ZEN 2011 (Zeiss) o Image J 1.50i 2016 (NIH) ambos a partir de la información almacenada en los archivos de MIP. Para la cuantificación de expresión de la proteína DAGL α en tanicitos transducidos con AdshDAGL α o Adsh β gal se utilizó la opción ROI Manager de Image J, con la cual se seleccionó aquellos tanicitos transducidos en todos sus planos Z, entregando como resultado valores de área, y de intensidad de fluorescencia (EGFP (verde) / DAGL α (rojo)) de cada célula seleccionada, luego los datos obtenidos fueron procesados en el programa R bajo un script confeccionado por el Dr. Carlos Farkas (Universidad de Concepción) el cual calcula los valores por célula y por plano Z, obteniendo como resultado final la cuantificación de la expresión de DAGL α en células transducidas con AdshDAGL α o Adsh β gal.

5. RT-PCR convencional y RT-PCR en tiempo real.

Se realizó extracción de ARN total, transcripción reversa y amplificación por PCR convencional y en tiempo real de fragmentos específicos a partir del ADN copia (ADNc). Esta técnica se realizó en los cultivos celulares implementados en el desarrollo de esta tesis y en tejido aislado de cerebro de rata.

5.1 Extracción de ARN total.

Se obtuvo ARN total de cultivos primarios de tanicitos y de hipotálamo de rata adulta. El ARN fue extraído mediante método de extracción tiocianato de guanidina-fenol/cloroformo, homogenizando las muestras en 500 μ L a 1000 μ L de TRIzol® (Invitrogen, Thermo Fisher

Scientific Inc.), dependiendo del número de células o cantidad de tejido según instrucciones del fabricante e incubándolas durante 3 minutos a temperatura ambiente. Luego a las muestras se les adicionó 200 μ L de cloroformo, agitándose vigorosamente por 15 segundos e incubadas a temperatura ambiente por 3 minutos. Las muestras se centrifugaron a 12000 g por 15 minutos a 4°C para separar fases. La fase acuosa que contiene el ARN fue recuperada y se le agregó 500 μ L de isopropanol, las muestras fueron incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente y luego se centrifugaron a 12000 g por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue eliminado y el pellet de ARN obtenido se lavó dos veces con 1 mL de etanol 70% v/v con una posterior centrifugación de 12000 g por 10 minutos a 4°C. Luego el ARN fue secado por 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, el ARN total fue resuspendido en 30 μ L de agua libre de ARNasa y se cuantificó midiendo la absorbancia a 260 nm. Se evaluó la pureza e la extracción midiendo la relación a 260/280 nm.

5.2 Transcripción reversa del ARN total (RT).

La síntesis de ADNc se realizó en un termociclador *Mastercycler* (Eppendorff), utilizando 2 μ g de ARN total de cada muestra. Previo al proceso de transcripción reversa, 2 μ g de ARN total fueron tratados con ADNasa (Thermo Fisher Scientific) a 37°C por 30 minutos para eliminar cualquier posible contaminación con ADN. Para un volumen final de 20 μ L, se incubó la mezcla anterior con 2,5 mM de EDTA por 10 minutos a 65°C, 0.5 μ g de Oligo-dT, denaturado a 70°C por 5 minutos. Posteriormente, se agregó el tampón de transcripción (Tris-HCl 50 mM, pH 8,3, KCl 50 mM, MgCl₂ 4 mM, DTT 10 mM), la mezcla de dNTPs (1 mM de cada uno) y 20 U del inhibidor de ARNasa o Ribolock (Thermo Fisher Scientific), incubando por 5 minutos a 37°C. Luego, a esta mezcla se le agregó 200 U de transcriptasa reversa RevertAid® H Minus M-MuLV (Thermo Fisher Scientific) se incubó por 1 hora a 42°C, seguido de 70°C por 10 minutos para

detener la reacción. Como control negativo se realizaron reacciones paralelas en ausencia de Oligo-dT y enzima transcriptasa reversa (RT), para detectar la presencia de ADN contaminante.

5.3 Amplificación de ADNc mediante PCR.

La amplificación se realizó utilizando 1 μ L del producto de transcripción reversa (ADNc) incubado con una mezcla de reacción que contenía tampón de PCR 10X (Tris 20 mM pH 8,4, KCl 50 mM); $MgCl_2$ 1,5 mM, mezcla de dNTPs (0,2 mM cada uno), 0,31 U Taq DNA polimerasa (Thermo Fisher Scientific), set de partidores específicos para la secuencia a amplificar a una concentración de (0.2 μ M de cada uno) en un volumen final de reacción de 12.5 μ L. El programa de amplificación básico consistió en una denaturación inicial de 5 minutos a 95°C, seguido de un número variable de ciclos (denaturación, alineamiento y extensión a 72°C) y una extensión final de 7 minutos para permitir la elongación de las cadenas incompletas. Los tiempos de denaturación, alineamiento, extensión y número de ciclos utilizados se determinaron de acuerdo al fragmento a amplificar. Las temperaturas de alineamiento para los partidores a utilizados fueron estandarizadas utilizando gradientes de temperatura en el termociclador *MasterCycler* (Eppendorf). Los partidores utilizados para amplificar los distintos genes fueron diseñados utilizando el programa AmplifX (versión 1.7.0 por Nicolás Jullien), teniendo en cuenta su T_m , el porcentaje de GC, la formación de dímeros y estructuras secundarias. En la mayoría de los casos cada partidor de un set de partidores se encuentra en un exón distinto actuando como control para la amplificación de ADN genómico contaminante.

5.4 RT-PCR cuantitativo en tiempo real (qRT-PCR)

Este ensayo fue realizado en muestras de tejido cerebral (hipotálamo, tronco encefálico, cerebelo, corteza frontal y cerebral) de ratas adultas entre 200 gr- 290 gr, y cultivos primarios

de tanicitos transducidos con AdshDAGL α y Adsh β gal. Se obtuvieron muestras de ARN total por triplicado o más y los procesos de extracción de ARN y transcripción reversa fueron realizados de la misma forma que para el RT-PCR convencional. Para la amplificación del producto se usó el kit “Brilliant® SYBR® Green QPCR master mix” (Agilent Technologies, Inc.) en un volumen final de 20 μ L conteniendo 2 μ L de ADNc, 500 nM de los partidores respectivos. Las muestras se denaturaron inicialmente a 95°C por 10 minutos, luego se realizaron 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C por 20 segundos y 72°C por 20 segundos, en el termociclador Mx3000P (Agilent Technologies, Inc.). La cuantificación se realizó comparando el número de ciclos requeridos para amplificar cada gen sobre el ciclo umbral (Ct) en relación al gen de referencia ciclofilina. Los resultados fueron expresados aplicando el método $\Delta\Delta$ Cts en los cuales la cantidad de ARN fue expresado como X veces sobre una muestra utilizada como referencia (muestra transducida con adenovirus control, muestra sin transducir, etc.). Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el programa GraphPad Prism 5.0.

5.5 Electroforesis en gel de agarosa

Los productos de PCR se identificaron sembrando en geles de agarosa 1,2 % p/v en buffer TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM) y bromuro de etidio 0,2 μ g/mL. Para cargar las muestras se utilizó buffer de carga 6X (glicerol 30 % v/v, azul de bromofenol 0,5 % p/v en buffer TE Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM). Como estándar de peso molecular se sembraron 0,5 μ g de un estándar de pares de bases. La electroforesis se realizó a 70 volts por 45 minutos en buffer TAE en una cámara de electroforesis (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, California, USA). La visualización de los fragmentos se realizó en un transiluminador de luz ultravioleta. Las imágenes de los geles se obtuvieron en el equipo Molecular Imagen FX (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, California, USA).

Tabla 3: Partidores utilizados para RT-PCR convencional y qRT-PCR

Nombre	Partidor sense 5'-3'	Partidor antisense 5'-3'	Producto (pb)
DAGLα	TGATCTGACCATCGCCCTTT	AGCGCTGTCTTCCCTTGTT	258
Actina	GCTGCTCGTCGACAACGGCTC	CAAACATGATCTGGGTCATCTTCTC	353
qRT- NPY	TGTTTGGGCATTCTGGCTGAGG	CTGGGGGCATTTTCGTGCTTTC	203
qRT-POMC	CTCCTGCTTCAGACCTCCATAGAC	AAGGGCTGTTCATCTCCGTTG	164
qRT- ciclofilina	ATAATGGCACTGGTGGCAAGTC	ATTCCTGGACCCAAAACGCTCC	239

Fuente: Elaboración propia

6. Ensayos de inmunodetección de proteínas

6.1. Obtención de extractos de proteínas totales.

Extractos de proteínas totales fueron obtenidos a partir de cultivos primarios de tanicitos transducidos y tejido hipotalámico de rata adulta. Tanto los cultivos como los tejidos fueron lavados en PBS y homogenizados en 500 μ L de solución inhibidora de proteasas 1X (Roche) y mantenidas en hielo. Posteriormente, las muestras fueron sonicadas con una amplitud de 60 a 4°C en tres ciclos de un pulso de 10 segundos de duración y luego centrifugados por 10 minutos a 8000 g a 4°C y el sobrenadante resultante se conservó a -80°C. La concentración de proteínas fue cuantificada por el método de Bradford (Bio-Rad Laboratories Inc.) midiendo su absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro.

6.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida y electrotransferencia.

Para resolver las proteínas de interés, se utilizaron geles en gradiente de 5 a 15% v/v de acrilamida/bisacrilamida. El gel separador fue preparado utilizando dos mezclas, una que

contenía acrilamida-bisacrilamida 5% p/v y otra 15% p/v, además de SDS 0,4% p/v, TEMED 0,1% v/v y persulfato de amonio 0,02% p/v, preparados ambos en tampón TrisHCl 750 mM (pH 8,8). El gel espaciador fue preparado utilizando una mezcla acrilamida/bisacrilamida 5% p/v, SDS 0,5% p/v, TEMED 0,1% v/v y persulfato de amonio 0,02% p/v, preparado en tampón Tris-HCl 60 mM (pH 6,8). Como tampón de corrida se utilizó un tampón Tris-glicina (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1% p/v, pH 6,8). Se sembraron 50 a 100 µg de extractos de proteínas diluidas en tampón de carga 5X (TrisHCl 250 mM, pH 6,8, SDS 4% p/v, glicerol 20% v/v, β-mercaptoetanol 1,25 M, azul de bromofenol 0,04% p/v). Se aplicó un voltaje de 80 volts al gel montado en la cámara de electroforesis por 200 minutos. Las proteínas del gel resultante fueron transferidas a membranas de fluoruro de polivinilideno Immobilon-P®. Para esto, el gel fue puesto en contacto con la membrana en una cámara de electrotransferencia en presencia de tampón Tris-HCl 25 mM (pH 8,8), glicina 192 mM y metanol 20% v/v. La electrotransferencia fue realizada a un amperaje constante de 250 mA durante 120 minutos en hielo.

6.3. Inmunodetección de las proteínas.

Una vez realizada la transferencia se tiñó la membrana con una solución de rojo Ponceau 0,2% p/v durante 2-5 minutos para confirmar la correcta transferencia de las proteínas a la membrana. Posteriormente, la membrana fue lavada una vez con agua destilada y después se realizó 5 lavados de 5 minutos cada uno con tampón TBS-T (NaCl 150 mM, Tris 10 mM, pH 7,4, Tween-20 0,05% v/v) por horas y bloqueada con leche descremada 5% p/v en tampón TBS-T por 1 hora. Luego, las membranas fueron incubadas con los anticuerpos primarios: anti-DAGLα (1:1000), anti-EGFP (1:1000), o anti-β-actina (1:10000), diluido en TBS-T-leche por 16 h a 4° C. Posteriormente, la membrana fue lavada con TBS-T, bloqueada con TBS-T-leche e incubada, en oscuridad, por 2 h con un segundo anticuerpo anti-ratón conjugado con peroxidasa (HRP),

diluido en TBS-T-leche. Finalmente la membrana fue lavada con TBS-T e incubada durante 1 minuto con el reactivo de detección de *Western Blotting*, Amersham ECL Select™ (GE Healthcare Life Sciences). La quimioluminiscencia fue detectada por exposición de la membrana en un equipo automatizado de captura de imágenes fluorescentes/quimioluminiscentes (Clinx Science Instruments Co., Ltd, Model ChemiScope 3300). Posteriormente, las membranas fueron re-incubadas con anticuerpos para otras proteínas de interés, previo al tratamiento con una solución comercial para reblotear membranas (Restore Plus Western blot Striping Buffer, Thermo Fisher Scientific). Esta incubación se realizó por 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas fueron lavadas con TBS-T, y bloqueadas con TBS-T leche por 30 minutos e incubadas con el primer anticuerpo, tal como se describió anteriormente.

7. Generación del vector adenoviral pdc311.2shDAGL α -EGFP

Para generar un adenovirus que contenga el shARN para DAGL α , se subclonó el shARN en el vector pDC311.2-OFF-EGFP. Este vector fue generado previamente en nuestro laboratorio (Millán, 2008) y, además de ser utilizado en la generación de adenovirus, tiene la particularidad que posee un cassette de expresión que contiene un promotor H1, el cual permite la expresión de ARNs pequeños, un sitio de clonamiento múltiple, en donde se insertará el shARN, además posee el gen reportero EGFP bajo un promotor de ubiquitina humano y finalmente presenta un sitio SV-40 poli A para la maduración del ARN (Fig. 4 A).

7.1 Selección de la secuencia blanco para shARN de DAGL α

Para el diseño de shDAGL α lo primero que se obtuvo fue la secuencia ARNm de DAGL α para la especie *Rattus norvegicus* disponible en la base de datos (NM_001005886.1:94-3228). La secuencia del shARN debe ser altamente específica debido a que sólo ocurre el silenciamiento

cuando existe una alta complementariedad con el ARNm (Tomari *et al.*, 2005). Se utilizó la plataforma DHAMARCON siDESIGN Center disponible en la red, para el diseño del shARN para el gen DAGL α , a partir de la secuencia CDS del gen, esta plataforma entrega una lista de candidatos con diferentes características como por ejemplo el porcentaje de GC, Score, entre otros. Se escogió la secuencia que tenía un alto score y un porcentaje de GC inferior al 45%. El shARN escogido fue analizado mediante el programa BLAST para evaluar la identidad con secuencias de otros ARNm, y se utilizó el programa ClustalW para evaluar la identidad con isoformas. De este modo se verificó que la secuencia seleccionada alinea con la secuencia de ARNm de DAGL α en un 100%, arrojando un valor score para el alineamiento de 100. Los oligonúcleotidos sintetizados de ADN contenían los sitios de restricción para ASCI y PACI y la secuencia en horquilla. Los oligos shARN se mandaron a sintetizar a Integrated DNA technologies (IDT), a 250 nM y purificado por PAGE y se resuspendieron en agua de grado de biología molecular en una concentración de 100 μ M.

Tabla 4: Oligos shARN sintetizados para la inhibición de DAGL α

shDAGLα	Secuencia de oligos sh	Pares de base
sense	TCAATAAGGTGCTGGAGAA	64
antisense	TTCTCCAGCACCTTATTGA	58

Fuente: Elaboración propia

7.2 Amplificación y purificación de los vectores pDC311.2-OFF-EGFP, pDC311.2sh β gal-EGFP y pBHGlox Δ 1,3Cre

En 10 mL de medio LB/ampicilina (100µg/mL), se dejaron crecer bacterias *Escherichia coli* con el plásmido pDC311.2-OFF-EGFP y en otro tubo bacterias *E. coli* pBHGloxΔ1,3Cre en agitación a 200 rpm, 37°C, durante toda la noche. Para la purificación de los plásmidos se utilizó kit E.Z.N.A.™ Plasmid Miniprep (Omega Bio-Tek). Las bacterias fueron centrifugadas a 5000 g por 7 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante fue aspirado y el pellet fue resuspendido en 250 µL de la solución I que contiene ARNasa recomendada por el kit. Luego, se agregaron secuencialmente 250 µl de solución II y 350 µL de solución III, ambas incluidas en el kit de extracción. La mezcla fue agitada fuertemente y centrifugada a 13000 g por 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante fue recuperado, y puesto en una columna tipo II HiBind™ (incluida en el kit) y centrifugado a 13000 g por 1 minuto a temperatura ambiente. El DNA plasmidial unido a la matriz de la columna fue lavado con DNA Wash Buffer (incluida en el kit) y eluído con 50 µL de agua libre de nucleasas. El DNA plasmidial recuperado y fue cuantificado por absorbancia a 260 nm.

7.3 Ensayo de restricción de los vectores adenovirales pDC311.2-OFF-EGFP.

Se realizó un ensayo de restricción con 5 µg del vector pDC311.2-OFF-EGFP, y con las enzimas de restricción PACI (New England Biolabs, NEB), y ASCI (NEB), Buffer 4 (NEB), y agua de grado de biología molecular, en un volumen final de 50 µL. Se incubó en termociclador a 37°C por 4 horas y luego a 80°C para detener la acción de las enzimas durante 10 min. Como control se utilizó 1 µg del vector sin las enzimas de restricción.

7.4 Purificación por gel del vector adenoviral pDC311.2-OFF-EGFP

Se preparó un gel de agarosa al 1% p/v teñido con bromuro de etidio y se sembró 50 µL del producto de la digestión y en otro carril 10 µL del producto sin digerir. Se corrió la electroforesis

a 100 volts por 50 minutos. Posteriormente se cortó el gel en el sector donde se obtuvo el producto digerido (plásmido linealizado) en el transiluminador. La banda se purificó utilizando el kit E.Z.N.A® Gel Extraction (Omega Bio-Tek). Se agregó al trozo de gel 275 µL de Buffer Binding y se llevó a un termoblock por 7 minutos a 60°C. La solución se llevó a una columna HiBind® DNA mini column (incluida en el kit) y se centrifugó a 10000 g por 1 minuto a temperatura ambiente, se le agregó 300 µL de Buffer Binding y se centrifugó a 13000 g por 1 minuto a temperatura ambiente. Se eliminó el filtrado y se lavó la columna dos veces con 700 µL de SPW Wash Buffer y se centrifugó a 13000 g por 1 minuto. Se agregó en el centro de la columna 50 µL de agua de grado de biología molecular y se incubó por 2 minutos a temperatura ambiente, luego se centrifugó a 13000 g por 1 minuto, y la elución de purificación se almacenó a -20°C. La cuantificación del plásmido se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,2% p/v, donde se sembró el 10% de la elución de purificación y la electroforesis se corrió a 100 volts por 35 minutos, se observó la banda mediante el transiluminador y se cuantificó midiendo la intensidad de la banda en el programa Image J 1.50i 2016 (NIH).

7.5 Clonamiento de shARN DAGL α en el vector shuttle adenoviral pDC311.2-OFF-EGFP purificado

Se ligó 10 µg de oligo shARN sense y 10 µg del oligo antisense, se calentó en el termociclador a 90°C por 3 minutos y después a temperatura ambiente por 60 minutos. Luego se realizó la reacción de ligación del plásmido con el shARN, donde se utilizó 10 ng del plásmido, 1 µL del mix shARN, 2 µL de Buffer T4 10X (NEB), 1 µL de T4 ligasa (NEB), y agua de grado de biología molecular hasta completar 20 µL de volumen final, como control se realizó la misma reacción pero sin la enzima T4 ligasa. Se dejó en termociclador a 16°C durante toda la noche y se almacenó a 4 °C.

7.6 Transformación bacteriana

Se escogió un vial de bacterias One Shot™ TOP10 *E.coli* químicamente competente (Invitrogen) y se descongeló en hielo, se agregó en un tubo de reacción 25 µL de bacterias y 4 µL de mix de ligación, como control se realizó la misma reacción pero se le agregó 4 µL de mix de control de ligación. Las reacciones se incubaron en hielo por 30 minutos y se les realizó un shock térmico en termoblock a 42°C por 30 segundos, y luego se incubaron en hielo por 2 minutos. Se les agregó 250 µL de medio SOC (Thermo Fisher Scientific) y se agitó por 60 minutos a 200 g a 37°C. Posteriormente el tubo fue centrifugado a 5000 g por 5 minutos. Una vez centrifugado se retiró el sobrenadante del tubo, dejando 100 µL de medio remanente. Las bacterias fueron resuspendidas y sembradas en placas de agar LB/ampicilina 100 µg/mL. Las placas fueron incubadas toda la noche en una estufa a 37°C. Las colonias obtenidas después de la incubación fueron aisladas y crecidas en medio LB/ampicilina 100 µg/mL para proceder a seleccionar los clones obtenidos y purificar los plásmidos.

7.7 Verificación del inserto shARN mediante ensayo de restricción y secuenciación

Para el ensayo de restricción del pDC311.2-shDAGL α -EGFP se utilizó 1 µg de plásmido purificado de cada colonia para corroborar el inserto del sh en el plásmido. Se utilizaron las enzimas PACI y ASCI (NEB) y el mix de reacción se incubó en termociclador a 37°C por 4 horas, y luego a 65°C por 20 minutos. Se realizó una electroforesis con un gel de agarosa al 1% p/v teñido con bromuro de etidio a 70 volts por 50 minutos. La secuenciación se realizó en las dependencias de la Pontificie Universidad Católica de Chile, Santiago, donde las muestras fueron procesadas en un ABI PRISM 3500 xl Applied Biosystems. Para ver si los clones eran positivos se analizaron los resultados de secuenciación realizando un BLASTn contra el shARN de DAGL α . Los clones positivos se amplificaron y purificaron.

8. Generación de Adenovirus AdshDAGL α y Adsh β gal

8.1 Transfección de células HEK293T con plásmido pdc311.2-shDAGL α -EGFP y pdc.311.2-sh β gal-EGFP

Se sembraron 100.000 células (en cada pocillo) de HEK293T en placas de 6 pocillos, cuando alcanzaron un 70-80% de confluencia se utilizaron para los ensayos de transfección. Se aspiró el medio de los pocillos y se dejaron incubando con 2 mL de Opti-MEM® (Gibco®, Thermo Fisher Scientific) a 37°C por 2 horas en oscuridad. Luego se realizaron 2 reacciones: La reacción A contiene (para un área de 9,5 cm de cada pocillo): 125 μ L de Opti-MEM®, 1000 ng de plásmido pdc311.2-shDAGL α -EGFP o pdc.311.2-sh β gal-EGFP. La reacción B contiene (para un área de 9,5 cm de cada pocillo): 125 μ L de Opti-MEM®, 10 μ L lipofectamina® 2000 (Thermo Fisher Scientific). Se incubaron los tubos de cada reacción a temperatura ambiente por 5 minutos, luego se agregó el contenido del tubo de la reacción A al tubo de la reacción B por goteo y se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos. Se tomó todo el contenido del tubo B y se depositó en las placas en forma de espiral, y se incubó en la estufa a 37°C por 4 horas. Transcurrido este tiempo se aspiró el medio de los pocillos y se les agregó medio DMEM-HG con 2% v/v de SBF. Como control se realizó reacciones en ausencia de plásmido. Se observó fluorescencia después de 24-48 horas post-transfección en microscopio invertido Eclipse Ti-E (Nikon).

8.2 Generación de adenovirus en HEK293A

El adenovirus Ad-shDAGL α y Ad-sh β gal fue construido a partir de la recombinación del plásmido pBHGllox Δ E1,3Cre, que contiene la delección de los genes E1 que a su vez se encuentran expresados en la línea celular HEK293A y el vector que contiene el shARN para

DAGL α , (pDC311.2-shDAGL α), o shARN para β Galactosidasa (pDC311.2-sh β Gal) (Fig. 4 B). Para ello, se sembraron 100.000 células HEK293A de pasajes tempranos en placas de cultivo de 6 pocillos (Corning® Costar®) y cuando se encontraban con un 70% de confluencia, de acuerdo al protocolo entregado por el fabricante, se realizó la cotransfección. Previo a la cotransfección, las células se mantuvieron con medio Opti-MEM® (Gibco®, Thermo Fisher Scientific) a 37°C durante 2 horas, transcurrido este tiempo las células se cotranfectaron con ambos vectores en relaciones molares de 1:4 y 1:6, con Lipofectamina® 2000 (Invitrogen). Las células se mantuvieron en cultivo por 10 días con adición de medio DMEM-HG 10% v/v SBF cada 3 días, al cabo de los cuales sólo una pequeña población de ellas presentaba efecto citopático. Se seleccionaron los pocillos que presentaban mayor efecto citopático y se recolectaron los adenovirus mediante lisis celular a través de shock térmico. Para ello, las células se rasparon mecánicamente y se traspasaron a un tubo Falcon® de 15 mL, y se congelaron en nitrógeno líquido y fueron llevadas a 37°C en baño termoregulado hasta total descongelamiento, posteriormente se mezclaron por vortex y se repitió el procedimiento 2 veces. Los restos celulares se eliminaron mediante centrifugación a 5000 g por 5 minutos y el sobrenadante fue filtrado, a través de un filtro de poro de 0.45 μ m y se agregó a placas de cultivo de 6 pocillos (Corning® Costar®) con células HEK293A a un 70% de confluencia, para ser amplificado. Al cabo de una semana todas las células de los pocillos presentaban efecto citopático y los virus se colectaron y reamplificaron en placas de 10 cm de diámetro. Posteriormente, los adenovirus se titularon en células HEK293T de acuerdo al protocolo descrito por el kit Adeno-X™ Rapid Titer (Clontech Laboratories Inc.), sin embargo, debido a que nuestros vectores adenovirales codifican el gen reportero EGFP, se utilizó como indicador de infección adenoviral la expresión de EGFP, en vez de la expresión de la proteína hexon del

adenovirus, como lo describe el kit. Determinamos que los virus tenían un título de $3,5 \times 10^9$ ifu/mL para Ad-shDAGL α , y un título de $1,75 \times 10^9$ ifu/mL para Ad-sh β gal, ambos adenovirus mostraron una alta expresión de EGFP, y no produjeron un efecto tóxico en las células. Luego los adenovirus se fraccionaron en alícuotas menores y se almacenaron a -80°C para posteriores ensayos.



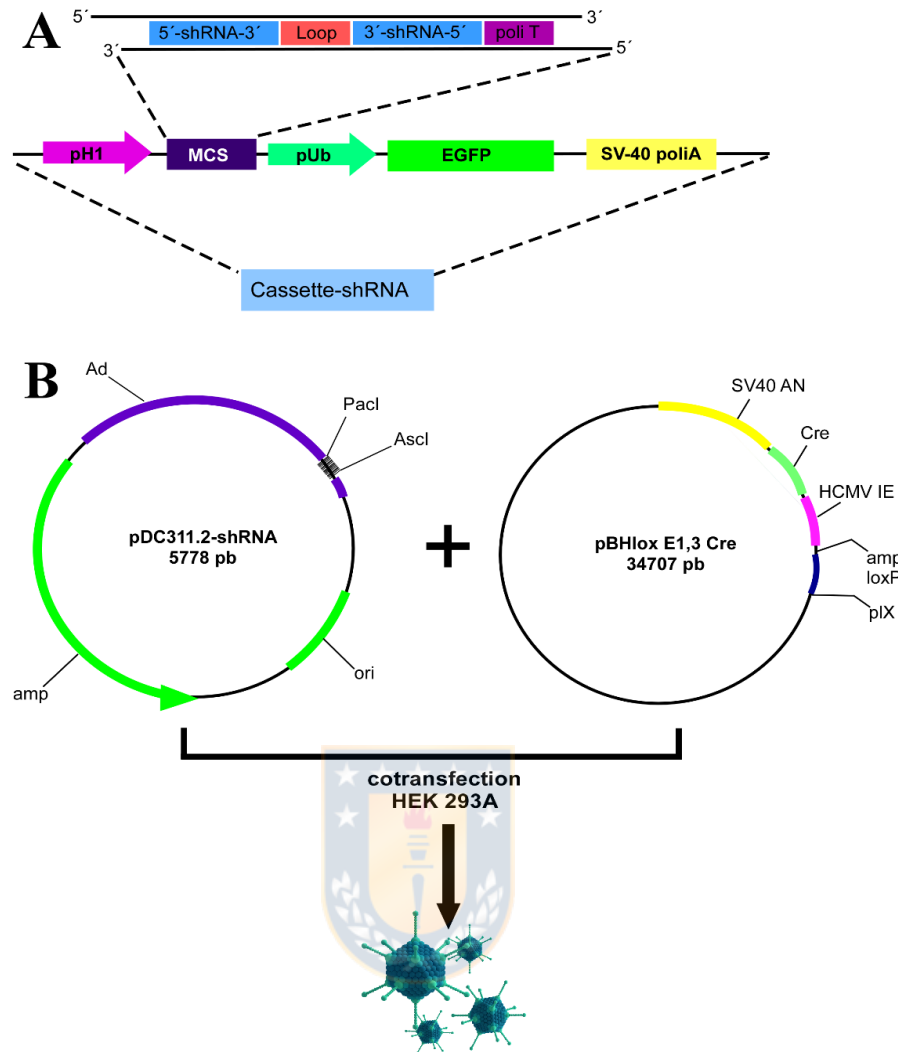


Figura 4. Diseño y generación de un adenovirus shDAGL α

A: Esquema de la construcción del vector adenoviral pDC311.2-shDAGL α -EGFP. **B:** Producción de partículas adenovirales por la recombinación de los vectores pDC311.2-shDAGL α -EGFP con pBHlox Δ E1,3 Cre, en células HEK293A. MCS: sitio de múltiple clonamiento, pH1: promotor H1, pUb: promotor de ubiquitina humano; EGFP: proteína fluorescente verde; SV40-polyA: señal de poliadenilación de SV40 virus. Fuente: Elaboración propia.

9. Ensayos de transducción adenoviral *in vitro* e *in vivo*

9.1 Ensayo de transducción adenoviral en cultivo primario de tanicitos hipotalámicos

Se realizaron ensayos de tiempo de transducción, viabilidad celular, qRT-PCR, inmunocitoquímica y *western blot* (WB) en cultivos primarios de tanicitos transducidos con Ad-shDAGL α o Ad-sh β gal. Para realizar el ensayo de tiempo de transducción y viabilidad se sembró una cantidad de 50.000 células por pocillo en placas de 24 pocillos. Para los ensayos de qRT-PCR se sembró una densidad de 250.000 células por pocillo en placas de cultivo de 6 pocillos, y para el ensayo de WB se sembró una densidad de 1×10^6 células en un frasco de cultivo T25. La transducción se realizó incubando los tanicitos por 24 horas con 5×10^7 ifu/mL de adenovirus, Ad-shDAGL α o Ad-sh β gal, los que fueron diluidos en medio de cultivo (MEM, Gibco BRL). El medio MEM fue suplementado con 2% v/v de SBF (Invitrogen), penicilina 100 U/mL, estreptomycin 100 μ g/mL (Invitrogen), y fungizona 2.5 μ g/mL (Invitrogen). La utilización de un bajo porcentaje de SBF, otorga factores de crecimiento para que la célula pueda dividirse, se vuelve importante para conservar el episoma en la célula, pues al ocurrir la división celular este no permanece en las células hijas debido a que es una transducción transiente. Luego de 24 horas de realizada la transducción las células se mantuvieron en medio fresco, libre de virus, hasta alcanzar el tiempo de 48, 72, 96, 120 horas posterior a la transducción, al cabo de las cuales se realizaron experimentos de tiempo de transducción, viabilidad celular, qRT-PCR y WB.

9.2 Evaluación de la capacidad de transducción de Ad-shDAGL α y Ad-sh β gal en cultivo primario de tanicitos.

Tanto el adenovirus generado, Ad-shDAGL α , como el adenovirus control, Ad-sh β gal, poseen el gen reportero EGFP corriente abajo de la secuencia codificante para el shARN para DAGL α o β -galactosidasa en el vector de expresión, respectivamente. Esto permitió evaluar el porcentaje de las células que se encuentran transducidas, luego de 48, 72, 96, y 120 horas. Las células se sembraron sobre cubreobjetos previamente cubiertos con poli-L-lisina 0.2 mg/mL (Sigma) por 30 minutos en placas de cultivo de 12 pocillos. Transcurrido el tiempo de transducción (48, 72, 96 y/o 120 horas) las células se fijaron en PFA al 4% p/v, diluido en PBS (pH 7,4), a temperatura ambiente por 30 minutos, en oscuridad. Posteriormente, se lavaron los cubreobjetos cinco veces durante 3 minutos con Tris-fosfato 10 mM (pH 7,8) BSA 1%. Posterior a los lavados se permeabilizó la membrana con Tris-BSA-tritón X-100 al 0,2% durante 20 minutos, y se incubó el marcador nuclear TOPRO-3 con una dilución 1:1000, durante 15 minutos. Luego se hicieron 5 lavados de 3 minutos cada uno con Tris-fosfato 10 mM (pH 7,8) BSA 1%. Finalmente se montaron los cubres en un portaobjetos con medio de montaje para fluorescencia (DAKO) y se dejaron a temperatura ambiente y en oscuridad por 30 minutos. Las células fueron observadas utilizando un microscopio de fluorescencia confocal LSM700 (Zeiss). Los porcentajes obtenidos se calcularon en base al total de núcleos teñidos con TOPRO-3 y las células que expresaban el gen reportero EGFP en diferentes campos.

9.3 Evaluación de la sobrevida celular en cultivo primario de tanicitos transducidos con Ad-shDAGL α y Ad-sh β gal.

De los cultivos transducidos por un tiempo de 48, 72, 96 y 120 horas se cuantificó el número de células vivas que se encontraban en cada pocillo (4, por condición). Para ello, se lavó con PBS (pH 7,4), luego se agregó 300 μ L de Tripsina/EDTA y se incubaron a 37°C durante 2 minutos. Para detener la acción de la tripsina, se agregaron 700 μ L de MEM suplementado con 10% v/v SBF. Para realizar el recuento y estimación de la viabilidad celular, se utilizó el método de exclusión con azul de tripán 0,2% p/v, donde se tomó una alícuota de 50 μ L de células tripsinizadas y 50 μ L de azul de tripán. Se cuantificaron las células vivas y muertas en cámara de Neubauer.

9.4 Transducción *in vivo*.

Se utilizaron ratas adultas de dos meses entre 200-300 g. Las ratas fueron anestesiadas intraperitonealmente (IP) con una mezcla anestésica de ketamina (90 mg/Kg), xilacina (10 mg/Kg) y Pacifor (10 mg/Kg). Posteriormente, mediante estereotaxia se implantó una guía de cánula de acero inoxidable (\varnothing 28 gauss; Plastics One, Roanoke, VA) al tercer ventrículo (3V) basal (bregma -3,14 mm anterior-posterior, lateralidad 0,0 mm, profundidad 9,2 mm), la que fue fijada al cráneo mediante tornillos de montaje de 3/32 mm y acrílico dental. Dentro de la guía de cánula, se implantó una cánula removible (\varnothing 28 gauss; Plastics One, Roanoke, VA), cuya abertura anterior se mantuvo sellada a lo largo de los experimentos, excepto para realizar las inyecciones intracerebroventricular (i.c.v) (Fig. 5). Las ratas fueron alojadas individualmente luego de la cirugía y se mantuvieron en recuperación durante 120 horas. Durante este período los animales fueron inyectados sub-epidermalmente cada 12 horas con el analgésico tramadol

(2 mg/Kg), para reducir el dolor e incrementar la recuperación post-operatoria. Posteriormente, los animales fueron anestesiados con isoflurano gaseoso e inyectados i.c.v. con 30 μ L de los adenovirus control (Ad-sh β gal) o inhibidor (Ad-shDAGL α) a una concentración de 5×10^7 ifu/mL, utilizando una cánula (\varnothing 28 gauss) que llegó a los 9,2 mm de profundidad. Luego de 96 y 120 horas post-transducción los animales fueron sacrificados con sobredosis de anestésicos y se les extrajo el cerebro, donde se utilizaron para ensayos de WB, e inmunohistoquímica.



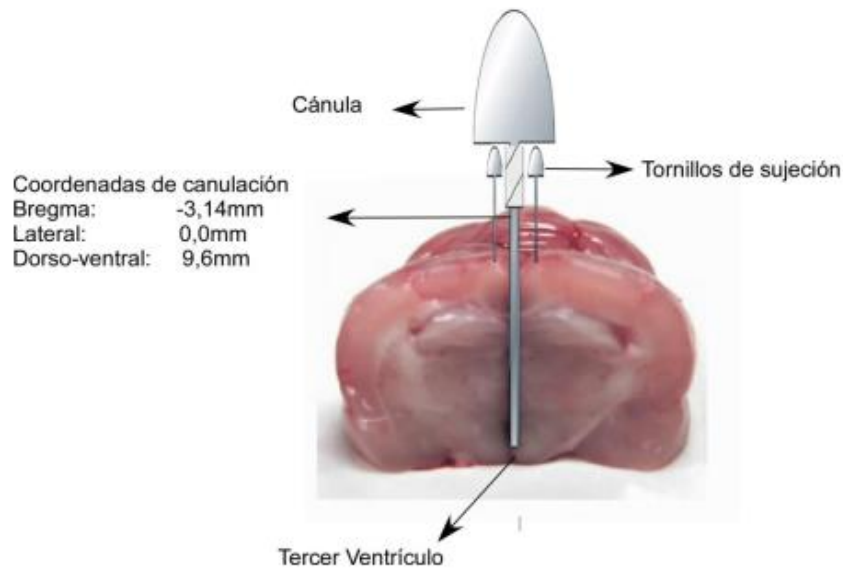


Figura 5. Representación esquemática del posicionamiento de cánula en el cerebro de rata. A partir del punto de referencia bregma se ubicó las coordenadas precisas para instalar la guía de cánula y llegar al tercer ventrículo hipotalámico (bregma 3.14 mm, lateralidad 0.0 mm, dorso-ventral desde la superficie cerebral 9.6 mm). Se horadó en el cráneo con una troca quirúrgica para el posicionamiento de la guía de cánula y 2 tornillos de sujeción a 0,5 cm aproximadamente del punto de canulación. Fuente: Elaboración propia.

9.5 Evaluación de la expresión de neuropéptidos hipotalámicos en respuesta a la inyección i.c.v. de glucosa en animales que fueron transducidos con Adsh β Gal y/o AdshDAGL α .

Para los análisis de expresión de neuropéptidos en respuesta a la inyección i.c.v. de glucosa se utilizaron animales canulados, los cuales se tuvieron un período de recuperación de 120 horas. Posterior al tiempo de recuperación los animales fueron transducidos con adenovirus control (Adsh β Gal) e inhibidor (AdshDAGL α). Luego de 72 horas post-transducción, los animales fueron sometidos a un ayuno de 48 horas hasta completar las 120 horas post-transducción. Posteriormente, los animales fueron anestesiados con isofluorano gaseoso y nuevamente inyectados i.c.v., a través de la guía de cánula, con tampón salino [NaCl 128 mM, KCl 3 mM, CaCl₂ 1,3 mM, MgCl₂ 1,0 mM, NaH₂PO₄ 1,3 mM, Na₂HPO₄ 21 mM, pH 7,4 y 320 mOsm] o glucosa 50 mM preparada en el mismo tampón [320 mOsm, pH 7,4]. Dos horas post-estímulo los animales fueron anestesiados, y sacrificados por dislocación cervical, se disecó el hipotálamo y se extrajo ARN total para los análisis de qRT-PCR (Fig. 6 A).

9.6 Evaluación de la expresión de neuropéptidos hipotalámicos en respuesta a la inyección i.c.v. de glucosa en animales con el inhibidor de DAGL α O-7460

Para los análisis de expresión de neuropéptidos en respuesta a la inyección i.c.v. de glucosa se utilizaron animales canulados, los cuales se tuvieron un período de recuperación de 120 horas. Posterior al tiempo de recuperación los animales fueron sometidos a un ayuno de 48 horas, donde a las 44 horas fueron inyectados i.c.v con el inhibidor selectivo de DAGL α O-7460 (Cayman Chemical Company) 10 μ M, y con el vehículo (control). Posteriormente, los animales fueron anestesiados con isofluorano gaseoso y nuevamente inyectados i.c.v., a través de la

guía de cánula, con tampón salino [NaCl 128 mM, KCl 3 mM, CaCl₂ 1,3 mM, MgCl₂ 1,0 mM, NaH₂PO₄ 1,3 mM, Na₂HPO₄ 21 mM, pH 7,4 y 320 mOsm] o glucosa 50 mM preparada en el mismo tampón [320 mOsm, pH 7,4]. Dos horas post-estímulo los animales fueron anestesiados, y sacrificados por dislocación cervical, se disecó el hipotálamo y se extrajo ARN total para los análisis de qRT-PCR (Fig. 6 B).



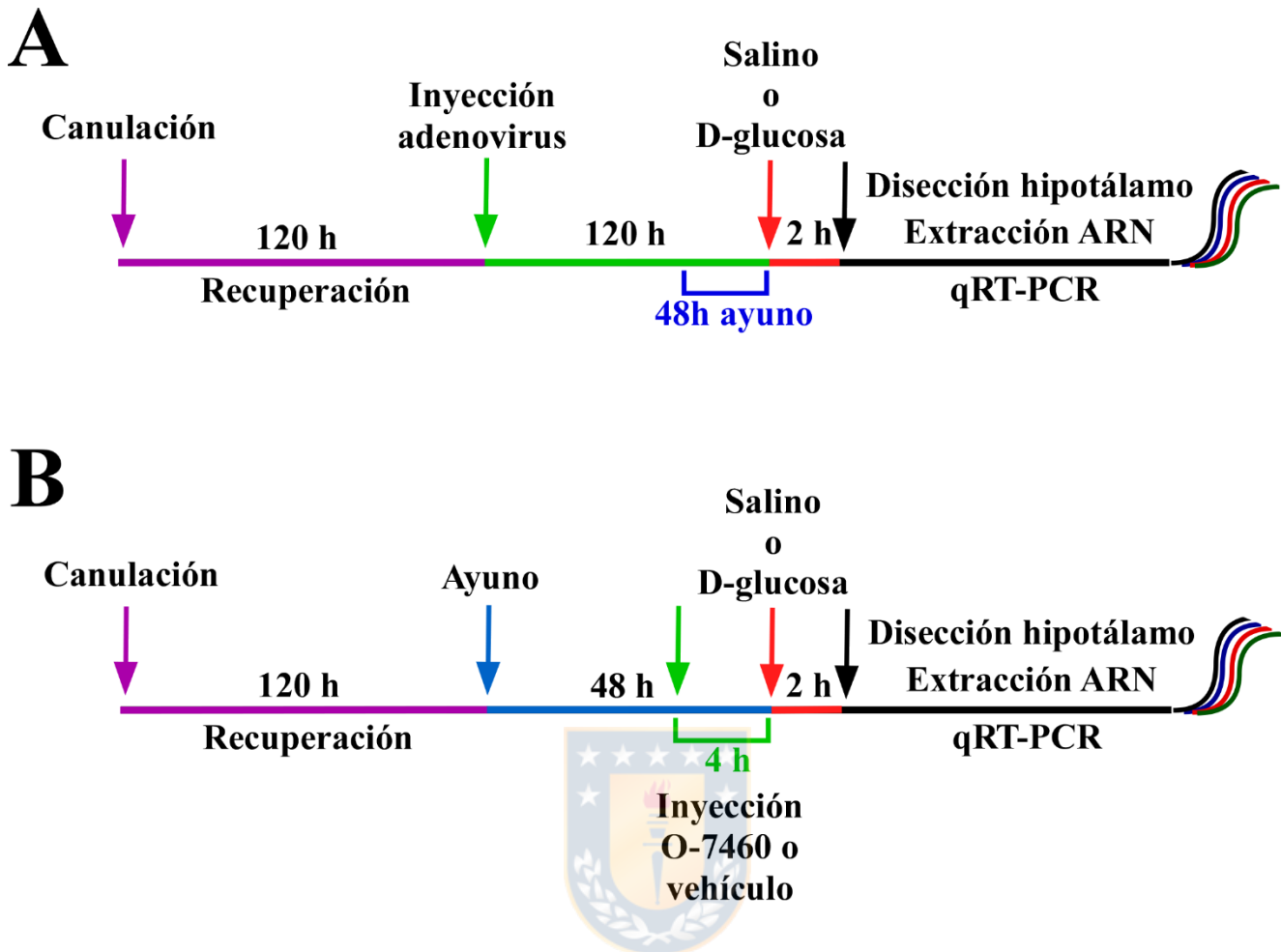


Figura 6. Procedimiento experimental diseñado para los estudios *in vivo*.

A. Diseño experimental para la evaluación de la expresión de neuropéptidos orexígenos y anorexígenos mediante qRT-PCR en animales inhibidos para DAGL α utilizando adenovirus shRNA. **B.** Diseño experimental para la evaluación de la expresión de neuropéptidos orexígenos y anorexígenos mediante qRT-PCR en animales inhibidos para DAGL α utilizando el inhibidor O-7460. Fuente: Elaboración propia

9.7 Evaluación de la ingesta alimenticia en animales tratados con el inhibidor de DAGL α

O-7460

Para la evaluación del comportamiento alimenticio, los animales (n=4) fueron canulados y se recuperaron en un período de 5 días. Posterior a la recuperación los animales se dejaron en ayuno durante 16 horas y se les inyectó i.c.v 10 μ M del inhibidor o-7460 y el vehículo. Dos horas post-inyección, los animales fueron realimentados y se realizó la evaluación de las modificaciones en el comportamiento alimenticio, observando parámetros como la ingesta de alimentos, velocidad de la ingesta, número de eventos de alimentación, etc. Para llevar a cabo estos experimentos, luego de la canulación, los animales fueron reubicados en jaulas de alimentación (VitalView, Mini Mitter, Philips Respironics), equipadas con un comedero que posee un sensor que detecta cada vez que el animal ingresa al comedero, al interrumpir la señal infrarroja. Estos datos fueron registrados computacionalmente, permitiendo determinar la frecuencia de alimentación en un intervalo de tiempo definido por el experimentador, y el tiempo de permanencia en el comedero. Para ello, durante las 24 horas de alimentación, se les suministro 40 g de alimento para ratas, luego de los cuales se midió la cantidad ingerida durante ese período. La ingesta de alimentos fue expresada como g consumidos por cada 200 g de peso corporal (g/200 g peso corporal). Los eventos de alimentación registrados, fueron definidos como períodos de permanencia dentro de los comederos superiores a 5 segundos, separados entre sí por períodos iguales o superiores a 10 minutos. Por otra parte el intervalo entre comidas es definido como el tiempo que existen entre el término de un evento de alimentación y el inicio del siguiente. Cuando el evento de alimentación excede los 30 minutos, fue considerado como dos eventos de alimentación de 15 minutos cada uno, y se consideró un tiempo de intervalo entre comidas de 0 min entre ellos (Vaughan & Rowland, 2003; Vaughan *et al.*, 2005). Esta

información nos permitió definir los siguientes parámetros de alimentación: Ingesta alimenticia (g/24h), latencia del primer evento de alimentación (min), eventos de alimentación (número), promedio de Intervalos (min), tamaño de alimento promedio (g/eventos de alimentación), duración de alimentación promedio (min/eventos de alimentación), duración del primer evento de alimentación (min) y velocidad de alimentación (g/min). La ingesta alimenticia es definida como los g de comida ingerida durante las 24 horas de prueba. La latencia del primer evento de alimentación corresponde al tiempo que se demora en ocurrir el primer evento de alimentación. El tamaño de alimento promedio fue definido como la ingesta total de alimentos (g) dividido por el número de eventos de alimentación. La duración de alimentación promedio fue calculada dividiendo la duración total de los eventos de alimentación (min) por el número de eventos de alimentación y la velocidad de alimentación, como la ingesta total de alimentos (g) por la duración total de los eventos de alimentación (min).

10. Análisis estadístico

Para cada grupo experimental, los resultados fueron expresado como el promedio \pm desviación estándar del promedio (SEM), y el n hace referencia al número de animales utilizados. Para el análisis estadístico, cada tratamiento fue comparado con su respectivo grupo control. Las diferencias entre los dos grupos fueron evaluadas a través del t-test, seguido de un test de Mann-Whitney para distribuciones no paramétricas. Se consideraron diferencia significativas cuando el valor de $p < 0,05$. Estos análisis fueron realizados en el programa GraphPad Prism 5.0 Software (GraphPad Software Inc.).

III RESULTADOS

1. Estudio de la expresión de genes del SE en cultivos primarios de tanicitos en hipotálamo basal

Mediante análisis de RNAseq y qRT-PCR se evaluó la expresión de diferentes genes del SE. Se analizaron datos de RNAseq, disponible en el laboratorio de biología celular y que fueron realizados en cultivos primarios de tanicitos mantenidos por 2 horas a 2 mM y 15 Mm de glucosa. Los datos fueron analizados con un programa R y graficados como se muestra en la figura 7 A. Las enzimas DAGL α y MAGL de síntesis y degradación de 2-AG, respectivamente, presentan altos niveles de expresión en los cultivos independiente de la concentración de glucosa. Las enzimas encargadas de sintetizar y degradar anandamida (AEA), los receptores cannabinoides CB1R y CB2R, presentan bajísimos o casi nulos niveles de expresión en los cultivos de tanicitos. Además, se evaluó la expresión de las diferentes isoformas de la enzima fosfolipasa C (Fig. 7 B), la cual participa en el metabolismo de los fosfatidilinositol bifosfato (PIP₂) y las vías de señalización celular dependientes de Ca²⁺. En relaciona PLC, se observó que la isoforma β , la cual está estrechamente relacionada con la síntesis de 2-AG (Di Marzo., 2011; García del Caño *et al.*, 2014), se expresa en cultivos primarios tanicitos. Estos resultados nos indican la maquinaria necesaria para la síntesis y degradación de 2-AG estaría expresada en tanicitos cultivados *in vitro*.

Para ratificar estos resultados se evaluó la expresión de DAGL α mediante qRT-PCR, de diferentes tejidos cerebrales, los resultados muestran que la enzima DAGL α se expresa principalmente en muestras de hipotálamo y corteza frontal y no así en otras regiones cerebrales como cerebelo, tronco encefálico u otras regiones corticales (Fig. 8 A). Por otro lado, se

comparó la expresión de DAGL α en hipotálamo vs cultivos primarios de tanicitos (Fig. 8 B), donde no existen diferencias significativas en la expresión de la enzima indicando que los niveles de DAGL α en tanicitos en condiciones de cultivo empleadas son similar al encontrado en tejido hipotalámico.



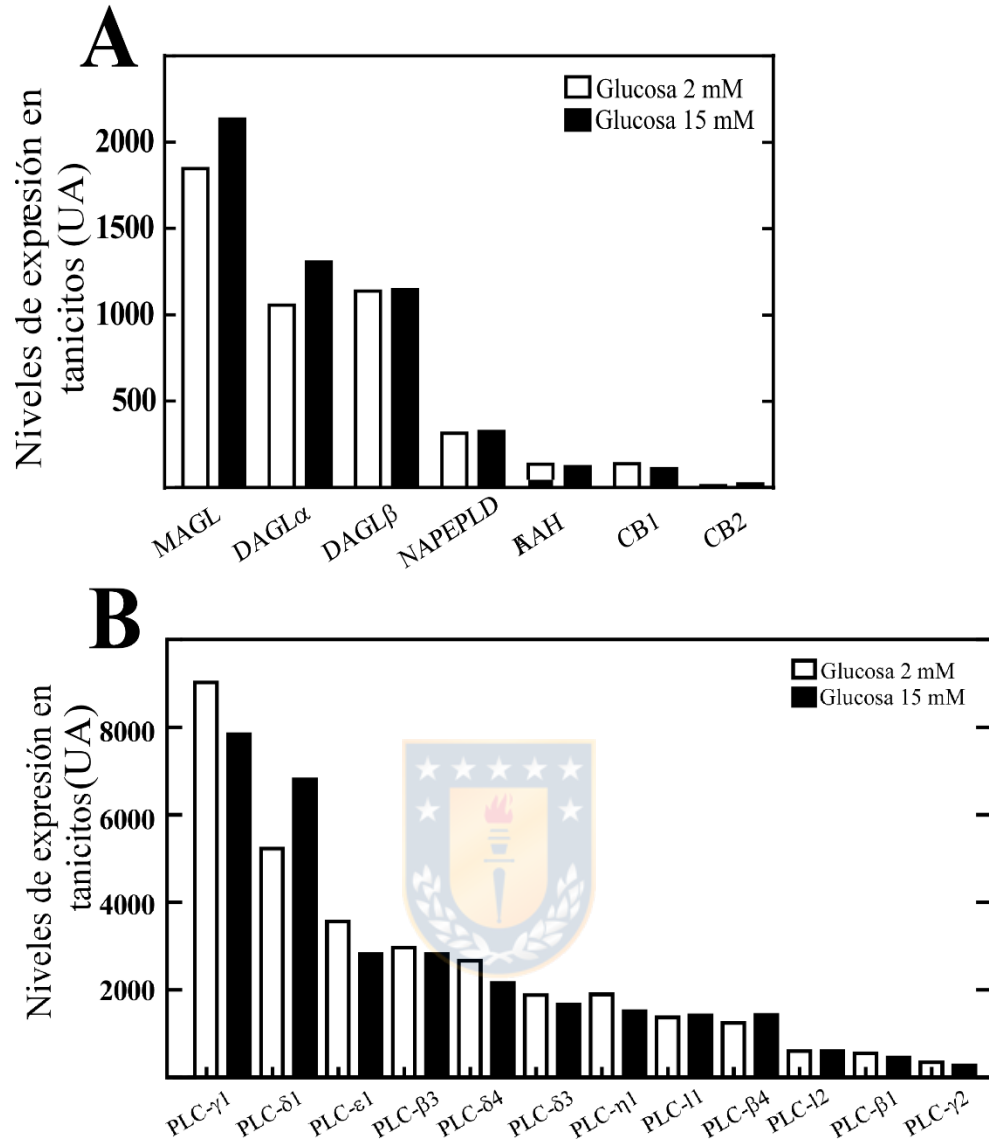


Figura 7. Análisis de genes del SE desde un RNAseq de cultivo de tanicitos en respuesta a glucosa.

A: Análisis de los niveles de expresión desde un RNAseq de diferentes genes del SE en cultivos primarios de tanicitos en respuesta a glucosa. **B:** Análisis de los niveles de expresión desde un RNAseq de diferentes isoformas de PLC en cultivos primarios de tanicitos en respuesta a glucosa. Fuente: Elaboración propia

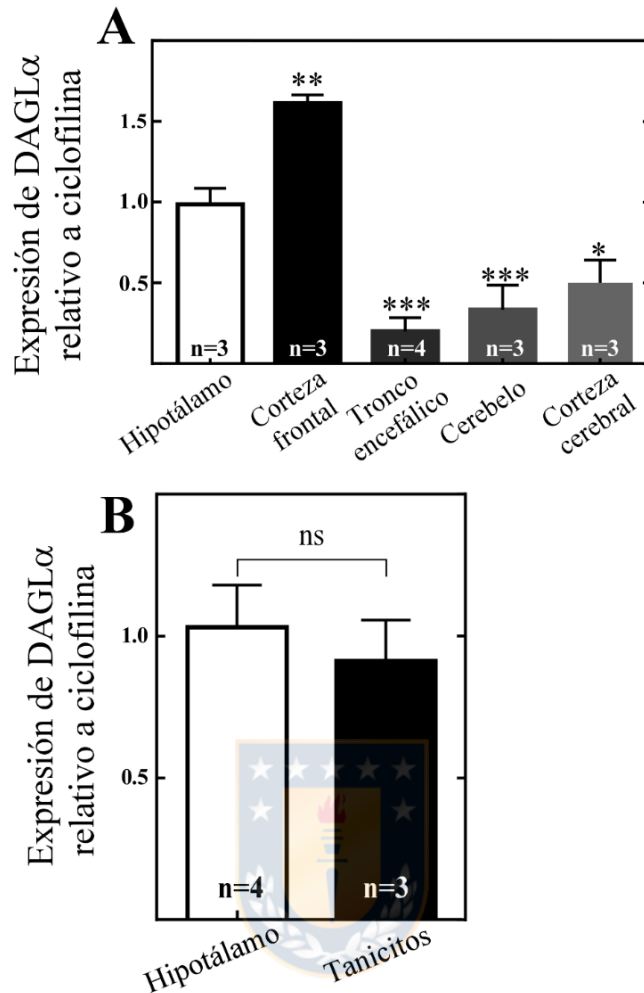


Figura 8. Caracterización de la expresión de DAGL α en diferentes regiones cerebrales y en cultivo de tanicitos mediante qRT-PCR.

A: Análisis de la expresión de DAGL α en diferentes tejidos cerebrales relativo a la expresión de ciclofilina. **B:** Ensayo de qRT-PCR para DAGL α a partir de ARN total obtenido de tejidos de hipotálamo y cultivos primarios de tanicitos, donde no hay diferencia significativa en los niveles de expresión de DAGL α entre ambas muestras. Los resultados representan el promedio \pm desviación estándar. Los análisis estadísticos para A se realizaron utilizando el test ANOVA de una vía y post-test de Bonferroni. ***, $p < 0.001$; **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$. Los análisis estadísticos para B se realizaron utilizando test no paramétrico Mann-Whitney. Fuente: Elaboración propia

2. Generación de un adenovirus que porte un shARN para el silenciamiento de DAGL α

Para cumplir con este objetivo se diseñó y posteriormente clonó un shARN para DAGL α en el vector bicistrónico pDC311.2-OFF-EGFP, disponible en el LBCC. Este vector permite la expresión de un shARN (short hairpin ARN) bajo el comando del promotor H1 y del gen reportero EGFP bajo el control del promotor de ubiquitina humano. A través de esta aproximación se generó el adenovirus AdshDAGL α -EGFP. Para corroborar la correcta construcción del vector shDAGL α se realizó un ensayo de restricción utilizando las enzimas PACI y ASCI para cinco clones positivos, sin embargo, no logramos ver ninguna banda para el shDAGL α . Esto probablemente debido a que el shARNi diseñado posee 64 pares de bases, y la concentración del gel utilizado era muy baja (1% p/v) siendo difícil ser visualizado mediante este tipo de ensayo experimental. Por lo tanto, corroboramos el correcto clonamiento del shARNi para DAGL α mediante secuenciación de los 5 clones en estudio. Mediante un BLASTn se logró determinar que los clones n° 1 y 4 son positivos para shDAGL α (Fig. 9). Posterior a la corroboración del shDAGL α en el vector, se transfectaron células HEK 293T con los clones positivos para shDAGL α . Luego de 48 horas post transfección, se evaluó la expresión del gen reportero EGFP en las células transfectadas con el vector pdc311.2-shDAGLa-EGFP (Fig. 10 A-C), y con el vector control pDC311.2-sh β gal-EGFP (Fig.10 D-F), indicando al correcta capacidad de expresarse para ambas construcciones que utilizaremos en este estudio.

Continuamos con la producción de partículas adenovirales, para ello luego de generar el vector adenoviral que contiene el shDAGL α se procedió a generar partículas adenovirales. Este proceso fue llevado a cabo al co-tranfectar los vectores pDC311.2-shDAGL α -EGFP y pDC311.2-sh β gal-EGFP con el vector genómico viral pBHGlox Δ E1,3Cre, en células HEK 293A.

La generación de estos adenovirus se evaluó mediante la visualización del efecto citopático característicos de las infecciones virales sobre este tipo celular (Fig. 11 A-C) y mediante la expresión de EGFP en las células co-transfectadas por 48 horas. Las partículas adenovirales generadas luego de la cotransfección son capaces de infectar células adyacentes mediante la utilización de una alícuota de medio de cultivo proveniente de células previamente infectadas las partículas adenovirales en estudio. Por otro lado, se puede observar que las células presentan un cambio importante en su morfología, el cual corresponde a la desaparición de prolongaciones en la estructura celular, observándose además, una morfología propia de células incubadas en solución hipotónica.

Por otra parte, el vector *shuttle* (pDC311.2-sh β Gal y pDC311.2-shDAGL α) contiene el gen reporte EGFP, que permite visualizar la expresión en las células que fueron co-transfectadas con estos vectores mediante al señal de EGFP. En este sentido, todo indicó que el ensamblaje del adenovirus y la expresión del gen reportero fue exitosa. Por último, las partículas adenovirales fueron cuantificadas y se evaluó el título óptimo para los ensayos de inhibición en células HEK 293T, considerando tanto la toxicidad de los virus sobre la viabilidad celular, como el porcentaje de infección adenoviral al evaluar la expresión del gen reportero.

De esta forma, determinamos que un título de 5×10^7 ifu/mL genera una transducción cercana al 100% y no produce efectos tóxicos en la células (datos no mostrados). Con estos datos abordamos el estudio del *knockdown* de DAGL α en cultivos primarios de tanicitos hipotalámicos.

BLASTn

```
Sh          CGCGCCTCAATAAGGTGCTGGAGAATTCAAGAGATTCTCCAGCACCTTATTGATTTTTTTT 60
           |||
Plas clon1  CGCGCCTCAATAAGGTGCTGGAGAATTCAAGAGATTCTCCAGCACCTTATTGATTTTTTTT 111

Sh          TAAT 64
           |||
Plas clon1  TAAT 115

Sh          CGCGCCTCAATAAGGTGCTGGAGAATTCAAGAGATTCTCCAGCACCTTATTGATTTTTTTT 60
           |||
Plas clon4  CGCGCCTCAATAAGGTGCTGGAGAATTCAAGAGATTCTCCAGCACCTTATTGATTTTTTTT 122

Sh          TAAT 64
           |||
Plas clon4  TAAT 126
```



Figura 9. Verificación de la inserción del sh en el vector de expresión pDC311.2-off-EGFP

BLASTn de la secuenciación de los clones positivos (clon 1 y 4), con el shDAGL α diseñado.

Fuente: Elaboración propia

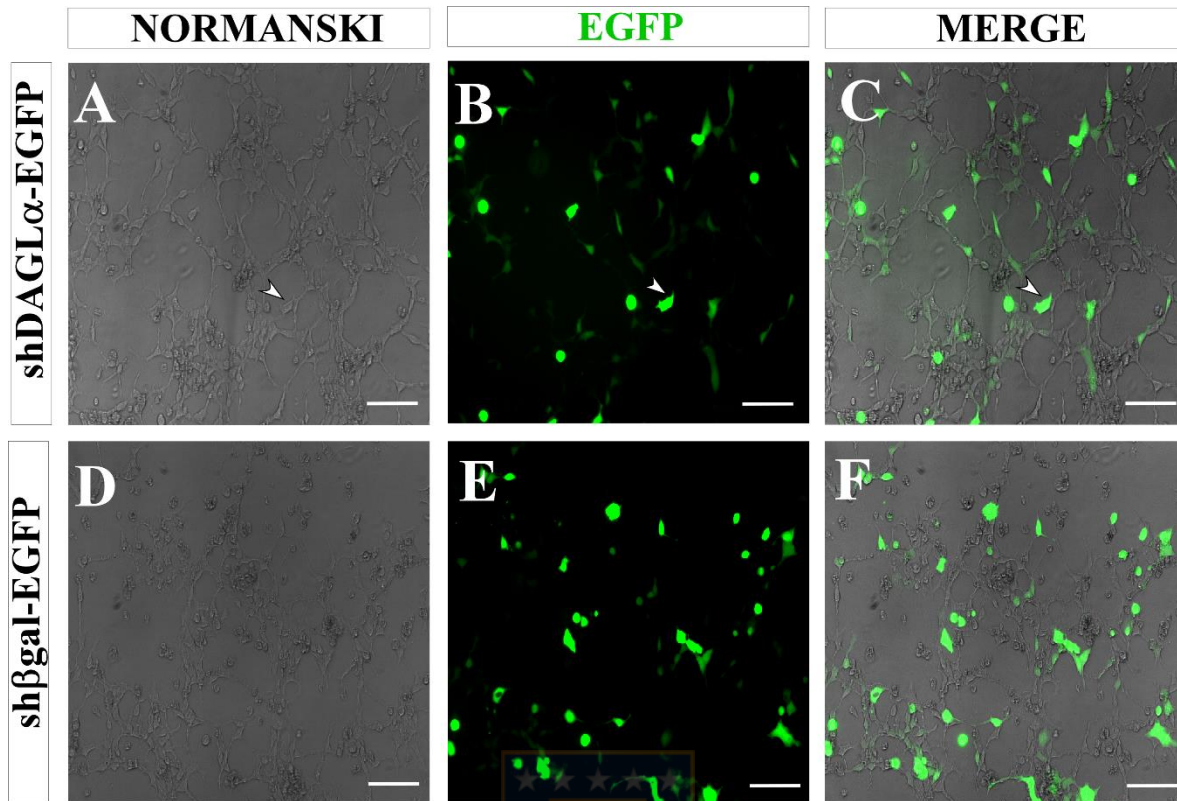


Figura 10. Evaluación de la expresión de EGFP mediante transfección de shARN en HEK293T

A-C: Transfección de células HEK 293T con vector pDC311.2-shDAGL α -EGFP. **A-D:** transfección de células HEK 293T con vector control pDC311.2-sh β gal-EGFP. La expresión de EGFP es observable en todas las células tras 48 h post- transfección. Tamaño de barra 100 μ m. Fuente: Elaboración propia

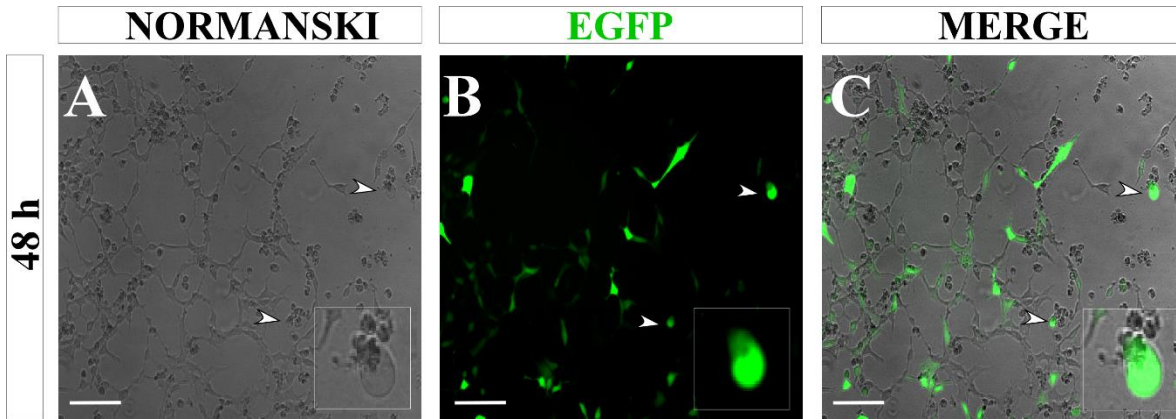


Figura 11. Verificación del armado del virus evaluando el efecto citopático.

A-C: Cultivo celular de HEK 293A co-tranfectados con pDC311.2-shDAGL α -EGFP y con pBHGlox Δ E1,3Cre. En recuadro inferior derecho se muestra una magnificación de un tanicito infectado que presenta efecto citopático. Tamaño de barra 100 μ m. Fuente: Elaboración propia



3. Inhibición de la expresión endógena de DAGL α en tanicitos cultivados *in vitro* utilizando partículas adenovirales.

Posteriormente, evaluamos el adenovirus AdshDAGL α recientemente generado en nuestro laboratorio sobre la expresión de DAGL α en cultivos primarios de tanicitos. Mediante la expresión de EGFP determinamos el tiempo óptimo para realizar las determinaciones de *knockdown* en cultivos confluentes de tanicitos. Principalmente debido a que en esta condición las células no se dividen y mantienen los genes episomales por mayor tiempo.

Determinamos que la transducción adenoviral ocurre eficientemente a las 72 y 96 horas post-transducción, tanto para Adsh β gal (Fig. 12 E y H) como para AdshDAGL α (Fig. 12 B y H). A las 72 horas el porcentaje de células que expresan EGFP de un 68,5 % \pm 6,3 para Adsh β gal y de un 64,7 % \pm 5,5 para AdshDAGL α . A las 96 horas fue de 76,7 % \pm 9,3 para Adsh β gal y de un 75,9 % \pm 9,1 para AdshDAGL α (Fig. 12 H). Posteriormente, analizamos la sobrevivencia celular a las 48, 72 y 96 horas post-transducción, observando más de un 70% de viabilidad en todos los tiempos analizados (Fig.12 G).

Mediante qRT-PCR, evaluamos la efectividad del AdshDAGL α para inhibir la expresión endógena de su gen blanco. Observamos que a las, 72, 96 horas post-transducción se redujo significativamente (aprox. 85% a 90%) la expresión del ARNm de DAGL α (Fig. 13 B y C, barras negras) al comparar con el control de inhibición Adsh β gal (Fig. 13 B y C, barras blancas). Sin embargo, a las 48 y 120 horas no se ven diferencias significativas en los niveles de expresión de DAGL α en comparación con el adenovirus control (Fig.13 A y D).

Por otro lado el análisis por inmunocitoquímica y WB de cultivos de tanicitos transducidos por 96 horas post-transducción, demostró que no existe una inhibición a nivel proteico de DAGL α en

cultivos tratados con el AdshDAGL α en comparación con el adenovirus control (Fig. 14 A-H y 15 A-B). Por otro lado, de estos análisis se puede observar que la expresión de DAGL α abarca el soma o cuerpo celular de los tanicitos, el núcleo y los procesos celulares.

Buscando confirmar el efecto de AdshDAGL α sobre los niveles proteicos de DAGL α realizamos ensayos de WB. Para ello se utilizó como control de transducción la proteína EGFP y como control de carga el gen constitutivo actina. Encontramos que no existen diferencias significativas entre las muestras que nos indiquen inhibición de DAGL α *in vitro* a las 96 horas post-transducción (Fig.15 A-B).



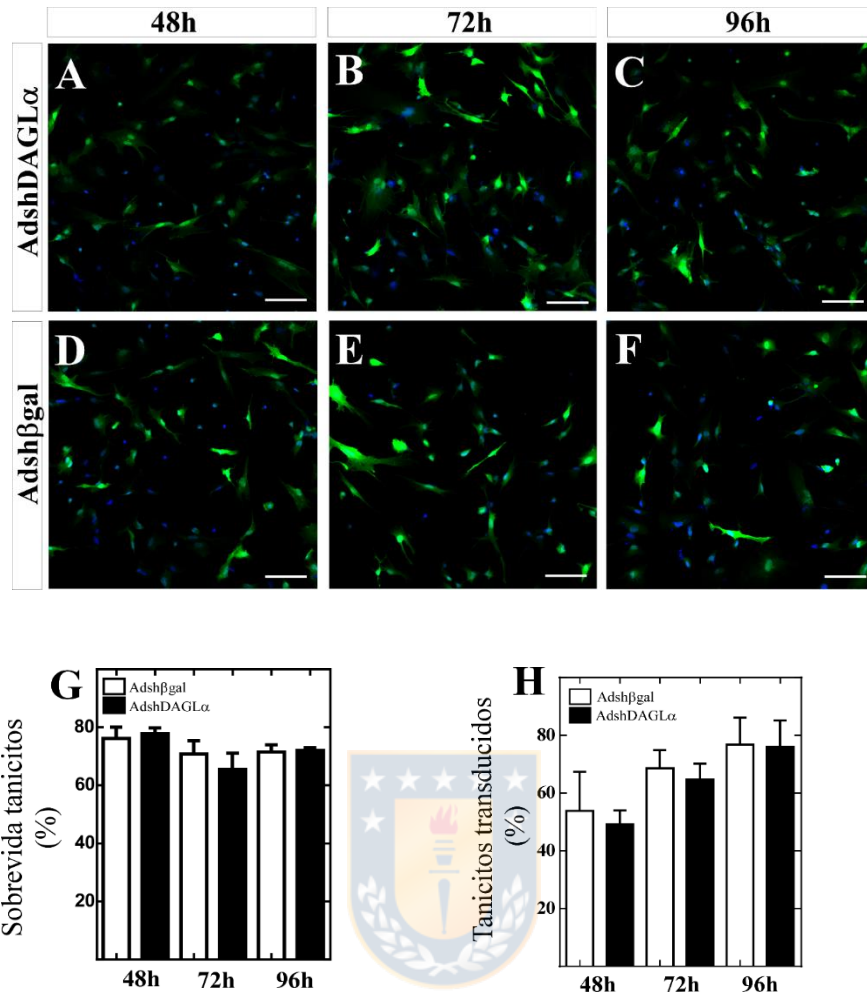


Figura 12. Porcentaje de transducción y sobrevivencia de cultivo de tanicitos transducidos con AdshDAGL α o Adsh β gal.

Expresión de EGFP en tanicitos transducidos con: AdshDAGL α (A-C) o Adsh β gal (D-F). Los núcleos fueron teñidos con la tinción nuclear TOPRO-3 (azul). Tamaño de barra 100 μ m. **G:** Análisis de sobrevivencia realizada en cultivo primarios de tanicitos hipotalámicos transducidos con Adsh β gal (barras blancas) o AdshDAGL α (barras negras). **H:** Porcentaje de tanicitos transducidos con Adsh β gal (barras blancas) o AdshDAGL α (barras negras). Los datos representan el promedio \pm la DE de 4 experimentos independientes (t-test, no pareado). Fuente: Elaboración propia

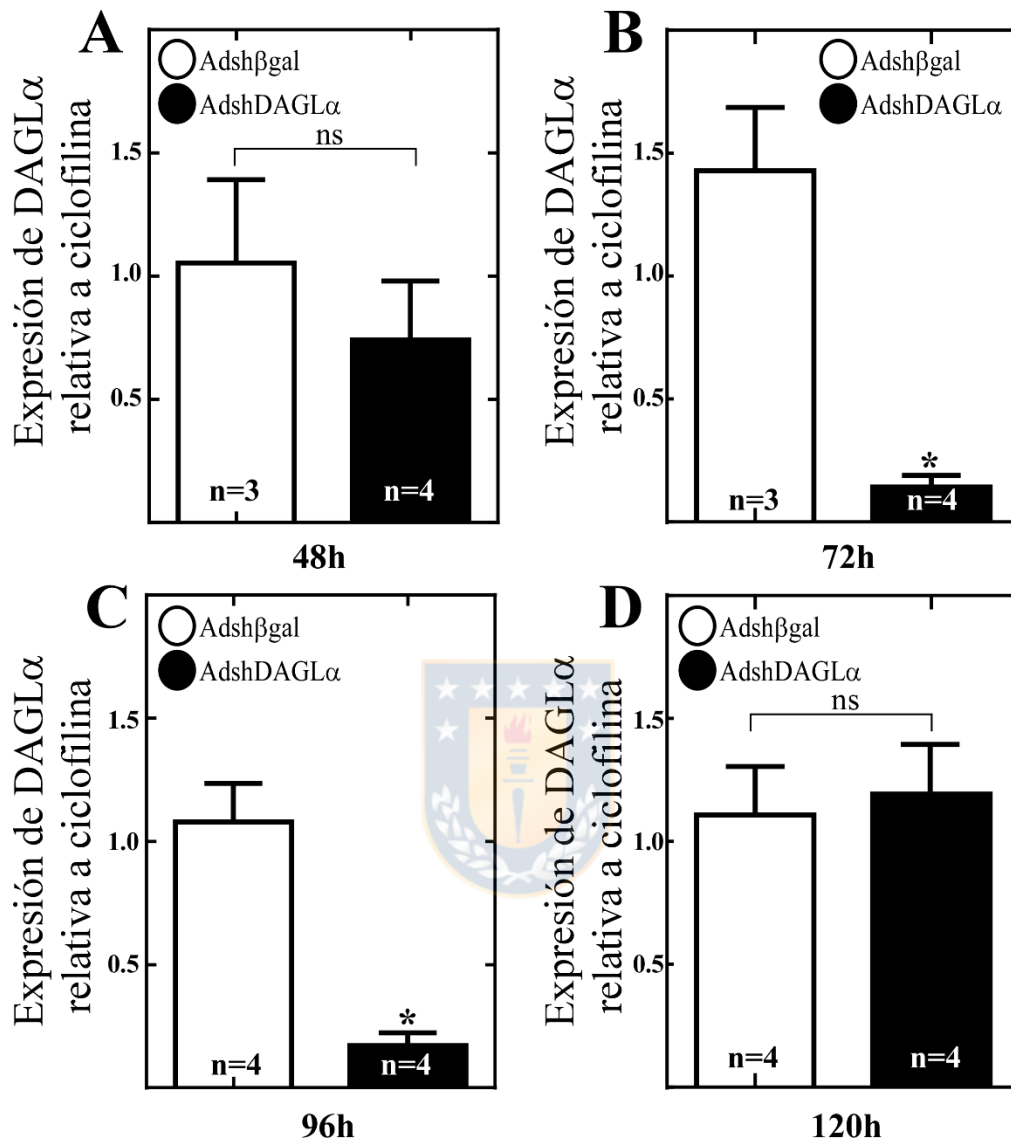


Figura 13. Análisis de expresión de ARNm de DAGLα en cultivo primario de tanicitos transducidos con AdshDAGLα o Adshβgal.

A-D: Análisis de qRT-PCR para DAGLα en tanicitos infectados con Adshβgal (barras blancas) AdshDAGLα (barras negras) por 48, 72, 96 y 120 horas. ns: no significativo. *, $p < 0.05$, (t-test, no pareado). Fuente: Elaboración propia

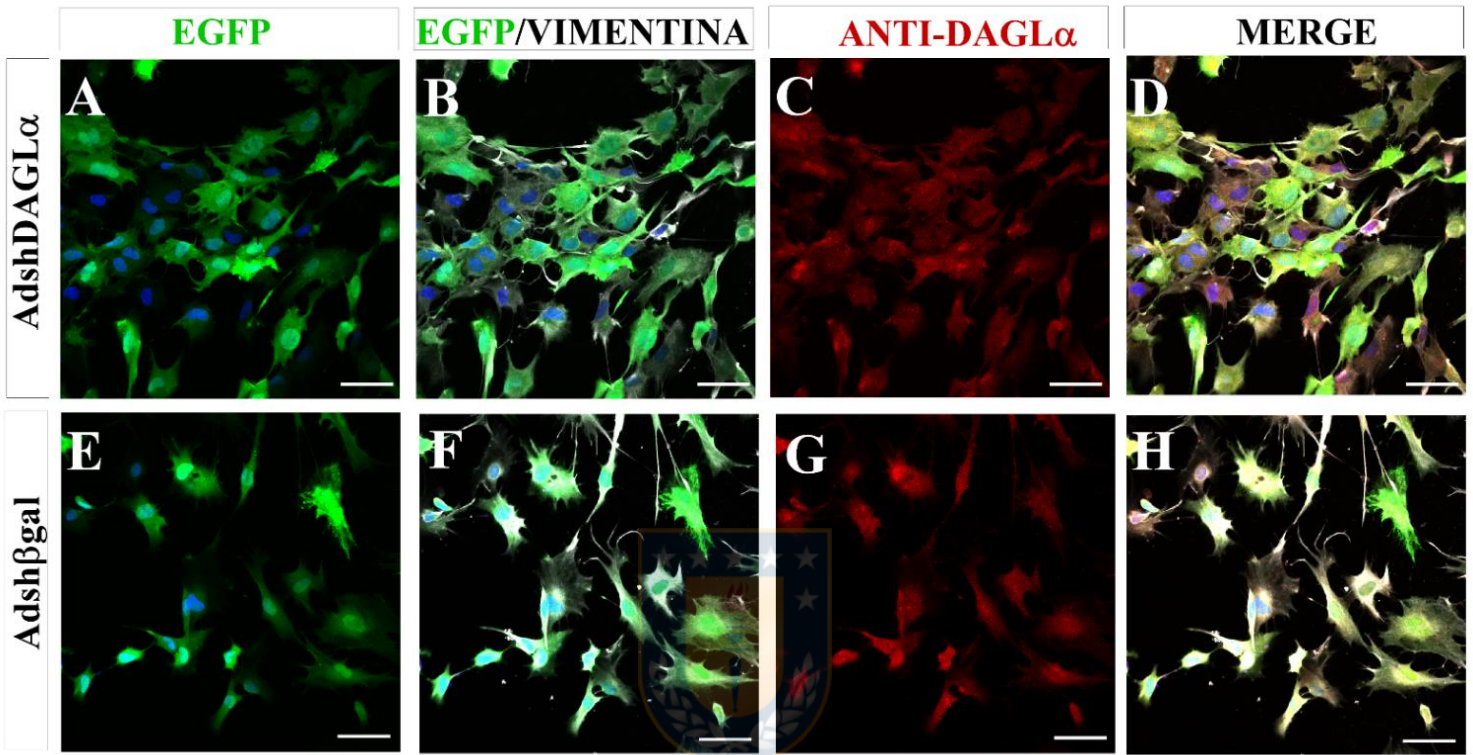


Figura 14. Inmunocitoquímica de DAGL α en cultivos primarios de tanicitos hipotalámicos transducidos por 96 horas con AdshDAGL α o Adsh β gal.

Inmunocitoquímica de tanicitos transducidos con AdshDAGL α (**A-D**) o Adsh β gal (**E-H**). EGFP (verde), vimentina (blanco), DAGL α (rojo). Tamaño de barra 100 μ m. Fuente: Elaboración propia

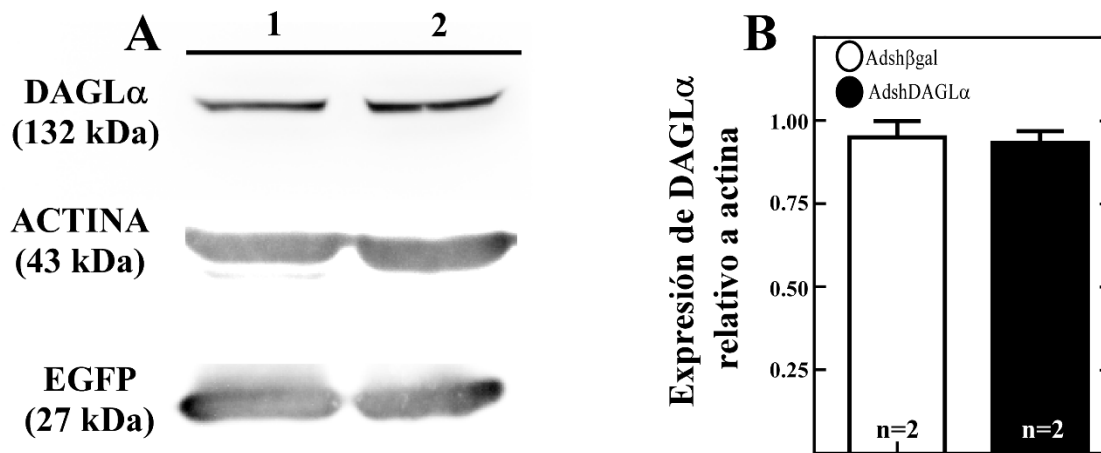


Figura 15. Inmunodetección de DAGL α en cultivo primario de tanicitos hipotalámicos transducidos por 96 horas con AdshDAGL α o Adsh β gal.

A: Análisis de *western blot*. Línea 1: extractos totales de proteína de tanicitos transducidos con Adsh β gal; línea 2: extractos totales de proteína de tanicitos transducidos con AdshDAGL α . **B:** Análisis semicuantitativo de la expresión de DAGL α relativo a actina. EGFP, control de transducción; Actina, control de carga. (t- test no pareado). Fuente: Elaboración propia

4. Evaluación *in vivo* de la transducción del adenovirus AdshDAGL α o Adsh β gal en tanicitos de rata.

Para evaluar la especificidad de la transducción de los adenovirus generados se utilizó la detección de la fluorescencia a 488 nm del gen reportero (EGFP), de toda la región hipotalámica basal mediante microscopía confocal. Para ello usamos, la herramienta *tile scan* y posterior reconstrucción 3D y obtener así una proyección panorámica de máxima intensidad (Fig.16 A). Es posible observar sólo fluorescencia de EGFP en las células que forman las paredes del 3V (Fig. 17 A y E). A través de la colocalización con vimentina y de la morfología de las células (Fig. 17 B y F), se comprobó que las células transducidas con el AdshDAGL α o Adsh β gal corresponden a endotelios, tanicitos (α y β), y procesos de tanicitos que toman contacto con neuronas del NA.

Sin embargo, la transducción *in vivo* a las 96 horas no muestra diferencias significativas en los niveles de DAGL α en comparación con ratas transducidas con el adenovirus control (Fig. 17 C y G).

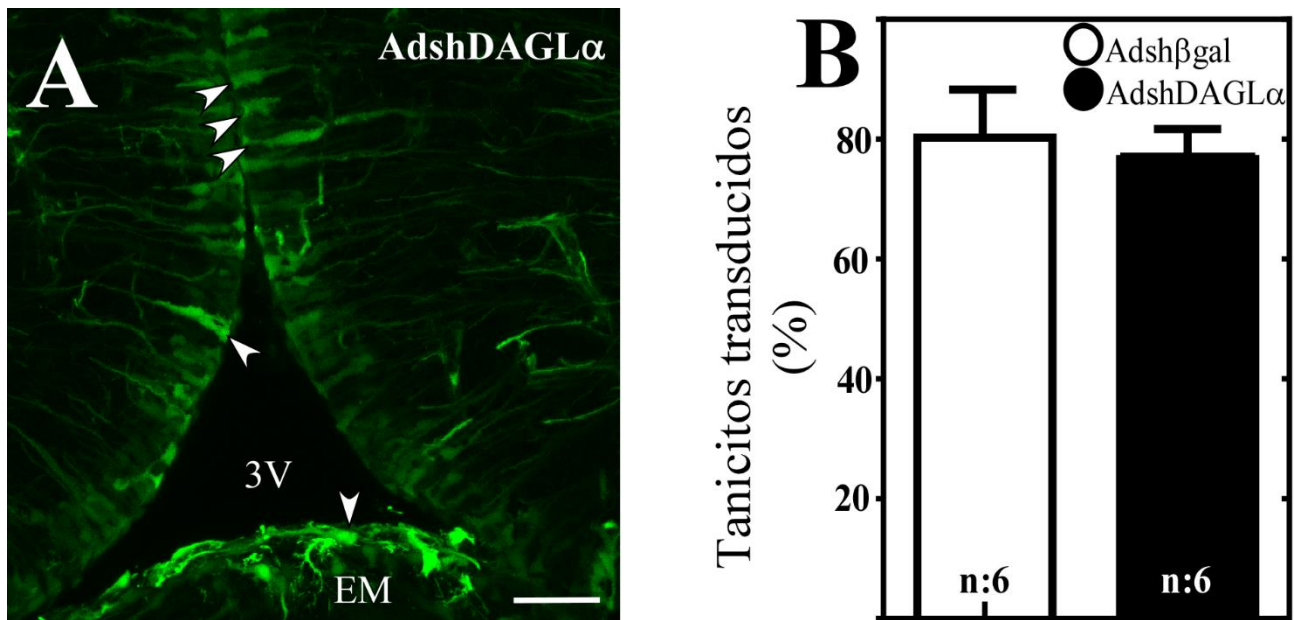


Figura 16. Los tanicitos son transducidos por el AdshDAGL α *in vivo*.

Proyección de máxima intensidad de cortes frontales de hipotálamo basal. **A:** Expresión de EGFP luego de 96 horas post- inyección i.c.v. del AdshDAGL α . Las flechas indican tanicitos que expresan EGFP. 3V, tercer ventrículo; EM, eminencia media. Tamaño de barra 100 μ m. **B:** Porcentaje de tanicitos transducidos *in vivo*. Adsh β gal (barras blancas) o AdshDAGL α (barras negras). (t-test, no pareado). Fuente: Elaboración propia

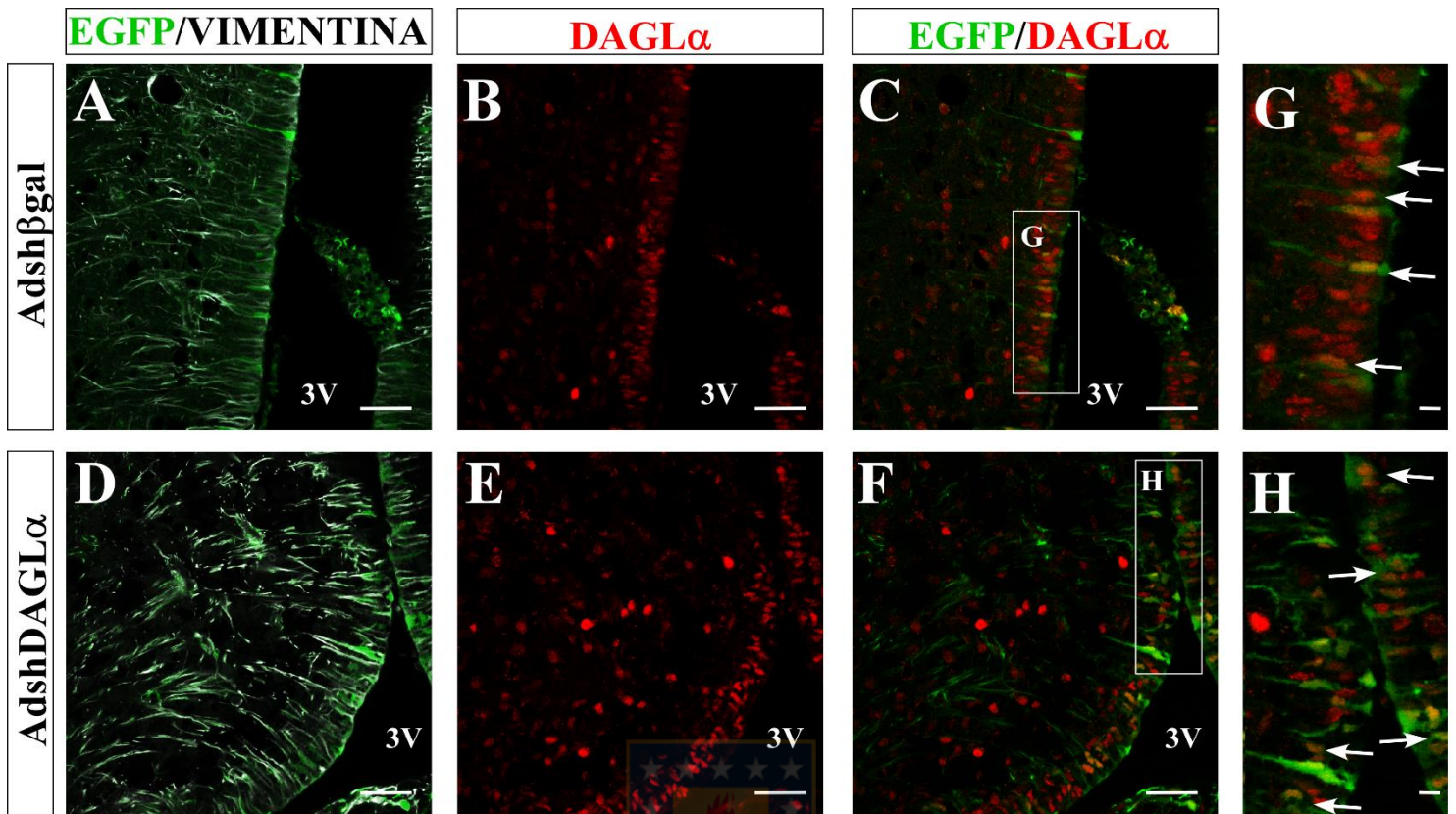


Figura 17. Inmunohistoquímica de DAGL α en 3V del hipotálamo de ratas transducidas con AdshDAGL α o Adsh β gal.

Análisis inmunohistoquímico utilizando microscopia confocal-espectral para el marcador de tanicitos vimentina (blanco), marcador de DAGL α (rojo) y fluorescencia de EGFP (verde) luego de 96 horas post inyección i.c.v. del AdshDAGL α o Adsh β gal. Se utilizó el marcador nuclear Hoechst (azul). **A-C:** transducción con Adsh β gal **D-F:** transducción con AdshDAGL α . **G-H:** Magnificación mayor en tanicitos para evaluar la co-localización de EGFP con DAGL α . Tamaño de barra 100 μ m. Fuente: Elaboración propia

5. Efecto de la transducción del adenovirus AdshDAGL α o Adsh β gal sobre la expresión y localización de DAGL α en hipotálamo basal.

Los experimentos *in vitro* arrojaron una disminución significativa en los niveles de expresión del ARNm para DAGL α a las 96 horas. Sin embargo, utilizando este tiempo, evaluamos ahora *in vivo* la expresión de la proteína DAGL α mediante inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo anti-DAGL α . Se observó que células EGP positivas colocalizan con vimentina siendo estas tanicitos (Fig. 17 A y D). Se observó expresión de DAGL α en toda la pared del 3V como también en los núcleos hipotalámicos (Fig.17 B y E). Además se observó que existe co-localización de tanicitos EGFP positivos con DAGL α (Fig.C y F), y la magnificación de tanicitos muestra que DAGL α se expresa principalmente en los somas de tanicitos (Fig. G y H). Por otra parte, no se observa una clara inhibición, al menos a través de esta técnica. Por lo cual se decidió evaluar la inhibición *in vivo* de DAGL α a 120 horas. Usando este tiempo de inhibición y qRT-PCR observamos que los animales transducidos con el AdshDAGL α disminuyeron aproximadamente un 53% la expresión de ARNm de DAGL α en comparación con animales transducidos con el adenovirus control (Fig.18). A su vez, mediante ensayos de WB a partir de extractos de proteína total de hipotálamo (Fig. 19 A) encontramos que AdshDAGL α produce una disminución significativa que es de un 50% de los niveles de DAGL α vs el efecto que produce el adenovirus control Adsh β gal (Fig. 19 B).

Con el fin de resumir más antecedentes, evaluamos el efecto mediante ensayos de inmunohistoquímica (Fig. 20 A-F). Usando esta aproximación experimental observamos que: células EGFP positivas colocalizan con vimentina corroborando que son tanicitos las células transducidas por los adenovirus (Fig. 20 A y D). La proteína DAGL α se expresa en diferentes

áreas del hipotálamo incluyendo el NA, EM y rodeando el 3V (Fig. B y E). Existe co-localización entre tanicitos EGFP positivos y la enzima DAGL α (Fig. C y F). La magnificación mayor de tanicitos nos muestra que DAGL α se encuentra en el soma y en las dendritas de tanicitos (Fig. G- H y I-J). Además observamos una disminución significativa de inmunoreacción asociada a DAGL α en tanicitos respecto de animales transducidos con Adsh β gal (Fig. 20 K). Para ello se seleccionó aquellos tanicitos EGFP positivos y se cuantificó la intensidad de rojo (DAGL α) de cada uno de ellos. Luego los datos obtenidos fueron procesados en el programa R bajo un script que calcula los valores por célula y por plano Z, obteniendo como resultado final la cuantificación de la expresión de DAGL α en células transducidas con AdshDAGL α o Adsh β gal.



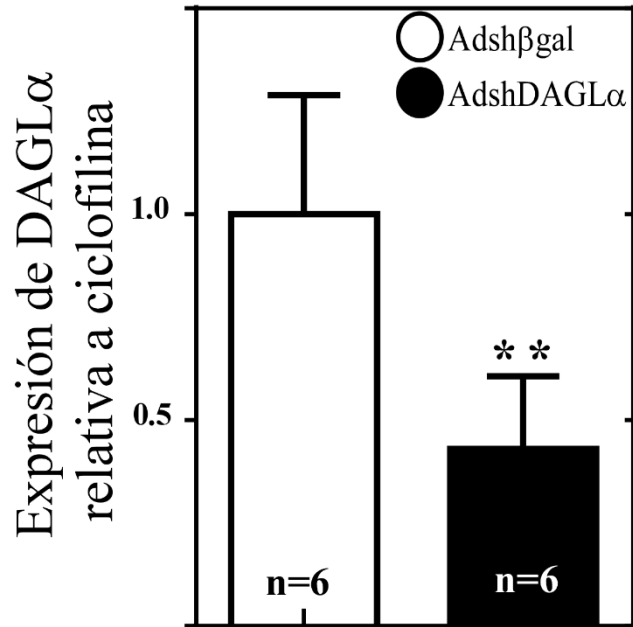


Figura 18. Análisis de expresión de ARNm de DAGL α en hipotálamos de ratas transducidos por 120 horas con AdshDAGL α o Adsh β gal

Análisis de qRT-PCR para DAGL α en hipotálamos de ratas transducidos con Adsh β gal (barras blancas) o AdshDAGL α (barras negras) por 120 horas, relativo a ciclofilina. **, $p < 0.01$, (t-test, no pareado). Fuente: Elaboración propia

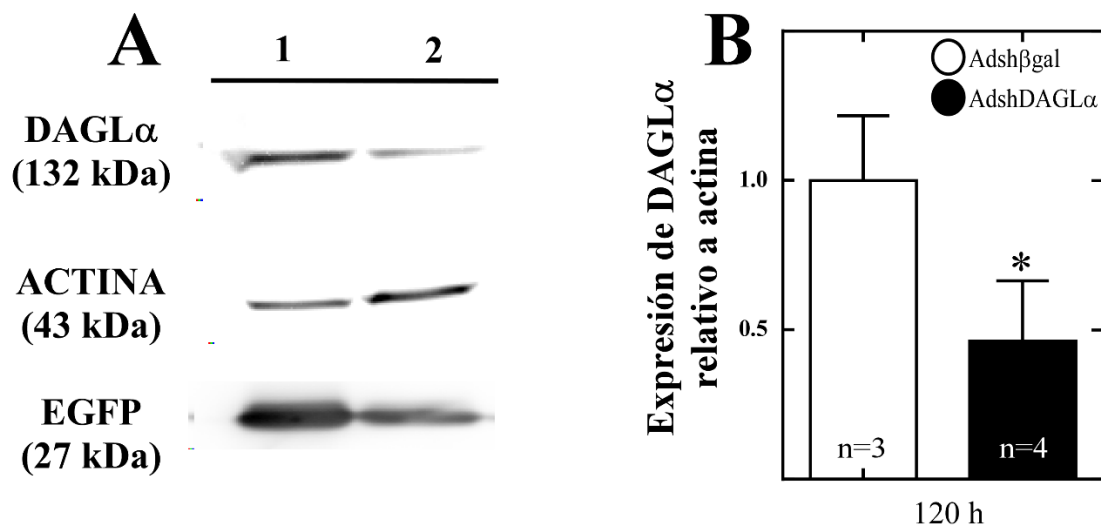


Figura 19. Inmunodetección de DAGL α en hipotálamos de ratas transducidos con AdshDAGL α o Adsh β gal.

A: Análisis de *western blot*. Línea 1: extractos totales de proteína de hipotálamos de ratas transducidos con Adsh β gal; línea 2: extractos totales de proteína de hipotálamos de ratas transducidos con AdshDAGL α . **B:** Análisis semicuantitativo de la expresión de DAGL α relativo a actina. EGFP, control de transducción; Actina, control de carga. *, $p < 0.05$ (t-test, no pareado).

Fuente: Elaboración propia

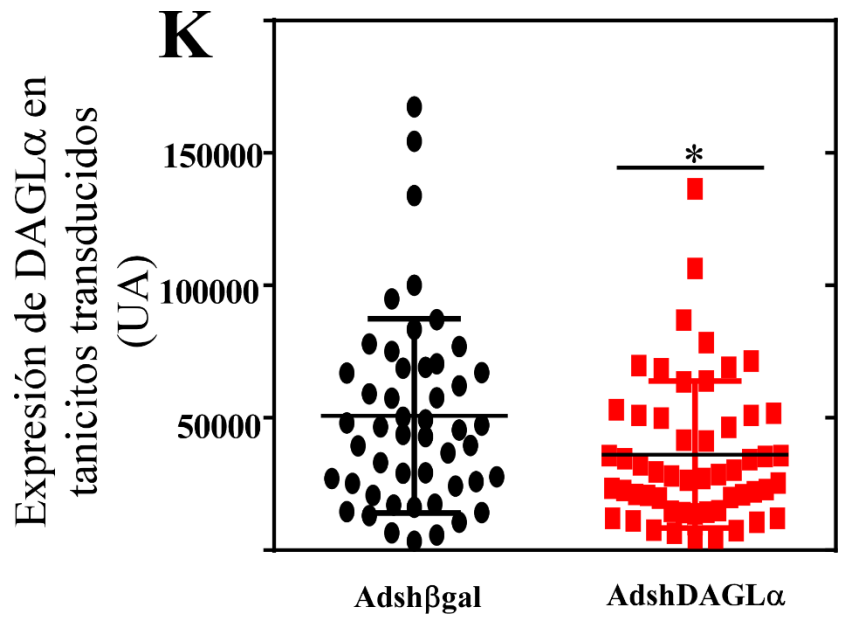
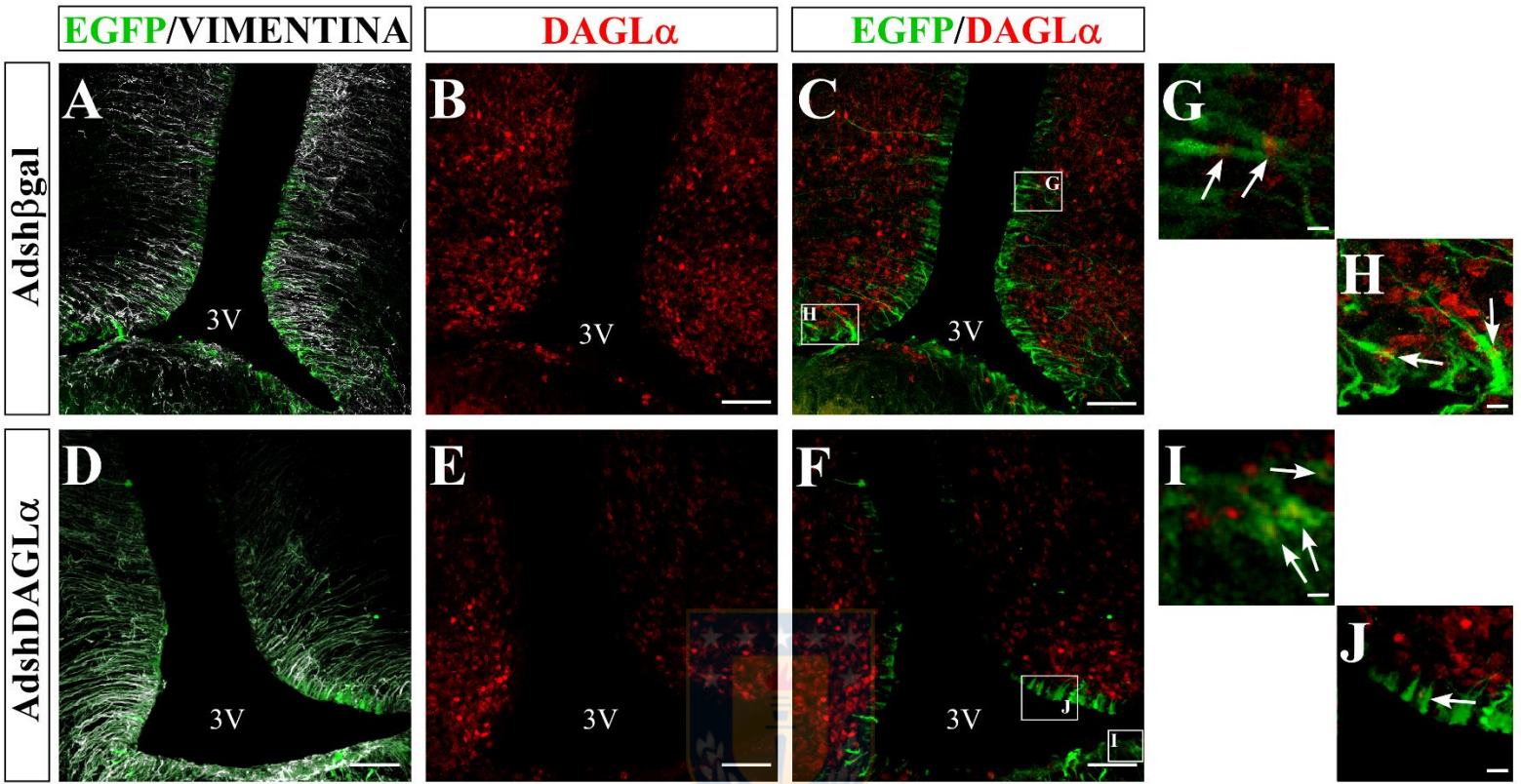


Figura 20. Inmunohistoquímica y cuantificación de la expresión DAGL α en 3V del hipotálamo de ratas transducidas por 120 horas con AdshDAGL α o Adsh β gal.

Análisis inmunohistoquímico utilizando microscopia confocal-espectral para el marcador de tanicitos vimentina (blanco), marcador de DAGL α (rojo) y fluorescencia de EGFP (verde) luego de 120 horas post inyección i.c.v. del AdshDAGL α o Adsh β gal. **A-C:** transducción con Adsh β gal **D-F:** transducción con AdshDAGL α . **G-J:** Magnificación mayor en tanicitos para evaluar la co-localización de EGFP con DAGL α . **K:** Cuantificación de la expresión de DAGL α en tanicitos transducidos con AdshDAGL α o Adsh β gal. Tamaño de barra 100 μ m. *, p< 0.05 (t-test, no pareado). Fuente: Elaboración propia



6. Evaluación del efecto de la infección i.c.v de AdshDAGL α o Adsh β gal sobre la expresión de neuropéptidos orexígenicos y anorexígenicos producidos en el núcleo arqueado hipotalámico.

La ingesta alimenticia es regulada en parte por la liberación de neuropéptidos producidos en el NA. Como se mencionó previamente, el NA presenta poblaciones neuronales de función antagónica, las neuronas orexígenicas NPY/AgRP y las neuronas anorexígenicas POMC/CART, las que son fundamentales para los estadios de saciedad.

Para determinar si la producción de 2-AG en los tanicitos tiene algún efecto sobre los niveles de expresión de estos neuropéptidos en respuesta a incrementos de la glucorraquia, utilizamos qRT-PCR aplicando el protocolo que se describe en la figura 6 A y que ha sido validado por diferentes grupos de investigación (Bady *et al.*, 2006; Elizondo-Vega *et al.*, 2016)

Al analizar los niveles de neuropéptidos en animales tratados con Adsh β gal se observa que el incremento en la concentración de glucosa ventricular, produce una inhibición de un $45\% \pm 12\%$ en la expresión de NPY (Fig. 21 A, barra negra), y un aumento de un $36\% \pm 18\%$ para POMC (Fig. 21 B, barra negra) con respecto a la inyección de tampón salino (Fig. 21 A y B, barra blanca), estos resultados se encuentran acorde a lo demostrado en literatura (Bady *et al.*, 2006).

De manera muy interesante, en animales infectados con AdshDAGL α e inyectados con glucosa 50 mM i.c.v, se produjo un aumento significativo en la expresión de ARNm para NPY, correspondiente a un aumento de un $95\% \pm 15\%$ con respecto a la inyección de tampón salino (Fig. 21 A). Para POMC la hiperglucorraquia produjo una disminución significativa correspondiente a un $35\% \pm 20\%$ en los niveles de ARNm (POMC/ciclofilina) respecto animales inyectados con tampón salino i.c.v como parte del proceso experimental. (Fig. 21 B).

Por otro lado al comparar entre virus la expresión de neuropéptidos NPY y POMC en condición salino se observó una disminución de la expresión de NPY de un $53,4\% \pm 13,3\%$ (Fig. 21 A, barras blancas) y un aumento de la expresión de POMC $61,5\% \pm 14,1\%$ (Fig. 21 B, barras blancas) en animales tratados con AdshDAGL α



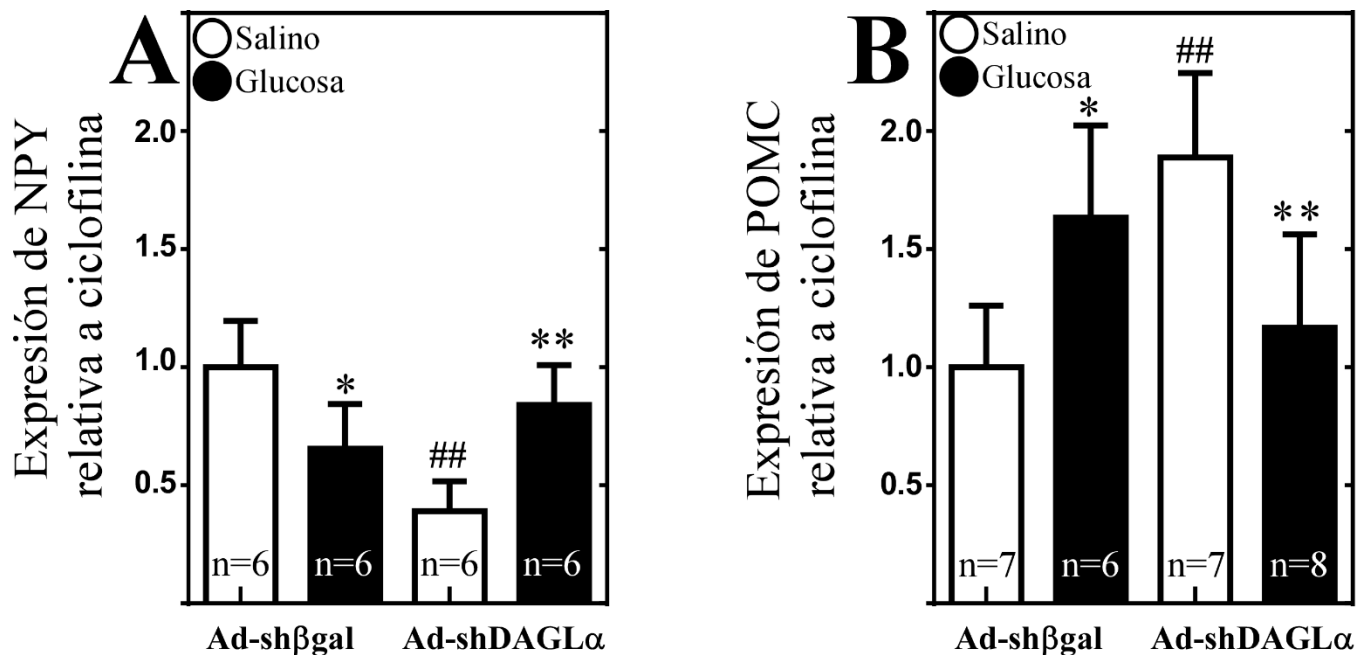


Figura 21. Efecto de AdshDAGL α o Adsh β gal i.c.v sobre los niveles de neuropéptidos orexigénicos y anorexigénicos producidos en el NA.

Expresión de ARNm de neuropéptidos hipotalámicos inducido i.c.v por glucosa 50 mM (barras negras) o tampón salino (barras blancas) en animales infectados durante 120 horas con AdshDAGL α o Adsh β gal. **A:** Expresión de ARNm del neuropéptido NPY. **B:** Expresión de ARNm del neuropéptido POMC. *: Comparación de condiciones con el mismo virus. #: Comparación entre virus en condición salino. *, p < 0.05; **, ## p < 0.01 (t-test no pareado). Fuente: Elaboración propia

7. Evaluación del efecto del inhibidor de DAGL α O-7460 sobre la expresión de neuropéptidos orexigénicos y anorexigénicos producidos en el núcleo arqueado hipotalámico

Debido a que anteriormente inhibimos los niveles de ARN mensajero y proteicos de la enzima DAGL α utilizando como herramienta un adenovirus shRNA, quisimos probar además la inhibición de la actividad enzimática de DAGL α con un inhibidor comercial el cual es altamente selectivo para la enzima productora de 2-AG, llamado O-7460. El fin de la utilización de este inhibidor es visualizar si ocurre el mismo efecto en la producción de neuropéptidos que la inhibición por adenovirus y si existe un cambio en la conducta alimenticia al inhibir la actividad enzimática de DAGL α .

Usando un racional similar a los de experimentos descritos anteriormente, evaluamos los niveles de ARNm de DAGL α y de neuropéptidos en el NA en presencia de O-7460. Para ello, ratas adultas fueron canuladas y dejadas en recuperación durante 120 horas, posterior a su recuperación se dejaron en ayuno durante 48 horas y fueron inyectadas i.c.v con 10 μ M de inhibidor de DAGL α O-7460, o con vehículo, luego de 4 horas post inyección fueron nuevamente inyectadas con glucosa 50 mM o con tampón salino.

Al analizar los niveles de expresión de ARNm de los neuropéptidos NPY y POMC encontramos que los animales controles que fueron sometidos a una hipoglicemia generada por el ayuno (salino) y los animales que fueron sometidos a una hiperglicemia inyectando glucosa 50 mM i.c.v, produjeron niveles de neuropéptidos acorde a lo esperado, donde la expresión de ARNm de NPY se ve disminuida en un 46% (Fig. 22 A) y la expresión de POMC aumenta en un 35% (Fig. 22 B) en condiciones de alta glucosa. Por otro parte, los animales tratados con el inhibidor

selectivo de DAGL α e inyectados con glucosa i.c.v 50 mM o tampón salino, la producción de neuropéptidos no se ve afectada por el aumento de glucosa en LCR, sin embargo, no responden de la misma forma que los animales control (Fig. 22 A y B).



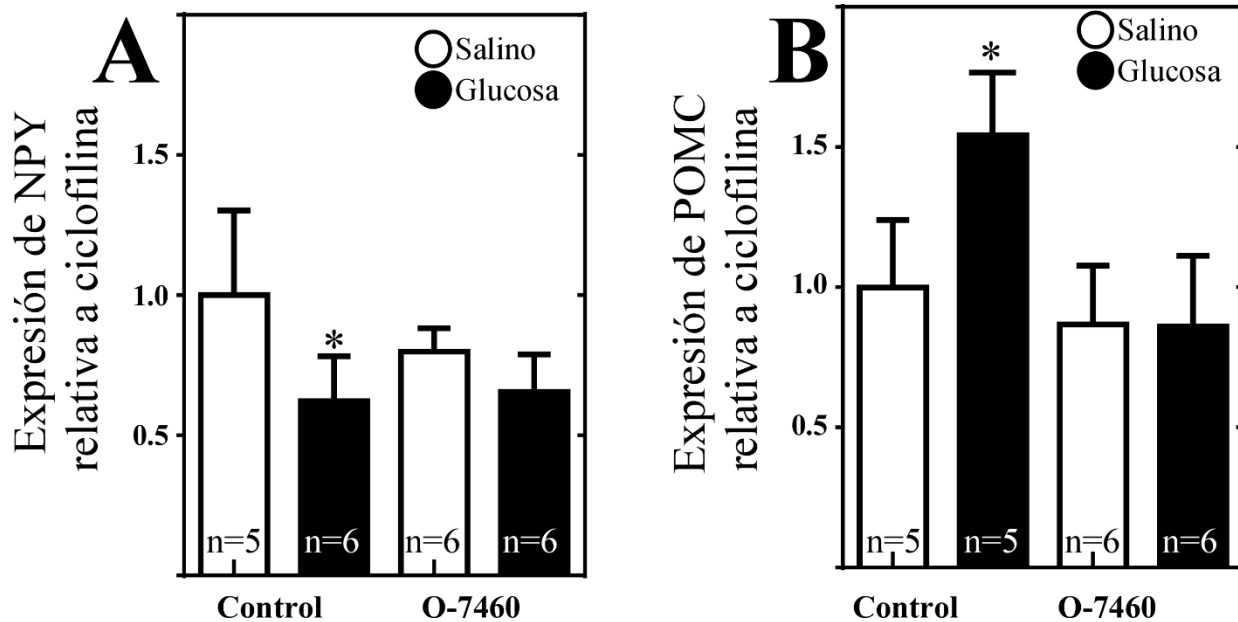


Figura 22. Efecto de O-7460 i.c.v sobre los niveles de neuropéptidos orexigénicos y anorexigénicos producidos en el NA.

Expresión neuropéptidos hipotalámicos NPY y POMC inducido por glucosa 50 mM i.c.v (Barras negras) y salino (Barras blancas) en animales previamente tratados con vehículo (control) y el inhibidor enzimático de DAGL α O-7460. **A:** Expresión de ARNm del neuropéptido NPY **B:** Expresión de ARNm del neuropéptido POMC. *, $p < 0.05$, (t-test, no pareado). Fuente: Elaboración propia

8. Análisis del efecto del inhibidor O-7460 de la enzima productora de 2-AG sobre la ingesta alimenticia.

Debido a que la inhibición de la expresión y de la actividad enzimática de DAGL α en tanicitos, altera la producción de neuropéptidos orexígenos y anorexígenos en respuesta a incrementos i.c.v. de la concentración de glucosa, evaluamos si en presencia del inhibidor o-7460 se produce alteraciones en los mecanismos asociados al hambre y saciedad.

Para evaluar el rol de DAGL α sobre la ingesta alimenticia, se utilizaron ratas adultas las cuales fueron canuladas al 3V. Luego de 120 horas de recuperación estas se dejaron en ayuno durante 16 horas y se les inyectó i.c.v 10 μ M del inhibidor o-7460 y el vehículo. Dos horas post-inyección, los animales fueron sometidos a un ciclo de ayuno-realimentación de 24 horas, para posteriormente evaluar el comportamiento alimenticio a través del uso de cajas de alimentación, que permiten el ingreso y el tiempo de permanencia en el comedero.

Inicialmente, se determinó la cantidad de alimento ingerido en un periodo de 24 horas (realimentación) luego de un ayuno de 18 horas. Dado que no fue posible obtener animales con el mismo peso, los datos fueron normalizados por cada 200 g de peso animal.

Los resultados obtenidos muestran que los animales control como los tratados con el inhibidor comen en promedio 24,6 g durante las 24 horas que dura el ciclo, por lo cual no existen diferencias significativas en la cantidad de alimento ingerido entre los animales control y los inhibidos con O-7460 (Fig. 23 A).

Como no se ve un cambio en la cantidad de alimento ingerido entre los grupos estudios, se evaluó el número de eventos de alimentación (EA), estos eventos fueron definidos como

periodos de permanencia en el comedero que superaron los 5 segundos, separados entre sí por periodos iguales o superiores a 10 minutos. Cuando el EA excedió los 30 minutos, fue considerado como dos EA de 15 minutos cada uno, y fue considerado un tiempo de intervalo entre comidas de 0 minutos entre ellos. Los EA fueron graficados en un promedio de 24 horas.

El número de los EA acumulados durante 24 horas de realimentación, fue de aproximadamente 13 eventos y no se detectaron diferencias significativas entre los animales inhibidos para DAGL α (Fig. 23 B, barras negras) y los animales controles (Fig. 23 B, barras blancas).

También evaluamos el promedio de intervalos el cual es definido como el tiempo que existen entre el término de un evento de alimentación y el inicio del siguiente. Encontramos que tampoco existen diferencias significativas entre los animales inhibidos para DAGL α (Fig. 23 C, barras negras) y los animales controles (Fig. 23 C, barras blancas). Sin embargo, al evaluar la duración del primer evento de alimentación se observa una disminución significativa del tiempo de duración de la ingesta alimenticia en animales tratados con O-7460, la cual fue en promedio alrededor de 3 min (Fig. 23 D, barras negras), en comparación con animales control que duro en promedio 17 minutos (Fig. 23 D, barras blancas). Este resultado nos podría estar indicado que al momento de enfrentarse a la comida después de un ayuno prolongado los animales tratados se encuentran más saciados que los animales control.

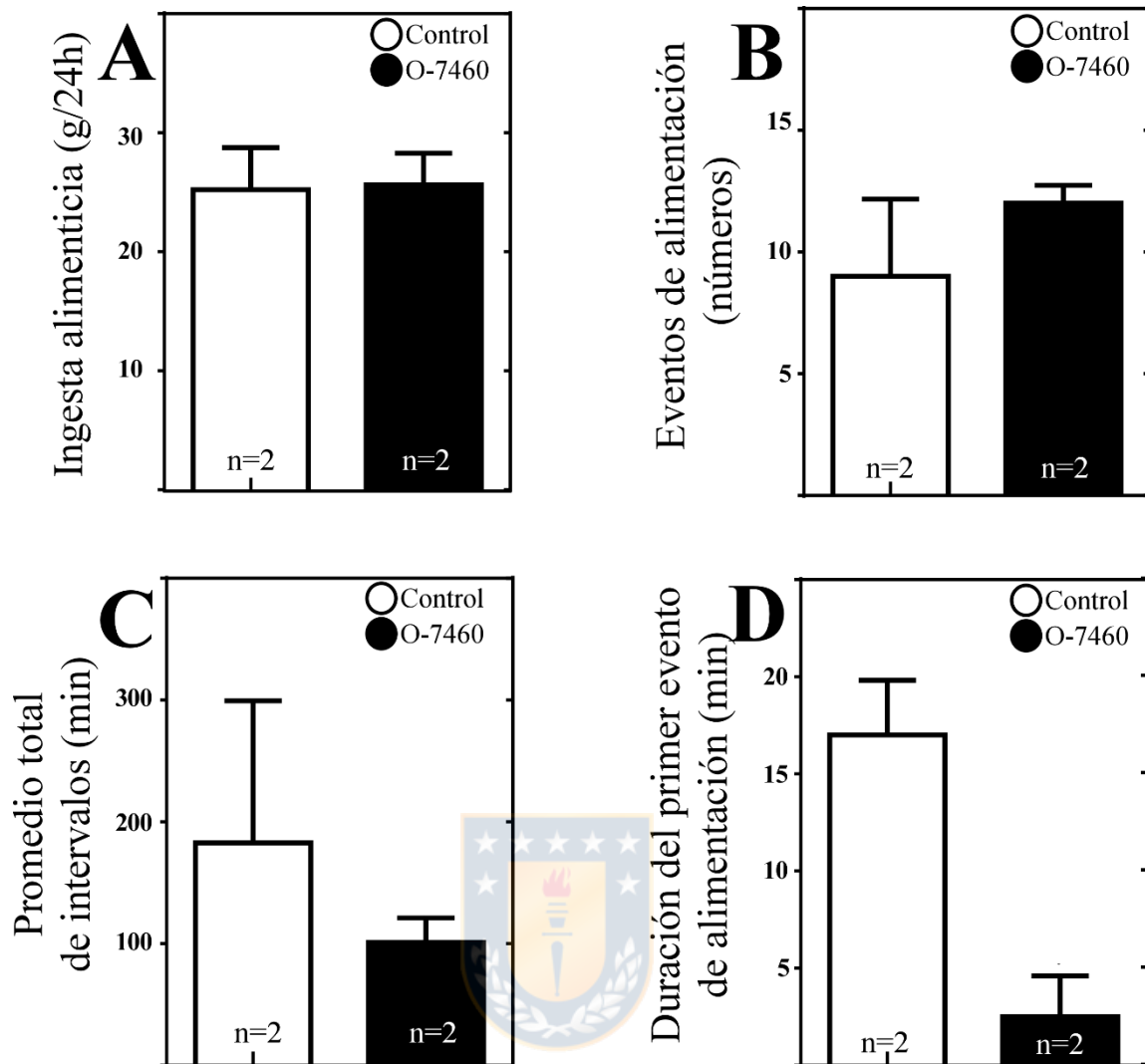


Figura 23. Inhibición de DAGL α disminuye la duración del primer evento alimenticio y no la ingesta de alimentos.

A. Cuantificación de la ingesta de alimentos durante 24 horas luego de realimentación en ratas tratadas con salino (barras blancas) o O-7460 (barras negras). **B.** Análisis de los eventos de alimentación realimentación en ratas tratadas con salino (barras blancas) o O-7460 (barras negras) **C.** Promedio total de intervalos de alimentación en ratas tratadas con salino (barras blancas) o O-7460 (barras negras). **D.** Duración del primer evento de alimentación en ratas tratadas con salino (barras blancas) o O-7460 (barras negras). Fuente: Elaboración propia

En paralelo, utilizando los datos obtenidos para la evaluación de la ingesta alimenticia, fue posible determinar; la duración de alimentación promedio (min/evento de alimentación), el tamaño promedio de la comida (g/eventos de alimentación), y velocidad de alimentación (g/min), durante el ciclo de realimentación. Detectamos, que la velocidad de alimentación disminuye significativamente en animales tratados con O-7460 (Fig. 24 C, barra negra), en comparación con animales control (Fig. 24 C, barra blanca). Sin embargo, no detectamos diferencias significativas en parámetro asociados a saciedad entre los animales controles y los DAGL α inhibidos, específicamente en la duración de alimentación promedio (Fig. 24 A) y el tamaño promedio de la comida ingerida (Fig. 24 B). Por lo tanto, este resultado nos infiere que los animales con DAGL α inhibida comen más lento que animales control.

En general, los resultados obtenidos nos indican que los animales tratados con el inhibidor comen lo mismo que los animales control, sin embargo, animales tratados con O-7460 presentan un menor tiempo de ingesta a la hora de enfrentarse a la comida después de un ayuno prolongado, lo que nos podría estar indicando que estos animales se encuentran más saciados que los animales control. Además, cabe destacar que al analizar la velocidad de alimentación en animales con DAGL α inhibida encontramos que la velocidad es menor que en los animales control, lo cual también es un parámetro que nos indicaría que se encuentran en un estado de mayor saciedad independiente que hayan comido la misma cantidad de alimento que animales control. Estos resultados pueden ser debido a una disminución en la generación del endocanabinoide 2-AG en tanicitos producto de la inhibición de la actividad enzimática de DAGL α , generando así un estado de saciedad en los animales. Recordar que 2-AG tiene un efecto orexigénico y se encuentra aumentado en periodos de ayuno.

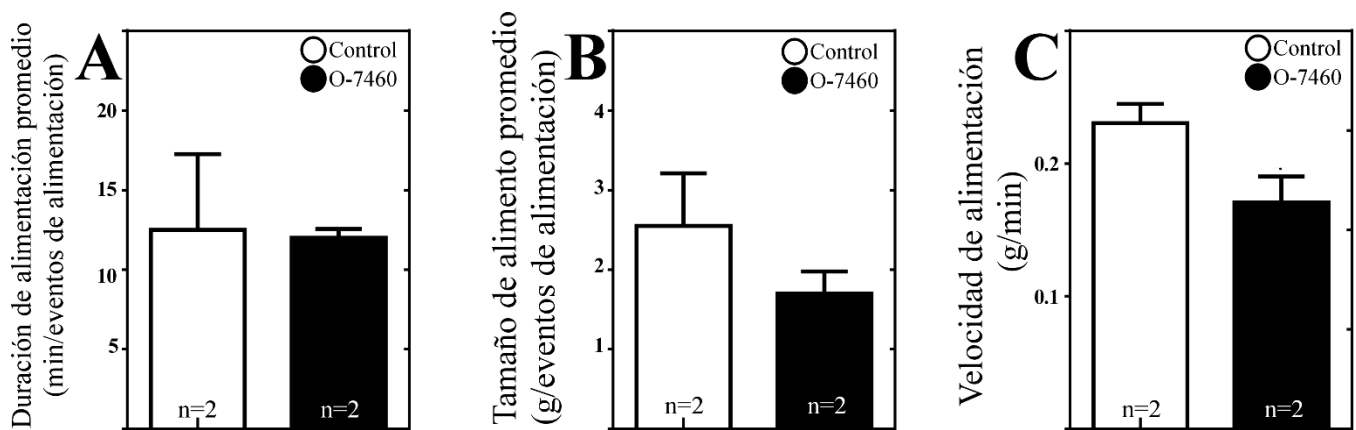


Figura 24. La velocidad alimenticia se encuentra disminuida en animales DAGL α inhibidos.

A: Análisis de la duración promedio de los eventos de alimentación en ratas tratadas con salino (barras blancas) o O-7460 (barras negras). **B:** Determinación del tamaño promedio de la comida ingerida en los eventos de alimentación, en ratas tratadas con salino (barras blancas) o O-7460 (barras negras). **C:** Determinación de la velocidad de alimentación en ratas tratadas con salino (barras blancas) o O-7460 (barras negras). Fuente: Elaboración propia

Tabla 5: Resumen de resultados ensayos de comportamiento.

O-7460	
Ingesta alimenticia	n/c
Eventos de alimentación	n/c
Promedio total de intervalos	n/c
Duración del primer evento de alimentación	Disminuye
Duración de alimentación promedio	n/c
Tamaño de alimento promedio	n/c
Velocidad de alimentación	Disminuye

n/c: no hay cambios

Fuente: Elaboración propia



IV DISCUSIÓN

En esta tesis se generó un adenovirus que permite inhibir la expresión de DAGL α , el que fue evaluado a través de dos enfoques experimentales *in vitro* e *in vivo*, comparando en ambos casos la disminución de la expresión de DAGL α con un adenovirus control. Los resultados de ambos abordajes mostraron diferencias, ya que, *in vitro* se genera una inhibición solo en los niveles de ARNm de la enzima productora de 2-AG, en cambio *in vivo* se logra la inhibición de ARNm y de proteína. *In vivo* nuestros ensayos experimentales lograron mostrar que la disminución de la expresión de DAGL α de tanicitos, lo cual genera una alteración de los niveles de expresión de neuropéptidos hipotalámicos críticos para la ingesta alimenticia en condiciones de ayuno. Además ensayos preliminares en modelos animales muestran que el uso de un inhibidor selectivo para DAGL α genera animales más saciados y con una velocidad de alimentación más baja que el grupo control, sugiriendo fuertemente que la enzima productora de 2-AG presente en tanicitos jugaría un rol importante en la conducta alimenticia.

1. Rol de SE en el hipotálamo basal en la ingesta alimenticia

Si bien se han descrito diversos mecanismos por el cual se modula la ingesta alimenticia en el SNC, aún no está totalmente esclarecido, aún más se conoce poco sobre el rol del sistema endocanabinoide en la ingesta de alimentos. Sin embargo, se sabe que la activación de CB1R en el SNC se asocia con fenómenos orexigénicos caracterizados por un aumento de la ingesta alimenticia. Por ejemplo, un estudio realizado por Cota *et al* (2003), donde se analizó el peso corporal de ratones *wild type* vs ratones *knockout* para CB1R alimentados *ad libitum*, muestran que ratones *knockout* para CB1R durante todo el período de experimentación tuvieron un peso corporal menor que los ratones controles. Otros resultados obtenidos por Koch *et al* (2015),

demonstraron que al administrar i.p 1 mg/kg de peso de araquidonoil cloroetilamida (ACEA; agonista selectivo de CB1R) a los ratones *wild type* aumentan la ingesta de alimentos. Además otros análisis realizados por estos investigadores evidencian una dosis dependencia del efecto del agonista. En este sentido, se encontró que en ratones *wild type* la administración ACEA en mayores dosis (2,5-5 mg/kg de peso) generaba una menor ingesta alimenticia sugiriendo fuertemente que la modulación de los CB1R es un proceso bifásico. Con estos resultados se puede concluir que el CB1R presenta un rol significativo en el control de la ingesta alimenticia y el peso corporal. Su efecto es dosis dependiente y puede ejercer funciones reguladores a nivel hipotalámico en el NA.

En el hipotálamo se han encontrado altos niveles de inmunorreactividad para CB1R en los núcleos hipotalámicos como: NA, NPV, NVM, DMN y el LHA y también en los aferentes glutamatérgicos y GABAérgicos que se proyectan hacia las neuronas POMC (Pertwee., 2015). De manera interesante, las neuronas POMC también expresan el receptor (Koch *et al*, 2015). Por otro lado, neuronas orexigénicas NPY/AgRP no se han encontrado expresión CB1R en sus membranas, sin embargo, mediante microscopía electrónica e inmunomarcaje se ha observado la presencia de CB1R en aferentes presinápticos GABAérgicos provenientes de otras neuronas (Morozov *et al.*, 2017). La evidencia actual indica que el SE modula la excitabilidad de neuronas POMC, clásicamente descritas como relevantes para estadios de saciedad produciendo cambios importantes en la ingesta alimenticia.

A pesar de toda la evidencia del rol de CB1R en la ingesta alimenticia, se conoce muy poco sobre cuál sería el rol de otros componentes del SE como las enzimas de síntesis y degradación de endocannabinoides presentes en células gliales como tanicitos sobre la ingesta alimenticia. Hasta la fecha, solo se ha publicado un artículo donde muestra la expresión de la enzima

DAGL α en tanicitos por Suarez *et al* (2010). Además un análisis de RNAseq de cultivo primario de tanicitos realizado por nuestro laboratorio que nos indica que existe la maquinaria para síntesis y degradación del endocanabinoide 2-AG.

Teniendo en cuenta estos últimos antecedentes, en esta tesis, hemos confirmado la expresión de DAGL α en cultivos primarios de tanicitos y en hipotálamo de ratas, además se ha generado una herramienta molecular eficiente para inhibir la expresión de DAGL α , tanto *in vitro* como *in vivo*. Así mismo, hemos demostrado que la inhibición de esta enzima productora del endocanabinoide 2-AG en tanicitos, modifica la expresión de neuropéptidos hipotalámicos y genera una modificación en la ingesta alimenticia.

2. Estrategias moleculares y farmacológicas para estudiar el SE en el hipotálamo.

Una de las razones de porque elegimos inhibir la expresión de DAGL α por medio de un adenovirus es que presenta un tropismo favorable hacia células gliales como tanicitos, lo cual también ha sido descrito por otros autores (Akli *et al.*, 1993; Smith-Arica *et al.*, 2000; Soudais *et al.*, 2001; Duale *et al.*, 2005; Lewis *et al.*, 2010; Aschauer *et al.*, 2013; Elizondo-Vega *et al.*, 2016; Uranga *et al.*, 2017). De acuerdo a la localización y características morfológicas de las células EGFP positivas observadas *in situ*, y en conjunto con la expresión de vimentina, nuestros resultados muestran que las partículas adenovirales transducen preferencialmente a células endimarias de la región basal correspondiente a tanicitos, y no transducen astrocitos o neuronas.

Para poder evaluar la mayor inhibición de DAGL α por medio del adenovirus se utilizaron diferentes tiempos post-transducción (48, 72, 96 y 120 horas) para así determinar los niveles de ARNm como de proteínas de esta enzima. Estos tiempos, han sido utilizados de manera

efectiva tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo* para la inhibición por medio del adenovirus de diferentes genes de interés para el estudio del comportamiento alimenticio (Elizondo-vega *et al.*, 2016; Uranga *et al.*, 2017; Barahona *et al.*, 2018). En base a ensayos *in vitro* realizados durante esta tesis el tiempo donde se obtuvo una mayor inhibición de ARNm de DAGL α fue de 96 horas, por lo cual se escogió este tiempo para realizar ensayos de inmunodetección en cultivos *in vitro* de tanicitos, donde no se observan cambios significativos en los niveles de expresión de la enzima. Teniendo en cuenta que muchas veces estudios *in vitro* difieren con los estudios *in vivo* e hipotizando que bajo estas condiciones las partículas adenovirales pudieran actuar de manera más eficiente se realizó una inmunohistoquímica *in situ* a 96 horas, sin observar diferencias significativas en los niveles proteicos. Una posible explicación a estos resultados podrían estar relacionados con la estabilidad de la enzima sintetizadora de 2-AG, en este sentido, ha sido poco estudiado el equilibrio entre la síntesis-degradación de la proteína DAGLa, no conociéndose información a la fecha sobre su vida media. En este sentido, no se puede descartar que el equilibrio síntesis-degradación de DAGL α tenga un rol en la incapacidad de los adenovirus diseñados en esta tesis para disminuir significativamente los niveles proteicos de DAGL α a 96 horas. Por lo tanto, decidimos aumentar el tiempo de transducción adenoviral *in vivo* a 120 horas y realizamos ensayos únicamente con este tiempo para así seguir los principios éticos en el uso de animales de experimentación, utilizándolos de la mejor forma y reduciendo a su vez el número de animales de esta tesis.

Por otro lado, es importante destacar que los experimentos *in vitro* no son el reflejo total de las condiciones fisiológicas en que se encuentra la proteína, pudiendo esto jugar un rol en el efecto del adenovirus diseñado para la inhibición de la expresión de DAGLa en tanicitos.

3. Modificación de la producción de neuropéptidos hipotalámicos críticos para la conducta alimenticia en ratas con DAGL α de tanicitos inhibidas.

Los circuitos neuronales hipotalámicos, cumplen un importante rol en el control de la alimentación, la cual es regulada por una señalización mediada por hormonas y nutrientes (Elias *et al.*, 1998; Levin *et al.*, 2004; Fuente-Martin *et al.*, 2016). Estas señales impactan a neuronas del NA, regulando la expresión y liberación de neuropéptidos orexigénicos y anorexigénicos (Lam *et al.*, 2005; Nakazato *et al.*, 2001; Schwartz *et al.*, 2000). Ha sido demostrado que durante el ayuno, aumenta la liberación de neuropéptidos orexigénicos como el neuropéptido NPY y por ende su expresión a nivel de mensajero se ve incrementada, mientras que después de una inyección i.c.v. de glucosa ocurre un aumento de los niveles de neuropéptidos anorexigénicos (POMC y CART) descritos como mediadores de saciedad (Archer *et al.*, 2005; Bady *et al.*, 2006).

Nuestro estudio *in vivo* utilizó esta aproximación ampliamente validada en la literatura (Bady *et al.*, 2006, Elizondo-Vega *et al.*, 2016, Uranga *et al.*, 2017, Barahona *et al.*, 2018) para obtener los resultados de cambio en niveles de expresión de neuropéptidos en animales transducidos con el adenovirus que inhibe la expresión de DAGL α vs un adenovirus control (Adsh β gal).

Nuestros datos muestran que animales transducidos i.c.v con AdshDAGL α a diferencia del adenovirus control presentan menores niveles de NPY, durante la condición de ayuno (Fig 21 A, barras blancas) (Archer *et al.*, 2005; Bady *et al.*, 2006). Estos datos sugieren fuertemente que la enzima productora de 2-AG específicamente en tanicitos jugaría un rol crítico al aumentando los niveles de neuropéptidos que promueven la ingesta alimenticia durante el ayuno. Por otro lado, la inyección de glucosa 50 mM i.c.v en animales transducidos con Adsh β gal produjo una disminución de los niveles de expresión de NPY, lo cual provoca una señal que actúa de manera

anorexigénica disminuyendo la ingesta alimenticia. Esto es contrario a lo observado en animales transducidos con AdshDAGL α , ya que, la producción de NPY se ve aumentada en condiciones de alta glucosa (Fig.21 B). Las implicancias de estos datos no están 100% claras, pero dado que la respuesta a glucosa en animales transducidos con Adsh β gal o AdsgDAGL α no obtuvieron una diferencia significativa en la expresión de NPY (Fig 21. A barras negras), nuestros datos sugieren que DAGL α de tanicitos no responde al efecto de glucosa sobre la producción del neuropeptido NPY.

En el caso de POMC, un neuropeptido anorexigénico caracterizado clásicamente por generar saciedad, nuestros datos muestran que animales ayunados y transducidos i.c.v con AdshDAGL α presentan mayores niveles de ARNm para POMC respecto a animales transducidos i.c.v con Adsh β gal (Fig. 21 B. barras blancas). Este resultado apoya la idea que la enzima productora de 2-AG jugaría un rol importante en condiciones de ayuno. Por otro lado, similar a lo observado para NPY, el efecto inducido por glucosa 50 mM i.c.v en animales transducidos con AdshDAGL α no produjo el aumento característica de los niveles de POMC (Fig. 21 B. barras negras), sugiriendo que DAGL α de tanicitos no responde en la producción hipotalámica de POMC mediada por glucosa extracelular.

Además durante esta tesis, buscamos otras alternativas experimentales que nos permitieron estudiar el rol de DAGL α , utilizamos un inhibidor comercial selectivo para la biosíntesis de 2-AG vía DAGL α (O-7460), con el fin de inhibir la actividad enzimática de esta enzima y tener otra estrategia para modular a DAGL α de tanicitos. Se ha reportado que este inhibidor inhibe de manera dosis dependiente la ingesta de alimentos altos en grasas y reduce el peso corporal (Bisogno *et al.*, 2012). Nuestros datos usando el inhibidor para la enzima productora de 2-AG

(O-7460) muestran que modificar el funcionamiento de DAGL α en el 3V altera la producción normal de neuropéptidos del NA inducidos por glucosa 50 mM i.c.v., en comparación con nuestros resultados en animales controles (tratados con Adsh β gal o salino). Específicamente la i.c.v de glucosa 50 mM no fue capaz de disminuir la producción de NPY (orexigénico), ni aumentar POMC (anorexigénico) en animales tratados con O-7460 apoyando la idea de que la DAGL α de tanicitos jugaría un rol en la producción de neuropeptidos hipotalamicos críticos para la ingesta alimenticia (Fig. 22 A y B, barras negras).

4. Efecto de DAGL α de tanicitos sobre la conducta alimenticia

La ingesta alimenticia es un fenómeno complejo influenciado directamente por los nutrientes periféricos como la glucosa entre otros. Los estadios de ayuno se caracterizan por presentar una disminución de la glucosa extracelular, aumento de la sensación de hambre, búsqueda de alimentos y aumento de la ingesta de alimenticia si este estuviera disponible. Los estadios de saciedad mediados por la alimentación se caracterizan por ocurrir con elevaciones en los niveles de glucosa extracelular, por presentar una disminución en la búsqueda de alimentos y una disminución de la ingesta alimenticia. En este sentido, se ha sido demostrado que durante el ayuno, aumenta la liberación de neuropéptidos orexigénicos NPY y AgRP, mientras que en estadios de saciedad aumenta de los niveles de neuropéptidos anorexigenicos POMC y CART (Archer *et al.*, 2005; Bady *et al.*, 2006).

Pese a la poca disposición de animales para ensayos conductuales utilizando el inhibidor de DAGL α buscamos evaluar el efecto de inhibir DAGL α de tanicitos sobre el comportamiento alimenticio.

Al observar los análisis de comportamiento en animales inhibidos con O-7460, se evidencia que los animales comen la misma cantidad, sin embargo, son más lentos para comer (Fig. 24 C) y al ser expuestos a la realimentación después de un ayuno prolongado el tiempo de ingesta es menor que animales control (Fig. 23 D), estos parámetros nos indican que estos animales presentan un estado de saciedad. Nuestros datos, si bien son preliminares debido al escaso número de animales utilizados, muestran que la enzima productora de 2-AG en tanicitos jugaría un rol importante en la conducta alimenticia específicamente en estadios de ayuno.

Resultados similares fueron obtenidos por Bady *et al* (2006), donde los animales mostraron un retraso en el inicio y en el término de la ingesta de alimentos, que los autores atribuyen a una falla del mecanismo *sensor* de glucosa (Bady *et al.*, 2006). De manera similar, los resultados de este trabajo de tesis, muestran que la alteración en la saciedad puede ser inducida por el silenciamiento de DAGL α en los tanicitos, lo que apoya la hipótesis de que el SE de estas células jugaría un rol relevante en la conducta alimenticia no descrito hasta la fecha.

V REFERENCIAS

- Akmayev, I.G., and Popov A.P. (1977). Morphological aspects of the hypothalamichypophyseal system. VII. The tanycytes: Their relation to the hypophyseal adrenocorticotrophic function. An ultrastructural study. *Cell and tissue research*.180:263- 282
- Akli, S., C. Caillaud, et al. (1993). "Transfer of a foreign gene into the brain using adenovirus vectors." *Nat Genet* **3**(3): 224-228.
- Alger BE, Kim J (2011). Supply and demand for endocannabinoids. *Trends Neurosci* 34: 304–315.
- Archer, Z.A., S.M. Rhind, P.A. Findlay, C.E. Kyle, M.C. Barber, and C.L. Adam. (2005). Hypothalamic responses to peripheral glucose infusion in food-restricted sheep are influenced by photoperiod. *The Journal of endocrinology*. 184:515-525
- Aschauer, D.F., S. Kreuz, and S. Rumpel. (2013). Analysis of transduction efficiency, tropism and axonal transport of AAV serotypes 1, 2, 5, 6, 8 and 9 in the mouse brain. *PloS one*. 8:e76310
- Bady, I., N. Marty, M. Dallaporta, M. Emery, J. Gyger, D. Tarussio, M. Foretz, and B. Thorens. (2006). Evidence from glut2-null mice that glucose is a critical physiological regulator of feeding. *Diabetes*. 55:988-995
- Barahona MJ, Llanos P, Recabal A, Escobar-Acuña K, Elizondo-Vega R, Salgado M, Ordenes P, Uribe E, Sepúlveda FJ, Araneda RC, García-Robles MA.(2018). Glial hypothalamic inhibition of GLUT2 expression alters satiety, impacting eating behavior. *Glia*. 2018 Mar;66(3):592-605.

Becker T., Noel R, et al. (1994). "Use of recombinant adenovirus for metabolic engineering of mammalian cells." *Methods Cell Biol* 43 Pt A: 161-189.

Bermudez-Silva FJ, Cardinal P, Cota D. (2015). The role of the endocannabinoid system in the neuroendocrine regulation of energy balance. *Journal of Psychopharm.* 26(1):114-124.

Berns, K. I. and C. Giraud (1995). "Adenovirus and adeno-associated virus as vectors for gene therapy." *Ann N Y Acad Sci* 772: 95-104.

Bisogno T, Melck D, Bobrov M, Gretskaya NM, Bezuglov VV, De Petrocellis L *et al.* (2000). N-acyl-dopamines: novel synthetic CB(1) cannabinoid-receptor ligands and inhibitors of anandamide inactivation with cannabimimetic activity *in vitro* and *in vivo*. *Biochem J* **351** (Pt 3): 817–824.

Bisogno T, Howell F, Williams G, Minassi A, Cascio MG, Ligresti A *et al.* (2003). Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain. *J Cell Biol* 163: 463–468

Bisogno T, Ligresti A, Di Marzo V. (2005). The endocannabinoid signalling system: biochemical aspects. *Pharmacol Biochem Behav* 81:224 –238.

Bisogno T, Mahadevan A, Coccurello R, Chang JW, Allarà M, Chen Y, Giacobuzzo G, Lichtman A, Cravatt B, Moles A, Di Marzo V. (2012). A novel fluorophosphonate inhibitor of the biosynthesis of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol with potential anti-obesity effects. *Br. J. Pharmacol.* 169,(4);784-793.

Blankman JL, Simon GM, Cravatt BF (2007). A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Chem Biol* 14: 1347–1356.

Brown JE, Kassouny M, Cross JK. (1977). Kinetic studies of food intake and sucrose solution preference by rats treated with low doses of delta9-tetrahydrocannabinol. *Behav Biol.* 20: 104–110.

Castillo, P.E.; Younts, T.J.; Chavez, A.E.; Hashimoto, Y. (2012) Endocannabinoid signaling and synaptic function. *Neuron*, 76, 70–81.

Cavuto P., McAinch A., Hatzinikolas G., Cameron-Smith D., Wittert G. (2007). The expression of receptors for endocannabinoids in human and rodent skeletal muscle. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 364, 105-110

Chauvet N, Parmentier ML, Alonso G. (1995) Transected axons of adult hypothalamo-neurohypophysial neurons regenerate along tanycytic processes. *J Neurosci Res.* 41(1):129–144

Chevalere V, Castillo PE (2003). Heterosynaptic LTD of hippocampal GABAergic synapses: a novel role of endocannabinoids in regulating excitability. *Neuron* 38: 461–472.

Cota D, Marsicano G, Tschöp, Grübler Y, Flachskamm C, Schubert M, Auer D, Yassouridis A, Thöne-Reineke C, Ortmann S, Tomassoni F, Cervino C, Nisoli E, Linthorst A, Pasquali R, Lutz B, Stalla G, Pagotto U. (2003). The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *The Journal of clinical investigation.* 112 (3); 423-431

Cota D, (2007). CB1 receptors: emerging evidence for central and peripheral mechanisms that regulate energy balance, metabolism, and cardiovascular health. *Diabetes Metab Res Rev.* 23(7):507-517

Cowley M, Smart J, Rubinstein M, Cerdán M, Diano S, Horvath T, Cone R, Low M. (2001). Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature*.411:480-484

Cristino L, Starowicz K, De Petrocellis L, Morishita J, Ueda N, Guglielmotti V, Di Marzo V. (2008). Immunohistochemical localization of anabolic and catabolic enzymes for anandamide and other putative endovanilloid in the hippocampus and cerebellar cortex of the mouse brain. *Neurosciencie*.151(4):955-968

Dietrich M, Horvath T. (2013). Hypothalamic control of energy balance: incights into the role of synaptic plasticity. *Cell*. 36 (2):65-73.

Demuth D, Molleman A. (2006). Cannabinoid signaling. *Life Sci*.78, 549-563.

Devane, W.A.; Hanus, L.; Breuer, A.; Pertwee, R.G.; Stevenson, L.A.; Griffin, G.; Gibson, D.; Mandelbaum, A.; Etinger, A.; Mechoulam, R.(1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, 258, 1946–1949.

Di Marzo V, Ligresti A, Cristino L. (2009).The endocannabinoid system as a link between homoeostatic and hedonic pathways involved in energy balance regulation. *Int J Obes (Lond)* 33 Suppl 2: S18-24.

Di Marzo V (2011). Endocannabinoid signaling in the brain: biosynthetic mechanisms in the limelight. *Nature Neuroscience*. 14(1):9-15

Di Marzo, V.; de Petrocellis, L. (2012) Why do cannabinoid receptors have more than one endogenous ligand? *Philos. Trans. R. Soc. B*, 367, 3216–3228.

Duale H, Kasparov S, Paton J, Teschemacher A (2005). Differences in transductional tropism of adenoviral and lentiviral vectors in the rat brainstem. *Exp Physiol* 90 (1):71-78

Edwards A., Abizaid A. (2016). Driving the need to feed: insight into the collaborative interaction between ghrelin and endocannabinoid system in modulating brain. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 66,33-53

Elias, C.F., C.B. Saper, E. Maratos-Flier, N.A. Tritos, C. Lee, J. Kelly, J.B. Tatro, G.E. Hoffman, M.M. Ollmann, G.S. Barsh, T. Sakurai, M. Yanagisawa, and J.K. Elmquist. (1998). Chemically defined projections linking the mediobasal hypothalamus and the lateral hypothalamic area. *The Journal of comparative neurology*. 402:442-459

Elizondo-Vega R, Cortes-Campos C, Barahona MJ, Oyarce KA, Carril CA, García-Robles MA. (2015). The role of tanycytes in hypothalamic glucosensing. *J Cell Mol Med.*;19(7):1471-82

Elizondo-Vega R, Cortés-Campos C, Barahona MJ, Carril C, Ordenes P, Salgado M, Oyarce K, García-Robles ML. (2016). Inhibition of hypothalamic MCT1 expression increases food intake and alters orexigenic and anorexigenic neuropeptide expression. *Sci Rep*. 28;6:33606.

Flament-Durand J, Brion JP. (1985). Tanycytes: morphology and functions: a review. *Int Rev Cytol*. 96:121– 155

Freund TF, Katona I, Piomelli D (2003). Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev* 83: 1017–1066.

Fuente-Martin, E., C. Garcia-Caceres, P. Argente-Arizon, F. Diaz, M. Granado, A. FreireRegatillo, D. Castro-Gonzalez, M.L. Ceballos, L.M. Frago, S.L. Dickson, J. Argente,

and J.A. Chowen. (2016). Ghrelin Regulates Glucose and Glutamate Transporters in Hypothalamic Astrocytes. *Scientific reports*. 6:23673.

García M, Carrasco M, Godoy A, Reinicke K, Montecinos V, Aguayo L, Tapia J, Vera J, Nualart F. (2001). Elevated expression of glucose transporter-1 in hypothalamic ependymal cells not involved in the formation of the brain-cerebrospinal fluid barrier. *J Cell Biochem*. 80(4): 491–503.

García, M., C. Millán, C. Balmaceda-Aguilera, T. Castro, P. Pastor, H. Montecinos, K.Reinicke, F. Zuniga, J.C. Vera, S.A. Onate, and F. Nualart. (2003). Hypothalamicependymal-glia cells express the glucose transporter GLUT2, a protein involved in glucose sensing. *Journal of neurochemistry*. 86:709-724.

García del Caño G, Montaña M, Aretxabala X, González-Burguera I, López A. (2014) diacylglycerol LIPASE- α in brain cortical neurons. *Advances in Biological Regulation*. 54:12–23.

Gonsiorek, W., Lunn, C., Fan, X., Narula, S., Lundell, D., and Hipkin, R. W. (2000). Endocannabinoid 2-arachidonyl glycerol is a full agonist through human type 2 cannabinoid receptor: antagonism by anandamide. *Mol. Pharmacol*. 57, 1045–1050

Hanus L, Gopher A, Almog S, Mechoulam R (1993). Two new unsaturated fatty acid ethanolamides in brain that bind to the cannabinoid receptor. *J Med Chem*. 36: 3032–3034

Hanus L, Abu-Lafi S, Fride E, Breuer A, Vogel Z, Shalev D. (2001). 2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proc Natl Acad Sci*. 98: 3662–3665

- Hao S, Avraham Y, Mechoulam R, Berry EM. (2000). Low dose anandamide affects food intake, cognitive function, neurotransmitter and corticosterone levels in diet-restricted mice. *Eur J Pharmacol.* 392: 147–156.
- Herkenham, M., Lynn, A. B., Little, M. D., Johnson, M. R., Melvin, L. S., de Costa, B. R., & Rice, K. C. (1990). Cannabinoid receptor localization in brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(5), 1932–1936.
- Hsu L, Tsuboi K, Adibekian A, Pugh H, Masuda K, and Cravatt B. (2012)- DAGL β inhibition perturbs a lipid network involved in macrophage inflammatory responses. *Nat Chem Biol* 8:999–1007.
- Huang SM, Bisogno T, Trevisani M, Al-Hayani A, De Petrocellis L, Fezza F *et al.* (2002). An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 8400–8405
- Howlett A, Blume L, Dalton G. (2010). CB1 cannabinoid receptors and their associated proteins. *Curr. Med. Chem.* 17, 1382–1393
- Jackson, A. L., S. R. Bartz, et al. (2003). Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol.* 21(6): 635-637.
- Kano, M.; Ohno-Shosaku, T.; Hashimotodani, Y.; Uchigashima, M.; Watanabe, M. (2009) Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol. Rev.* 89, 309–380.
- Katona, I.; Freund, T.F. (2008) Endocannabinoid signaling as a synaptic circuit breaker in neurological disease. *Nat. Med.* 14, 923–930.

Keimpema E, Barabas K, Morozov YM, Tortoriello G, Torii M, Cameron G et al. (2010). Differential subcellular recruitment of monoacylglycerol lipase generates spatial specificity of 2-arachidonoyl glycerol signaling during axonal pathfinding. *J Neurosci* 30: 13992–14007

Kirkham T, Williams C, Fezza F, Di Marzo V. (2002) Endocannabinoid levels in rat limbic forebrain and hypothalamus in relation to fasting, feeding and stimulation of eating by 2-arachidonoyl glycerol. *Br J Pharmacol.* 136:550-557

Klein, T. W. (2005). Cannabinoid-based drugs as anti-inflammatory therapeutics. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 400–411.

Koch, M., Varela, L., Kim, J. G., Kim, J. D., Hernandez, F., Simonds, S. E., Horvath, T. L. (2015). Hypothalamic POMC neurons promote cannabinoid-induced feeding. *Nature.* 519(7541), 45–50.

Kola B., Farkas I., Christ-Crain M., Wittmann G., Lolli F., Amin F., Harvey-White J., Liposits Z., Kunos G., Grossman A., Fekete C., Korbonits, M. (2008). The Orexigenic Effect of Ghrelin Is Mediated through Central Activation of the Endogenous Cannabinoid System. *PLoS ONE*, 3(3), e1797.

Komorowski J, Stepień H. (2007). The role of the endocannabinoid system in the regulation of endocrine function and in the control of energy balance in humans. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*.61:99-105.

Krashes, M. J., Koda, S., Ye, C., Rogan, S. C., Adams, A. C., Cusher, D., Maratos-Flier E., Roth B., Lowell, B. (2011). Rapid, reversible activation of AgRP neurons drives feeding behavior in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(4), 1424–1428.

Lam, T.K., R. Gutierrez-Juarez, A. Pocai, and L. Rossetti. (2005). Regulation of blood glucose by hypothalamic pyruvate metabolism. *Science*. 309:943-947.

Levin B, Routh V, Kang L, Sanders N, Dunn-Meynell A. (2004). Neuronal glucosensing: What do we know after 50 years? *Diabetes*. 53: 2521-2528

Lewis, T. B., J. N. Glasgow, et al. (2010). "Transduction of brain dopamine neurons by adenoviral vectors is modulated by CAR expression: rationale for tropism modified vectors in PD gene therapy." *PLoS One* 5(9).

Liu, Q.R.; Pan, C.H.; Hishimoto, A.; Li, C.Y.; Xi, Z.X.; Llorente-Berzal, A.; Viveros, M.P.; Ishiguro, H.; Arinami, T.; Onaivi, E.S.; et al. (2009) Species differences in cannabinoid receptor 2 (CNR2 gene): Identification of novel human and rodent CB2 isoforms, differential tissue expression and regulation by cannabinoid receptor ligands. *Genes Brain Behav.* 8, 519–530.

Mackie, K., Devane, W. A., and Hille, B. (1993). Anandamide, an endogenous cannabinoid, inhibits calcium currents as a partial agonist in N18 neuroblastoma cells. *Mol. Pharmacol.* 44, 498–503

Mackie, K. (2006). Mechanisms of CB1 receptor signaling: endocannabinoid modulation of synaptic strength. *Int. J. Obes (Lond)*. 30:19–23.

Mackie, K. (2008). Cannabinoid receptors: where they are and what they do. *J. Neuroendocrinol.* 20:10–14.

Mandelblat-Cerf Y, Ramesh R, Burgess C, Patella P, Yang Z, Lowell B, Andermann M. (2015). Arcuate hypothalamic AgRP and putative POMC neurons show opposite changes in spiking across multiple timescales. *eLIFE*. 4; 1-25

Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI (1990). Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346: 561–564

Mechoulam, R.; Benshabat, S.; Hanus, L.; Ligumsky, M.; Kaminski, N.E.; Schatz, A.R.; Gopher, A.; Almog, S.; Martin, B.R.; Compton, D.R.; et al. (1995) Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem. Pharmacol.* 50, 83–90.

Millan, C. (2008). Análisis de la localización, regulación e inhibición de la glucoquinasa en glía hipotalámica y su relación con la activación de “neuronas que responden” a glucosa. *Biología Celular*. Concepción, Universidad de Concepción. Doctor en Ciencias.

Millán, C., Martínez, F., Cortes-Campos, C., Lizama, I., Yanez, M. J., P., Reinicke, K., Rodriguez, F., Peruzzo, B., Nualart, F., and García, M. A. (2010). Glial glucokinase expression in adult and post-natal development of the hypothalamic region. *ASN Neuro* 2, e00035.

Morello G., Imperatore R., Palomba L., Finelli C., Labruna G., Pisanisi F., Sacchetti L., Buono L., Piscitelli F., Orlando P., Di Marzo V., Cristino L. (2016). Orexin-A represses satiety-inducing POMC neurons and contributes to obesity via stimulation of endocannabinoid signaling. *113(17):201521304*

Morozov Y, Koch M, Rakic P, Horvath T. (2017). Cannabinoid type 1 receptor-containing axons innervate NPY/AgRP neurons in the mouse arcuate nucleus. *Molecular Metabolism*.

1-8

Mukhopadhyay S, Howlett AC (2001). CB1 receptor-G protein association. Subtype selectivity is determined by distinct intracellular domains. *Eur J Biochem* 268: 499–505.

Mulder J, Aguado T, Keimpema E, Barabas K, Ballester Rosado CJ, Nguyen L et al. (2008). Endocannabinoid signaling controls pyramidal cell specification and long-range axon patterning. *Proc Natl Acad SciUSA* 105: 8760–8765.

Munro S, Thomas KL, Abushaar M (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365: 61–65.

Murataeva, N.; Straiker, A.; Mackie, K. (2013). Parsing the players: 2-arachidonoylglycerol synthesis and degradation in the CNS. *Br. J. Pharmacol.* 171, 1379–1391

Nakazato, M., N. Murakami, Y. Date, M. Kojima, H. Matsuo, K. Kangawa, and S. Matsukura. (2001). A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature*. 409:194- 198.

Navarro M., Rodríguez de Fonseca F., Alvarez E., Chowen J., Zueco J., Gomez R., Eng J., Blázquez E. (1996). Colocalization of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptors, glucose transporter GLUT-2, and glucokinase mRNAs in rat hypothalamic cells: evidence for a role of GLP-1 receptor agonists as an inhibitory signal for food and water intake. *J Neurochem*. 67:1982-1991.

Nyilas, R, Dudok B, Urban G, Mackie K, Watanabe M, Cravatt B, Freund T, Katona I. (2008) Enzymatic machinery for endocannabinoid biosynthesis associated with calcium stores in glutamatergic axon terminals. *J Neurosci.* 28:1058-1063

Oomura, Y., and H. Yoshimatsu. (1984). Neural network of glucose monitoring system. *Journal of the autonomic nervous system.* 10:359-372

Pacher, P.; Batkai, S.; Kunos, G. (2006). The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol. Rev.*, 58, 389–462.

Pagotto U., Marsicano G., Cota D., Lutz B., Pasquali R. (2006). The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation an energy balance. *Endocrine Reviews.* 27(1), 73-100

Pertwee R, Griffin G, Hanus L, Mechoulam R (1994). Effects of two endogenous fatty acid ethanolamides on mouse vasa deferentia. *Eur J Pharmacol* 259: 115–120.

Pertwee, R. G. (2015). Endocannabinoids and Their Pharmacological Actions. *Handb Exp Pharmacol.*; 231:1-37.

Porter AC, Sauer JM, Knierman MD, Becker GW, Berna MJ, Bao J *et al.* (2002). Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. *J Pharmacol Exp Ther.* 301: 1020–1024.

Reguero L, Puente N, Elezgarai I, Ramos-Uriarte A, Gerrikagoitia I, Bueno-López J, Doñate F, Grandes P. (2014). Subcellular localization of NAPE-PLD and DAGL-a in the ventromedial nucleus of the hypothalamus by a preembedding immunogold method. *Histochemistry and Cell Biology* 141(5):543e550

Rinaldi-Carmona M, Barth F, Heaulme M, Shire D, Calandra B, Congy C, Martinez S, Maruani J, Neliat G, Caput D. (1994). SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Lett* 350: 240-244

Rhee M, Bayewitch M, Avidor-Reiss T, Levy R, Vogel Z. (1998). Cannabinoid receptor activation differentially regulates the various adenylyl cyclase isozymes. *J. Neurochem.* 71, 1525–1534

Savinainen, J. R., Järvinen, T., Laine, K., and Laitinen, J. T. (2001). Despite substantial degradation, 2-arachidonoylglycerol is a potent full efficacy agonist mediating CB(1) receptor-dependent G-protein activation in rat cerebellar membranes. *Br. J. Pharmacol.* 134, 664–672.

Schwartz, M.W., S.C. Woods, D. Porte, Jr., R.J. Seeley, and D.G. Baskin. (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature.* 404:661-671.

Smith-Arica, J. R., A. E. Morelli, et al. (2000). "Cell-type-specific and regulatable transgenesis in the adult brain: adenovirus-encoded combined transcriptional targeting and inducible transgene expression." *Mol Ther* 2(6): 579-587

Soudais, C., C. Laplace-Builhe, et al. (2001). "Preferential transduction of neurons by canine adenovirus vectors and their efficient retrograde transport in vivo." *FASEB J* 15(12): 2283-2285

Stark, G. R., I. M. Kerr, et al. (1998). How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem.* 67:227-264

Stella N. (2009). Endocannabinoid signaling in microglia cells. *Neuropharmacology*. 56,244-253.

Suárez J, Bermudez-Silva FJ, Mackie K, Zimmer A, Cravatt B, Fonseca F.(2008). Immunohistochemical description of the endogenous cannabinoid system in the rat cerebellum and functionally related nuclei. *J Comp Neurol*. 509(4):400-421

Suárez J, Romero-Zerbo SY, Rivera P, Bermúdez-Silva FJ, Perez J, et al. (2010) Endocannabinoid system in the adult rat circumventricular areas: an immunohistochemical study. *J Comp Neurol* 518: 3065-3085.

Sugiura, T.; Kondo, S.; Sukagawa, A.; Nakane, S.; Shinoda, A.; Itoh, K.; Yamashita, A.; Waku, K.(1995) 2-arachidonoylglycerol A possible endogenous cannabinoid receptor-ligand in brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 215, 89–97.

Szallasi A, Di Marzo V. (2000). New perspective enigmatic vanilloid receptors. *TINS*. 23(10) 491-497.

Tang, G. (2005). "siRNA and miRNA: an insight into RISCs." *Trends Biochem Sci* **30**(2): 106-114.

Tognetto M, Amadesi S, Harrison S, Creminon, C., Trevisani, M., Carreras, M. (2001). Anandamide excites central terminals of dorsal root ganglion neurons via vanilloid receptor-1 activation. *J. Neurosci*. 21, 1104–1109.

Tomari, Y. and P. D. Zamore (2005). "Perspective: machines for RNAi." *Genes Dev* 19(5): 517-529.

Uranga RM, Millán C, Barahona MJ, Recabal A, Salgado M, Martinez F, Ordenes P, Elizondo-Vega R, Sepúlveda F, Uribe E, García-Robles MLÁ.(2017). Adenovirus-mediated suppression of hypothalamic glucokinase affects feeding behavior. *Sci Rep.* 16;7(1):3697.

Vaughan, C.H., M.C. Moore, C. Haskell-Luevano, and N.E. Rowland. (2005). Meal patterns and foraging in melanocortin receptor knockout mice. *Physiology & behavior.* 84:129-133.

Vaughan, C.H., and N.E. Rowland. (2003). Meal patterns of lean and leptin-deficient obese mice in a simulated foraging environment. *Physiology & behavior.* 79:275-279.

Walter L., Dinh T., Stella N. (2004). ATP induces a rapid and pronounced increase in 2-arachidonoylglycerol production by astrocytes, a response limited by monoacylglycerol lipase. *J Neurosci.* 15; 24(37):8068-74.

Wilkerson J, Donvito G, Grim T, Abdullah R, Ogasawara D, Cravatt B, Lichtman A. (2010). Investigation of Diacylglycerol Lipase Alpha Inhibition in the Mouse Lipopolysaccharide Inflammatory Pain Model. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 363(3), 394-401.

Williams CM, Kirkham TC. (1999). Anandamide induces overeating: mediation by central cannabinoid (CB1) receptors. *Psychopharmacology (Berl).* 143: 315–317.

Williams CM, Kirkham TC. (2002). Reversal of delta 9-THC hyperphagia by SR141 716 and naloxone but not dexfenfluramine. *Pharmacol Biochem Behav.* 71: 333–340

Witting A, Walter L, Wacker J, Moller T, Stella N. (2004). P2X7 receptors control 2-arachidonoylglycerol production by microglial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 3214-3219.

Wu CS, Zhu J, Wager-Miller J, Wang S, O'Leary D, Monory K et al. (2010). Requirement of cannabinoid CB(1) receptors in cortical pyramidal neurons for appropriate development of corticothalamic and thalamocortical projections. *Eur J Neurosci* 32: 693–706.

Zhang H, F. A. Kolb, et al. (2004). Single processing center models for human Dicer and III. *Cell*. 118(1): 57-68.

Zou S, Kumar U. (2018). Cannabinoid receptors and the endocannabinoid system: Signaling and function in the central nervous system. *Int. J. Mol Sci*. 19(3).



