



INFORME PERIODO.....2014 - 2015.....

1. APELLIDO.....REYNALDO.....
Nombre(s).....Mirta Beatriz.....
Título(s). Licenciado en Genética..... Dirección Electrónica: mirtareynaldo@gmail.com

2. OTROS DATOS

INGRESO: Categoría....Asistente.....Mes..Noviembre.....Año..1998.....
ACTUAL: Categoría.....Principal.....Mes..Septiembre.....Año...2011.....

3. PROYECTOS DE INVESTIGACION EN LOS CUALES COLABORA

- a) Estudios del efecto modulador de ghrelina y leptina sobre las neuronas neuropeptidérgicas del hipotálamo.
- b) Estudio del rol modulador del receptor de ghrelina sobre las conductas hiperfágicas agudas
- c) Estudio del circuito neuronal por el cual ghrelina regula aspectos hedónicos del apetito

4. DIRECTOR

Apellido y Nombre (s):.....PERELLÓ, Mario.....
Cargo Institución:..Investigador Independiente del CONICET.....
Dirección:N° .s/n.....Ciudad.....
Dirección Electrónica: mperello@imbice.org.ar.

5. LUGAR DE TRABAJO

Institución:..Instituto.Multidisciplinario.de.Biología.Celular.(IMBICE).....
Dependencia...CIC - CONICET.....
Dirección: Calle...Camino.Gral. Belgrano..... N °.....s/n.....
Ciudad.....La.Plata.....C. P.1900...Prov..Buenos.Aires.....Tel..(0221).421-0112.....

6. INSTITUCION DONDE DESARROLLA TAREAS DOCENTES U OTRAS

Nombre: **Dedicación Exclusiva con actividad única. No Desarrollo Tareas Docentes ni Otras.**

Dependencia.....

Dirección: Calle.....N°.....

Ciudad.....C. P.....Prov.....Tel.....

Cargo que ocupa.....

7. EXPOSICION SINTETICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO (Debe exponerse la actividad desarrollada, técnicas empleadas, métodos, etc. en dos carillas como máximo, en letra arial 12, a simple espacio)

8. OTRAS ACTIVIDADES

8.1 PUBLICACIONES, COMUNICACIONES, ETC. Debe hacerse referencia, exclusivamente, a aquellas publicaciones en las cuales se ha hecho explícita mención de la calidad de personal de apoyo de la CIC. Toda publicación donde no figure dicha aclaración no debe ser adjuntada. Indicar el nombre de los autores de cada trabajo en el mismo orden en que aparecen en la publicación, informe o memoria técnica, año y, si corresponde, volumen y página, asignándole a cada uno un número.

8.2 CURSOS DE PERFECCIONAMIENTO, VIAJES DE ESTUDIO, ETC. Indicar la denominación del curso, carga horaria, institución que lo dictó y fecha, o motivos del viaje, fecha, duración, instituciones visitadas y actividades realizadas.

8.3 ASISTENCIA A REUNIONES CIENTIFICAS/TECNOLOGICAS o EVENTOS SIMILARES. Indicar la denominación del evento, lugar y fecha de realización, tipo de participación que le cupo y título(s) del(los) trabajo(s) o comunicación(es) presentada(s).

9. TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO.

10. OTROS ELEMENTOS DE JUICIO NO CONTEMPLADOS EN LOS TITULOS ANTERIORES. (En este punto se indicará todo lo que se considere de interés para una mejor evaluación de la tarea cumplida en el período).

PAUTAS A SEGUIR EN LA ELABORACIÓN DEL INFORME

Pautas generales

- El informe debe contener los títulos y subtítulos completos que se detallan en hojas adjuntas y un índice
- Se deben anexar al final del informe las copias de las publicaciones, resúmenes de trabajos, informes y memorias técnicas a los que se hace referencia en el desarrollo del mismo, así como cualquier otra documentación que se considere de interés.
- El informe se deberá presentar impreso en hojas perforadas A-4 y en disquete, formato RTF, protegido contra escritura, configurado para papel A4 y libre de virus. En la etiqueta de mismo se consignará el apellido y nombre del Personal de Apoyo y la leyenda «Informe Científico-tecnológico período. . . .
- Incluir en la presentación del informe (en sobre cerrado) la opinión del Director.

INDICE

INDICE	1
7. EXPOSICIÓN SINTÉTICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO	2
7.1.- ACTIVIDAD DESARROLLADA	2
7.1.1.- Reseña de estudios abordados en diferentes ensayos.....	3
7.1.2.- Perfusión, Corte y Preservación del material	3
7.1.3.- Técnica de Inmunohistoquímica	3
7.1.4.- Coloración de Nissl.....	4
7.1.5.- Conteo, análisis microscópico y microfotografías.....	4
7.1.6.- Análisis de Imágenes.....	4
8. OTRAS ACTIVIDADES	5
8.1.- PUBLICACIONES, COMUNICACIONES, ETC.	5
8.1.1.- Publicaciones	5
8.1.2.- Comunicaciones: Congresos	5
8.2.- CURSOS DE PERFECCIONAMIENTO, VIAJES DE ESTUDIO, ETC.	5
8.3.- ASISTENCIA A REUNIONES CIENTIFICAS/TECNOLOGICAS o EVENTOS SIMILARES	5
10. OTROS ELEMENTOS DE JUICIO NO CONTEMPLADOS EN LOS TITULOS ANTERIORES	6
10.1.- Tareas de apoyo.....	6
Plate I	7
Plate II	8
ANEXO: Preparación de Soluciones	9
Certificaciones	10

7. EXPOSICIÓN SINTÉTICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO

7.1.- ACTIVIDAD DESARROLLADA

Con dirección del Dr. Mario Perelló durante el período Agosto 2014 - Agosto 2015 llevé a cabo en las siguientes tareas:

a) perfusión de ratas y ratones, disección y corte de cerebros con crióstato y, montaje de los mismos

b) puesta a punto de doble coloración en muestras de ratones transgénicos para GFP (proteína verde fluorescente)-Nissl (marca núcleos celulares y la sustancia de Nissl, es decir, ribosomas libres y asociados a membranas de las neuronas) para observar el receptor de ghrelina (GHS-R) dentro del complejo vagal dorsal (DVC).

Como también la puesta a punto de doble coloración para dos variedades de C-Fos con un secundario fluorescente (alexa 488).

c) coloraciones de Nissl e inmunohistoquímicas (IHQ) simples y dobles en diversas muestras

d) mapeos de expresión de señales en animales controles y tratados en el NTS (núcleo del tracto solitario), 10N (núcleo dorsal motor del vago), Sol (núcleo del tracto solitario y AP (área postrema).

e) conteo en animales controles y tratados de neuronas y colocalizaciones para:

1) anti-chAT (marcador específico de neuronas colinérgicas) y c-Fos (marcador de activación neuronal) en 10N en los bregmas -6.36 a -8.12.

2) CRH y c-Fos en IPAC (núcleo intersticial de la extremidad posterior de la comisura anterior de la amígdala) y CEM (núcleo amigdaloides central) en los bregmas 0.02 a -1.46 y -0.58 a -1.94, respectivamente.

3) Anti- Fluoresceína en LBP (núcleo parabraquial lateral), solo fibras, en los bregmas -4.96 a -5.68 en animales ayunados.

4) GFP y c-Fos en NTS para muestras contabilizando ambos y las colocalizaciones, además del número de axones GHSR que pasaban cerca de c-Fos y, número de prolongaciones de neuronas (doble marcado) desde AP a núcleos c-Fos positivos del NTS en los bregmas -7.32 a -7.64.

5) GFP y C-Fos en AP y NTS para los bregmas -7,32 a 7,76 y -7,20 a 7,76, respectivamente.

6) GFP, C-Fos y colocalizaciones para proyecciones desde AP a NTS en 32 muestras.

7) GFP y c-Fos en IPAC y CeA (núcleo central de la amígdala) en animales Tg CRH.

8) GFP y c-Fos en AP, NTS y 10N en los bregmas -7.32 a -7.64 y en los bregmas -6.24 a -8.24.

9) Conteos en las tres regiones del VTA para serina 31 en los bregmas -3,4 a -3,8.

10) Número de fibras α Fluoresceína F-GRH en el LBP

En todos los casos se utilizó como referencia anatómica primaria para identificar los bregmas el atlas de Paxinos.

Todos los registros fueron volcados en planillas Excel.

f) microfotografías por captura digital para GFP-Nissl y TRH (hormona liberadora de tirotrina) en ratas, Fosfo-TH serina 31 (anti-fosfoTH-tiroxina hidroxilasa- forma de alta actividad del marcador de neuronas catecolaminérgicas) y serina 40 en VTA y Acb en ambos casos, además del análisis de la absorbancia en esta última con el Software Fiji y, armado de paneles y análisis de imágenes para trabajos enviados a congresos y para su publicación en revistas

g) compra de insumos para el laboratorio e informes quincenales al Sedronar

h) tareas de apoyo a becarios

Cabe destacar mi participación como coautora en cuatro presentaciones a Congresos y en 2 publicaciones, una de sus figura, diseñada por el Dr. Nicolás De Francesco, fue seleccionada para ser tapa del journal Neuroscience Volume 289, 19 March 2015, Pages 153–165 y ante lo cual recibimos felicitaciones por parte de la International Brain Research Organization –IBRO-. Finalmente, es necesario señalar que soy parte del grupo colaborador en 2 subsidios, formo parte del Consejo Directivo del IMBICE como representante de la Carrera del Personal de Apoyo a la Investigación y Desarrollo de CIC-Conicet, realicé un curso de postgrado, participé de una Jornada de microscopía, colaboré con las Comisiones de Bioterio y Microscopía del IMBICE, participé de la Semana de la Ciencia y la Tecnología y, de las jornadas Aniversario del IMBICE, de un Seminario de capacitación y de los seminarios internos del IMBICE. Se adjuntan certificaciones.

7.1.1.- Reseña de estudios abordados en diferentes ensayos

En ratones y empleando un modelo de atracones, inducido por el acceso intermitente a dieta alta en grasas (DAG), analizamos que centros cerebrales neuronales fueron activados y el rol de señalización de ghrelina en la modulación de este comportamiento. También estudiamos el circuito neuronal por el cual ghrelina activa las neuronas CRF (factor liberador de corticotropina) del NPV en ratones macho. Asimismo, mediante el empleo de la línea de ratones CRF-hrGFP realizamos una descripción neuro-anatómica integral de la distribución de neuronas CRF en el complejo amigdalino, y analizamos las diferentes respuestas en las que este subconjunto neuronal podría participar. Por otra parte, se realizó IHQ con el fin de caracterizar el fenotipo de neuronas que expresan GHSR y efectuamos una caracterización neuro-anatómica detallada de la distribución de GHSR en el DVC en ratones transgénicos en el que la proteína fluorescente verde (GFP) está bajo el control del promotor de GHSR (ratones GHSR-GFP). Finalmente, empleando ghrelina fluorescente (F-ghrelina, como un péptido marcador) y c-Fos estudiamos la capacidad de respuesta de neuronas que expresan GHSR en el DVC ante la administración de ghrelina.

Por último, cabe mencionar que todas las evaluaciones se efectuaron con material proveniente de cepas de ratones C57BL6/j o transgénicos y ratas Sprague Dawley, producidas y mantenidas en el Bioterio del IMBICE con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas y temperatura constante de 24°C.

7.1.2.- Perfusión, Corte y Preservación del material

- pesaje del animal
- anestesia IP con hidrato de cloral (Biopack, Argentina)
- perfusión en el ventrículo izquierdo del corazón, primero con solución de lavado (Solución Buffer Fosfato 0,01M –PBS- con heparina) y, luego con solución fijadora de formaldehído al 4% (Biopack, Argentina)
- decapitación y extracción de cerebros
- post-fijación en formaldehído al 4% por 2 horas
- crio-preservación en sacarosa al 20% (Biopack, Argentina) “overnight”
- congelación del espécimen en hielo seco y conservación a -80°C
- cortes coronales del cerebro en 4 ó más series de 25 µm de espesor con crióstato (Minotome American Instrument Exchange Inc., USA)
- preservación de cortes en solución criopreservante a -20°C
- montaje de los cortes de cerebro sobre portaobjetos gelatinizados

Nota: ver **Anexo** Preparación de Soluciones

7.1.3.- Técnica de Inmunohistoquímica

- a) 3 lavados con PBS 0,01M de 10 min cada uno

- b) incubación con H₂O₂ al 0,5% para ratón ó al 0,3% para rata por 30 min
- c) 3 lavados con PBS 0,01M de 10 min cada uno
- d) permeabilización con Dodesyl Sulfato de Sodio -SDS- (Sigma) por 15 min. *Solo para muestras de rata*
- e) bloqueo con Suero Normal de Burro –NDS- (Equitech-Bio Inc., USA) en Buffer de Fosfatos Tritón (PBT) por 60 min
- f) incubación con anti-C-Fos (Calbiochem PC38, USA) y/o TRH, NPY y ACTH (generados por Dr. Eduardo Nillni de Universidad de Brown, USA) o CRF (generado por Dra. Castro, Universidad de Michigan, USA) o TH (Sigma T2928) o 5HT_{2c} (sc-17797, Santa Cruz Biotechnology, USA), entre otros, por 24-48 hs a temperatura ambiente (TA) ó a 4°C, según correspondiera
- g) 3 lavados con PBS 0,01M de 10 min cada uno
- h) incubación a TA con anti-rabbit o anti-mouse (BA1000 o BA9200 Vector Labs, USA) por 60 min
- i) 3 lavados con PBS 0,01M de 10 min cada uno
- j) incubación a TA con solución peroxidasa biotinilada-avidina (ABC, Vector Kit PK-6200, USA) por 60 min
- k) 3 lavados con PBS 0,01M de 10 min cada uno
- l) revelado en agitación con DAB (3,3'-diaminobenzidina, Vector, SK-4100, USA) con o sin cloruro de níquel (Biopack, Argentina) por 10 min
- m) 3 lavados con PBS 0,01M de 10 min cada uno
- n) deshidratación en alcoholes 70°, 96° y 99,5° (Biopack, Argentina) por 2 min en cada uno y posterior aclaración en xilol (Biopack, Argentina) por 30 min
- o) montaje con Bálsamo de Canadá (Biopack, Argentina) o anti-fading con o sin Hoechst H33258 (B2883, Sigma), según correspondiera

Nota: en Anexo Soluciones

7.1.4.- Coloración de Nissl

- 1) 1 pasaje en H₂O destilada por 1 min
- 2) 1 pasaje en Solución de Tionina (Certistain®, Merck) por 20 min
- 3) 1 pasaje en H₂O destilada por 1 min
- 4) 2 pasajes en alcohol 96° por 1 min cada uno
- 5) 2 pasajes en alcohol 100° por 1 min cada uno
- 6) 1 pasaje en xilol por 5 min
- 7) montaje con Bálsamo de Canadá

Nota: en Anexo soluciones.

7.1.5.- Conteo, análisis microscópico y fotomicrografías

El material ensayado fue analizado con microscopio Nikon (Nikon Corporation, Japan), lentes múltiples neofluar-PH y óptica de campo claro. Mientras que, las fotomicrografías se captaron con cámara Nikon Digital Sight D5-U3 y software NIS-Elements, Versión 3.22. En la **Plate I** se muestran microfotografías del NPV de secciones de cerebro sometidos a doble IHQ para c-Fos y CRF, mientras en la **Plate II** se observan imágenes de doble inmunohistoquímica en el VTA para TH y c-Fos

7.1.6.- Análisis de Imágenes

Las imágenes microscópicas se analizaron con los software's Adobe Photoshop CS2 9.0.2, Focus Magic 3.02 y/o Noiseware Professional 4.1.1 en tanto que las mediciones celulares y nucleares con los software's Image-Pro Plus 6.0 e ImageJ versión 1.49a. También, como se ha mencionado, llevé a cabo el análisis de absorbancia en muestras fosfo-TH serina 31 y 40 empleando el software Programa (Fiji Is Just) ImageJ- 1.49^a; para ello tomé las microfotografías, realicé correcciones,

concatené las imágenes, delinee las áreas a evaluar, efectué las mediciones y volqué los valores en planillas Excel.

8. - OTRAS ACTIVIDADES

8.1.- PUBLICACIONES, COMUNICACIONES, ETC.

8.1.1. - Publicaciones

Año 2015

- *Neuroanatomical and Funtional Characterization of CRF Neurons of the Amygdala using a Novel Transgenic mouse model*. P. N. DE Francesco, S. Valdivia, A. Cabral, **M. Reynaldo**, J. Raingo, I. Sakata, S. Osborne-Lawrence, JM. Zigman y M. Perelló. *Neurociencia*. Volumen 289: 153-165, 19 March 2015. *Una Imagen de este artículo fue elegida para ser tapa de ese fascículo de la revista Neuronscience.*

- *Escalation in high-fat intake during repeated binge eating episodes differentially engages dopaminergic neurons of the VTA and requires ghrelin signaling*. Valdivia S, Cornejo P, De Francesco PN, **Reynaldo M**, Perelló M. *Psychoneuroendocrinology*. Received: March 5, 2015; Accepted: June 29, 2015; Published Online: July 03, 2015; 60: 206-216. doi: 10.1016 / j.psyneuen.2015.06.018.

8.1.2. - Comunicaciones: Congresos

Año 2014

- *Circulating or cerebrospinal fluid ghrelin regulates different neuronal circuits within the dorsal vagal complex*. Cornejo MP, Cabral A, De Francesco PN, Fernández G, Valdivia S, García Romero G, **Reynaldo M**, Perelló M. XXIX Congreso Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Neurociencia, 29 Septiembre al 3 de Octubre 2014. Huerta Grande, Córdoba. En *Medicina Buenos Aires Vol 74 Supl. III – 2014*. ISSN 0025-7680 (IMPRESA), ISSN 1669-9106 (EN LÍNEA)

- *Unveiling the CRF Neurons of the Amygdala: Neuroanatomical and Functional Characterization using a Novel Transgenic Mouse Mode*. De Francesco PN, Valdivia S, Cabral A, Patrone A, García-Romero G, **Reynaldo M**, Raingo J, Perelló M. XXIX Congreso Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Neurociencia, 29 Septiembre al 3 de Octubre 2014. Huerta Grande, Córdoba

- *Ghrelin Signaling is Required for Escalation in High-Fat Intake during Repeated Binge Eating Episodes*. Valdivia S, Cornejo MP, De Francesco PN, García Romero G, **Reynaldo M**, Perello M. XXIX Congreso Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Neurociencia, 29 Septiembre al 3 de Octubre 2014. Huerta Grande, Córdoba

- *Ghrelina active las neuronas CRF del núcleo paraventricular hipotalámico a través de un circuito que involucraría la inhibición del tono GABAérgico local*. Cabral A, Castrogiovanni D, Frassa, V, **Reynaldo M**, Portiansky E, Perelló M. LIX Congreso de Sociedad Argentina de Investigación Clínica y LXII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. 19-22 Noviembre 2014, Mar del Plata, Argentina. *Segundo Premio a Póster en el Área Neurociencias.*

8. 2.- CURSOS DE PERFECCIONAMIENTO, VIAJES DE ESTUDIO, ETC.

- Neurociencia: preguntas claves y enfoques metodológicos actuales. Curso de Postgrado 14 y 15 de Agosto de 2014 de 18 hs. Facultad de Ciencias Exactas, UNLP. Se adjunta programa y certificado.

- Nuevas Microscopías. Microscopios y Sistemas de Registros y Evaluación de Imágenes. Jornada Organizada por CiOP-IMBICE, 3 de Octubre de 2014, Campus Tecnológico CIC de Gonnet, La Plata. Se adjunta programa y certificado.

8.3.- ASISTENCIA A REUNIONES CIENTÍFICAS/TECNOLÓGICAS o EVENTOS SIMILARES.

Año 2014-2015

- Jornadas de Celebración de los 40 años del IMBICE, 28 y 29 de Noviembre de 2014
- XII Semana Nacional de la Ciencia y la Tecnología, edición 2014. Se adjunta certificado.
- Seminario de capacitación en manejo de animales de laboratorio (rata y ratón). Organizado por el Bioterio del IMBICE, 6 de Noviembre de 2014. Se adjunta constancia.
- *Seminarios*. Organizados por IMBICE.

10.- OTROS ELEMENTOS DE JUICIO NO CONTEMPLADOS EN LOS TITULOS ANTERIORES

10. 1.- Tareas de apoyo

- Explicación a usuarios de diferentes laboratorios del IMBICE sobre captura de fotomicrografías
- Tareas de apoyo en conteo, análisis de imágenes e IHQ a becarias de nuestro laboratorio.
- Compras de insumos y elaboración del listado Sedronar para el Laboratorio de Neurofisiología
- Preparación de soluciones empleadas en los diferentes ensayos

PLATE I

El núcleo ARC es innecesario para que ghrelina active a neuronas CRF

Microfotografías del NPV de secciones de cerebro sometidos a doble IHQ para c-Fos (negro) y para CRF (marrón) de ratones control y con el ARC lesionado. Ambos grupos fueron inyectados subcutáneamente con vehículo o con ghrelina. Las flechas señalan las células doblemente positivas.

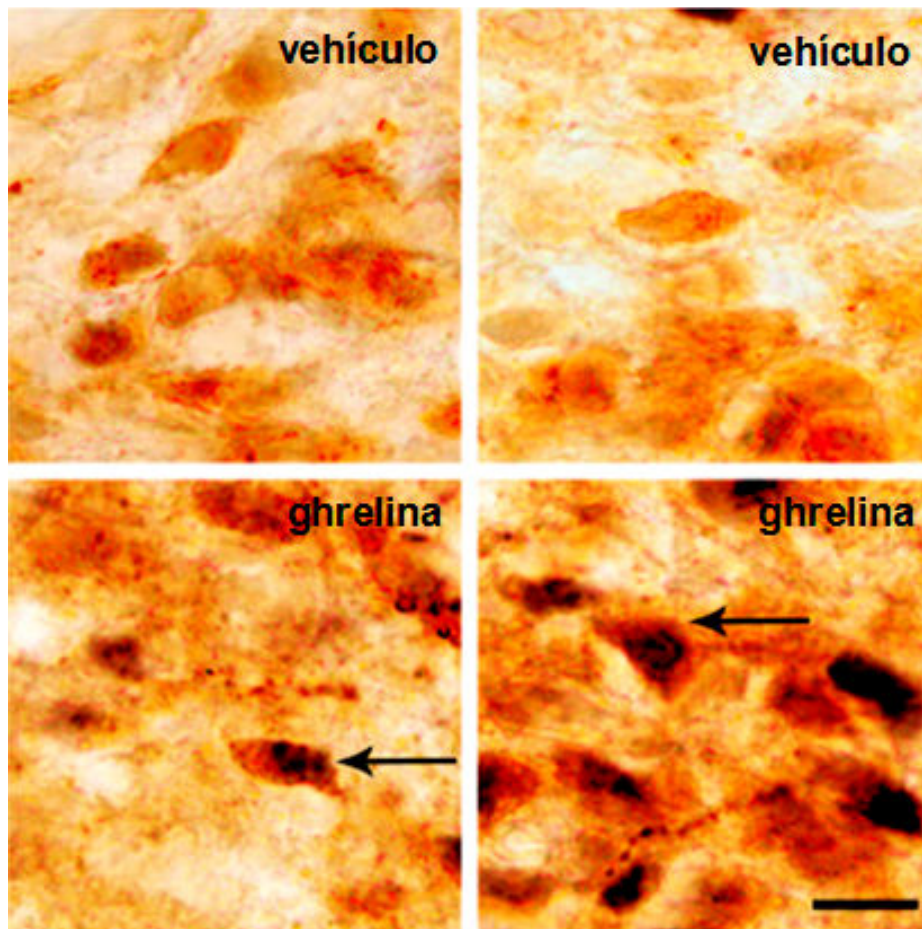
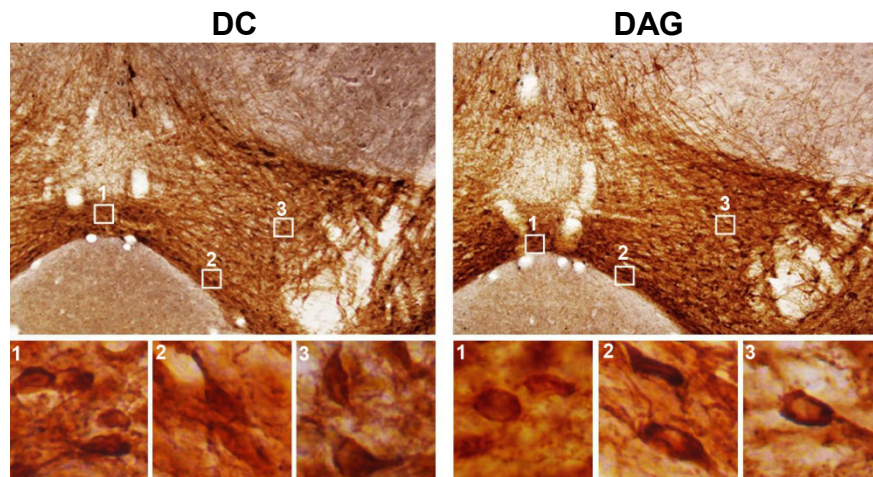


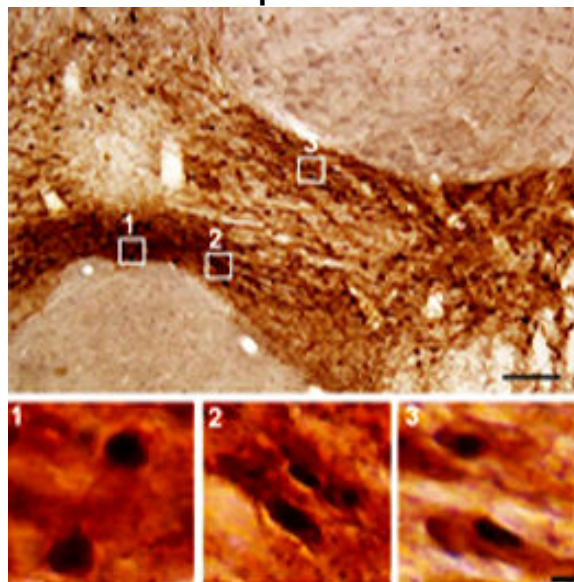
PLATE II

El acceso intermitente y limitado a dieta alta en grasa activa la vía mesolímbica

Microfotografías de secciones del VTA de animales sometidos a dieta común y alta en grasa con doble inmunotinción con anti-TH (tinción marrón) y anti-c-Fos (tinción negro), a baja magnificación (panel superior) y a alta magnificación (paneles inferiores). Las imágenes muestran las sub-regiones del VTA: **1** núcleo interfascicular (alta magnificación e inserto), **2** núcleo paranigral (alta magnificación e inserto) y **3** área pigmentada parabraquial (alta magnificación e inserto). En la microfotografía inferior se observan las colocalizaciones en una muestra de ratón sometido a 4 días de DAG.



DAG/post-4 día



ANEXO

Preparación de Soluciones

ABC 1: 500: reactivo A 10 μ l, reactivo 10 μ l B y PBS 5 ml pH 7.4

Anti-Fading: PBS 0.01M 5 ml, DABCO (1,4-Diazabicyclo [2.2.2]-octane) 0.1g y glicerol 5 ml

Anti-Fading con H \ddot{o} chst: Soluci \acute{o} n anti-fading 1 ml y bisBenzimide H33258 10 μ l

Buffer Fosfato (PBS) 0.1 M 10x pH 7.4: H $_2$ O destilada 1000 ml, Na $_2$ HPO $_4$ 10.9 g, NaH $_2$ PO $_4$ 3.2 g y NaCl 81.6 g. Ajuste a pH con NaOH 10M

Buffer Fosfato Trit \acute{o} n (PBT): trit \acute{o} n X 500 μ l en 200 ml de PBS 0.01M

Cloruro de N \acute{i} quel al 8%: H $_2$ O destilada 10 ml y cloruro de n \acute{i} quel 0.8 g

DAB: Soluci \acute{o} n Stock al 1%: H $_2$ O destilada 10 ml, DAB 0.1 g y HCl 1N 1ml.

Soluci \acute{o} n de Trabajo: PBS 5 ml, DAB al 1% 250 μ l, cloruro de n \acute{i} quel al 8% 250 μ l y H $_2$ O $_2$ al 0.3% 250 μ l

Dodesyl Sulfato de Sodio (SDS): PBS 0,01M 10 ml y SDS 300 μ l

Formaldeh \acute{i} do al 4%: PBS 0.01M 450 ml y formaldeh \acute{i} do 50 ml

Gelatina para portaobjetos: H $_2$ O desionizada 500 ml a 60 $^{\circ}$ C, gelatina 1.5 g y al \acute{u} mina 0.25g

Gelatinizaci \acute{o} n de portaobjetos: inmersi \acute{o} n en gelatina a 60 $^{\circ}$ C por 5 min de portaobjetos en racks, escurrido y secando en estufa a 60 $^{\circ}$ C durante 48 hs

Hidrato de Cloral: H $_2$ O destilada 5 ml e hidrato de cloral 3 g

H $_2$ O $_2$ al 0,5%: PBS 0.01M 10 ml y H $_2$ O $_2$ al 30% 166 μ l

H $_2$ O $_2$ al 0,3%: H $_2$ O $_2$ al 30% 100 μ l y H $_2$ O destilada 10 ml pH 7.2

Soluci \acute{o} n Criopreservante: PBS 0.1 M 50 ml, etilenglicol 30 ml y glicerol 20 ml

Soluci \acute{o} n Bloqueante: PBT 5000 μ l y suero normal de burro (NDS) 150 μ l

Soluci \acute{o} n de Lavado: PBS 0.01M 500 ml y heparina c \acute{a} lcica 200 μ l

Soluci \acute{o} n de Sacarosa al 20%: PBS 0.01M 40 ml y sacarosa 8 g

CERTIFICACIONES

ESTUDIO DEL ROL MODULADOR DEL RECEPTOR DE GHRELINA SOBRE LAS CONDUCTAS
HIPERFÁGICAS AGUDAS

CARÁTULA DE GRUPO

Convocatoria

Tipo	Proyectos de Investigación Científica y Tecnológica Orientados (2013)
Categoría	GlaxoSmithKline
Tipo de Proyecto	Equipo de Trabajo

Datos generales del proyecto

Áreas Temáticas	Principal : Ciencias Médicas Secundarias : Ciencias Biológicas de Organismos y Sistemas
Prioridad Regional	No Aplica
Duración	3 años
Ubicación	Argentina, Buenos Aires
Investigador Responsable	Perello, Mario
Fecha de alta	25-09-2013

Unidad Ejecutora

Razón Social	INSTITUTO MULTIDISCIPLINARIO DE BIOLOGIA CELULAR	Telefono	54 (0221) 421 0112 / 54 (0221) 425 3320	Email	direccion@imbice.org
--------------	--	----------	---	-------	----------------------

Investigador Responsable

Nombre	Apellido	Rol	Firma
Mario	Perello	Investigador Responsable	

Conformación de Grupo Responsable

Conformación de Grupo Colaborador

Mirta Beatriz	Reynaldo	Otra Función	
María Victoria	Frassa	Investigador	
Jesica	Raingo	Investigador	
Silvia Susana	Rodriguez	Otra Función	
Pablo Nicolas	de Francesco	Becario	
Agustina Soledad	Cabral	Becario	
Lesly Spring	Valdivia Torres	Becario	
Lucila Anabela	Patrone	Becario	

Becas

Tipo	Descripción
Tipo de la Beca	

PROYECTO ENVIADO

Impreso por: Mario Perello

Fecha/Hora: 29-09-2013 14:16:17

Página 5 de 7

ESTUDIO DEL CIRCUITO NEURONAL POR EL CUAL GHRELINA REGULA ASPECTOS
HEDONICOS DEL APETITO

CARÁTULA DE GRUPO

Convocatoria

Tipo	Proyectos de Investigación Científica y Tecnológica (2011)
Categoría	Temas Abiertos
Tipo de Proyecto	Equipo de Trabajo

Datos generales del proyecto

Áreas Temáticas	Principal : Ciencias Biológicas de Organismos y Sistemas Secundarias : Ciencias Médicas
Prioridad Regional	No Aplica
Duración	3 años
Ubicación	Argentina, Buenos Aires
Investigador Responsable	Perello, Mario
Fecha de alta	28-05-2011

Unidad Ejecutora

Razón Social	INSTITUTO MULTIDISCIPLINARIO DE BIOLOGÍA CELULAR	Telefono	0221-4210112 / 4253320	Email	secretaria@imbice.org.ar
--------------	--	----------	------------------------	-------	--------------------------

Investigador Responsable

Nombre	Apellido	Rol	Firma
Mario	Perello	Investigador Responsable	

Conformación de Grupo Responsable

Conformación de Grupo Colaborador

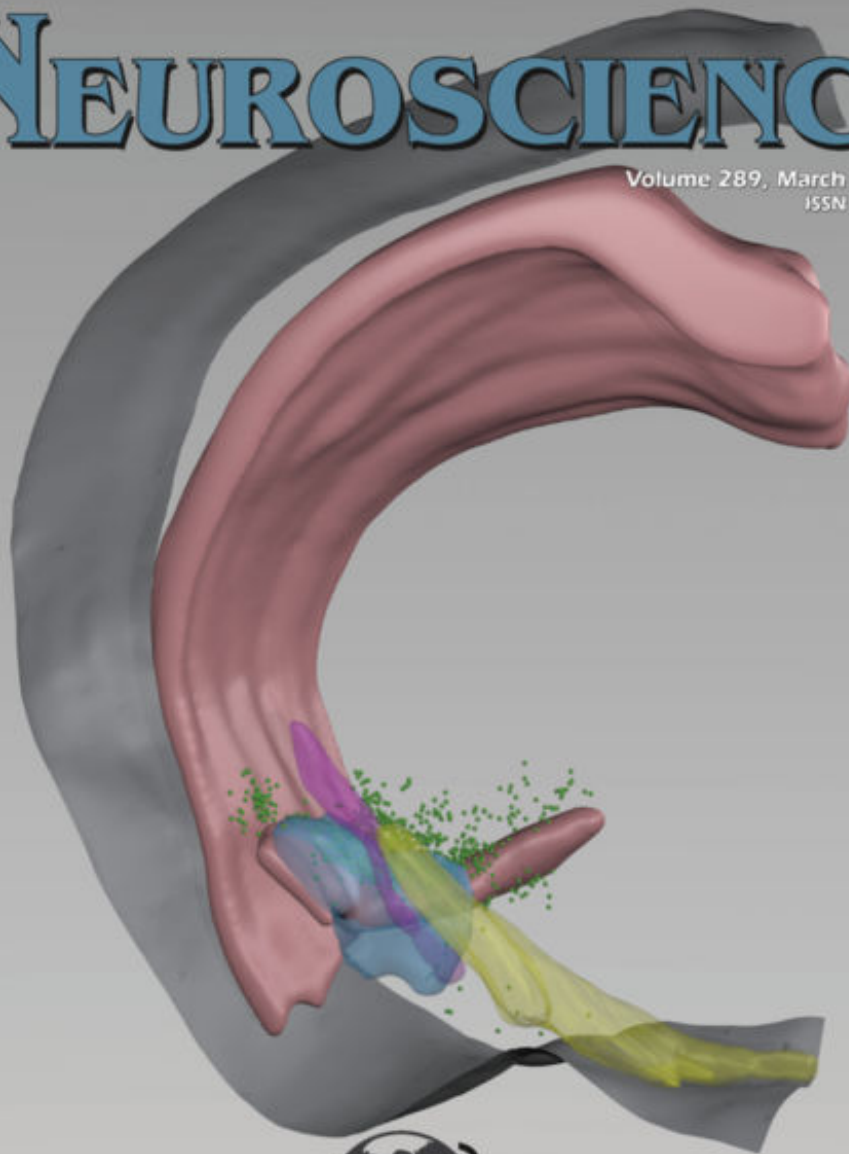
Nombre	Apellido	Otra Función
Mirta Beatriz	Reynaldo	Otra Función
Agustina Soledad	Cabral	Becario
Lesly Spring	Valdivia Torres	Becario
cintia yamila	quiroga	Estudiante
Ayelen	Moreno	Estudiante
Silvia Eliana	Gordon	Estudiante
Lucila Anabela	Patrone	Estudiante

Becas

Tipo	Descripcion
Doctoral	Se solicita una beca doctoral por 3 años que servira para incorporar al laboratorio un nuevo becario, quien se dedicara en forma exclusiva a este proyecto como parte de su Tesis Doctoral.

NEUROSCIENCE

Volume 289, March 19, 2015
ISSN 0306-4522





INTERNATIONAL BRAIN RESEARCH ORGANIZATION

Bringing Neuroscience to the World

[Home](#) [About IBRO](#) [News and Events](#) [Membership](#) [Professional Development](#) [Global Advocacy Program](#)

Next Neuroscience Cover from IMBICE, Argentina!



From left to right and top to bottom: first row - Dr. Agustina Cabral, Lic. Gimena Fernandez, Lic. Mirta Reynaldo; **second row** - Lic. Paula Cornejo, Dr. Guadalupe García-Romero, Lic. Maia Uriarte; **third row** - Dr. Mario Perello, Lic. Spring Valdívia, Beltina Leon (third line). And Dr. Nicolas De Francesco.

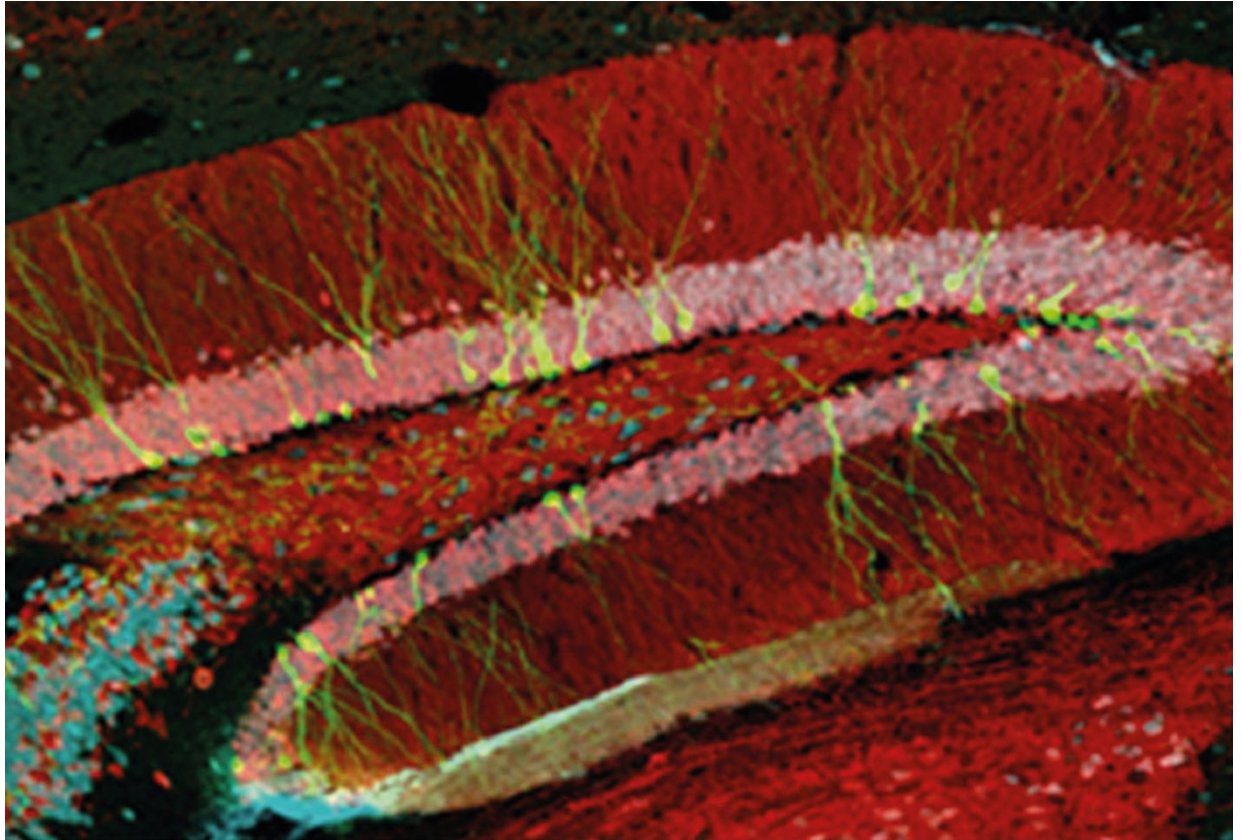
CONGRATULATIONS TO TEAM IMBICE! A figure produced by the Laboratory of Neurophysiology team at the Multidisciplinary Institute of Cell Biology (Instituto Multidisciplinario de Biología Celular, **IMBICE**) in La Plata, Argentina, was selected to be the cover for the next **IBRO Neuroscience issue (Vol. 289)** to be published on Thursday, March 19! Read about their research in the article of the same volume, "Neuroanatomical and functional characterization of CRF neurons of the amygdala using a novel transgenic mouse model" (p.153-165).

IBRO would like to especially congratulate IMBICE team member, **Dr. Mario Perello**, one of our IBRO Return Home Award alumni (2009), for his continued commitment to advancing neuroscience research after moving back to Argentina. We are so fortunate to support such excellent neuroscientists and their work!

We encourage all other neuroscientists to take advantage of our various funding programs as well. Find out more here: <http://ibro.info/professional-development/funding-programmes/>. Also, if you are another IBRO alumnus who would like to share your achievements, stories and research, please let us know! We would love to hear from you at ibrocentral@gmail.com.



About	Funding & Education	News & Events	Members	Alumni
Mission	Research Fellowships	Africa	Affiliated Organizations	Alumni Forum
History	Return Home Fellowships	Asian/Pacific Region	Benefits of Membership	Alumni News
Site Map	Travel Grants	Europe	Membership Dues	BrainFacts.org



XXIX ANNUAL MEETING AND SAN-ISN SMALL CONFERENCE AND COURSE

*"New mechanisms of neuro-glial interaction:
Their contribution to nervous system development and repair"*



September 29 | October 3, 2014
Huerta Grande, Córdoba, Argentina

P104.-Circulating or cerebrospinal fluid ghrelin regulates different neuronal circuits within the dorsal vagal complex

María Paula Cornejo, Agustina Cabral, Pablo Nicolás De Francesco, Gimena Fernández, Spring Valdivia, Guadalupe García Romero, Mirta Reynaldo, Mario Perelló
Laboratorio de Neurofisiología, Instituto Multidisciplinario de Biología Celular
mpaulacornejo@hotmail.com

The dorsal vagal complex (DVC) of the brainstem includes the nucleus of the solitary tract (NTS), the area postrema (AP) and the dorsal motor nucleus of the vagus. The DVC is an integrative center that regulates food intake and relays autonomic neural circuits. The ghrelin receptor, also known as growth hormone secretagogue receptor (GHSR), is expressed in the DVC. Here, we performed an anatomical characterization of the distribution of GHSR in the DVC using a transgenic mouse in which the green fluorescent protein is controlled by the GHSR promoter. Also, we used double staining with markers of neuronal populations to characterize the GHSR-expressing neurons, and we used the marker of cellular activation c-Fos to study the responsiveness of GHSR-expressing neurons to ghrelin. We confirmed that GHSR-expressing neurons exist in all three components of the DVC. These GHSR-expressing neurons failed to express corticotrophin releasing factor, thyrotropin releasing hormone, neuropeptide Y, choline acetyl-transferase, tyrosine hydroxylase or Met-enkephalin. Interestingly, peripherally administered ghrelin mainly activates GHSR-expressing neurons of the AP, while centrally administered ghrelin activates GHSR-expressing neurons of both the AP and the NTS. Thus, GHSR-expressing neurons of the AP seem to sense plasma ghrelin, while GHSR-expressing neurons of the NTS mainly respond to cerebrospinal fluid ghrelin. The phenotype of these GHSR-expressing neurons remains to be determined.

P106.-Unveiling the CRF Neurons of the Amygdala: Neuroanatomical and Functional Characterization using a Novel Transgenic Mouse Model

Pablo Nicolás De Francesco, Spring Valdivia, Agustina Cabral, Anabela Patrone, Mirta Reynaldo, Mario Perelló

Laboratorio de Neurofisiología, Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE)
nicolasdefrancesco@gmail.com

The amygdalar corticotrophin releasing factor (CRF)-producing neurons have been implicated in mediating behavioral and physiological responses related to fear, anxiety, stress and reward. Yet, the study of this set of neurons has been hindered by their challenging identification. By means of a novel transgenic mouse line in which humanized green fluorescent protein (GFP) is under the control of the CRF promoter (CRF-GFP mice), we were able to overcome this issue, allowing for a detailed neuroanatomical insight as well as serving as functional exploratory tool. CRF neurons were observed mainly along the IPAC, with a distribution ranging from the medial part of the CeA to the posterior part of the anterior commissure. Using c-Fos as a marker of neuron activation we explored the response of these neurons by exposing CRF-GFP mice to different experimental paradigms known to activate this region: ghrelin treatment, melanocortin 4 receptor agonist treatment, a conditioned taste aversion paradigm, a high fat diet bingeing paradigm, a high fat diet withdrawal paradigm, i.p. LPS treatment, a social defeat protocol, and a fasting-refeeding protocol. Of all the cited conditions, only the former three protocols showed a significant increase of c-fos expression in CRF neurons, suggesting they are mainly involved in specific responses related to these paradigms. Overall, this novel CRF-GFP line provides a powerful tool to investigate this intriguing neuronal subset.

P105.-Ghrelin signaling is required for escalation in high-fat intake during repeated binge eating episodes

Spring Valdivia, María Paula Cornejo, Pablo Nicolás De Francesco, Guadalupe García Romero, Mirta Reynaldo, Mario Perelló
Laboratorio de Neurofisiología, Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE)
mpaulacornejo@hotmail.com

Many people suffering eating disorders display binge eating episodes, in which an excessive amount of palatable foods is rapidly consumed. Ghrelin is a stomach derived hormone that strongly increases food intake. Little is known about the neuronal circuitries activated during binge eating episodes or the role of ghrelin on this behavior. Here, we used a combination of behavioral and neuroanatomical studies in genetically or pharmacologically manipulated mice to determine the neuronal brain centers activated in a binge eating model induced by intermittent access to high fat diet (HFD). We also examined the potential role of ghrelin in the modulation of this behavior. First, we confirmed that Intermittent and limited access to HFD induces binge eating events with an escalating profile. By using c-Fos immunostaining, we found that HFD binging activated neuronal populations of the mesolimbic pathway, including dopamine-neurons of the ventral tegmental area (VTA) and orexin neurons of the lateral hypothalamus. Orexin signaling blockage failed to affect escalation of HFD binging events and c-Fos induction in the VTA. Interestingly, ghrelin signaling was required for escalation of HFD binging events and full c-Fos induction in the VTA. Thus, we conclude that ghrelin signaling is required for escalation in HFD intake during repeated binge eating episodes presumably by regulating the sensitivity of the mesolimbic pathway to the rewarding stimulus.

María P. Cornejo¹, Agustina Cabral¹, Pablo N. De Francesco¹, Gimena Fernández¹, Spring Valdivia^{1,2}, Guadalupe García Romero¹, Mirta Reynaldo^{1,2}, Mario Perelló¹.
¹Laboratory of Neurophysiology of the Multidisciplinary Institute of Cell Biology (CONICET/CIC²), La Plata, Buenos Aires, Argentina, 1900.

INTRODUCTION

The dorsal vagal complex (DVC) of the brainstem includes the nucleus of the solitary tract (NTS), the area postrema (AP), and the dorsal motor nucleus of the vagus (10N). The DVC is an integrative center that regulates food intake and also relays autonomic neural circuits that control many key functions including blood glucose concentration, blood pressure, gastro-intestinal motility, among others. The growth hormone secretagogue receptor (GHSR), which is the target of the hormone ghrelin, is expressed in the DVC.

Given the technical difficulties to identify GHSR by traditional techniques, the detailed neuroanatomical distribution of GHSR-expressing neurons within the DVC and the physiological role of ghrelin signaling on this brain area are unclear.

In the current study, we performed a detailed neuroanatomical characterization of the distribution of GHSR within the DVC using a transgenic mice in which the green fluorescent protein (GFP) is under the control of the GHSR promoter (GHSR-GFP mice). Also, we performed immunohistochemistry (IHC) with markers of specific neuronal populations in order to characterize the phenotype of the GHSR-expressing neurons. Finally, we used fluorescein-ghrelin (F-ghrelin, as a tracer peptide) and the marker of cellular activation c-Fos to study the responsiveness of GHSR-expressing neurons of the DVC to ghrelin.

RESULTS

1) Neuroanatomical characterization of the GHSR-expressing neurons distribution within the DVC

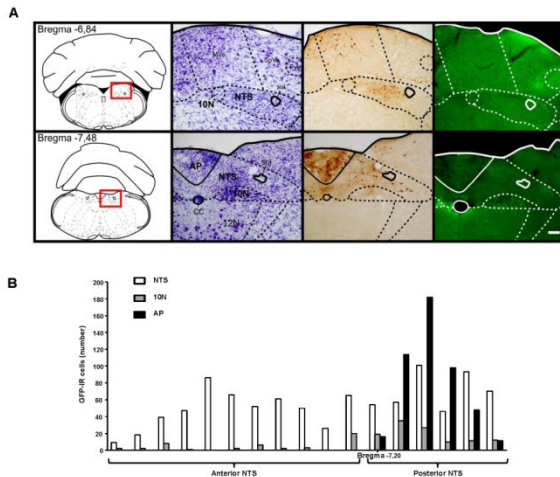


Figure 1. Panel A shows representative photomicrographs of coronal brain sections of GHSR-GFP mice subjected to thionin staining, IHC using an anti-GFP (brown staining) antibody or visualized directly for GFP autofluorescence (green signal). Upper and bottom panels show the anterior and posterior DVC, respectively. Scale bar: 100 µm. Panel B shows the quantitative analysis of GFP-immunoreactive (IR) cells in the three components of the DVC. This analysis was made from representative photomicrographs of eight series of coronal brain sections of GHSR-GFP mice subjected to IHC using an anti-GFP. The three components of the DVC were differentially identified based on Paxinos and Franklin's Atlas.

2) Phenotypical characterization of the GHSR-expressing neurons of the DVC

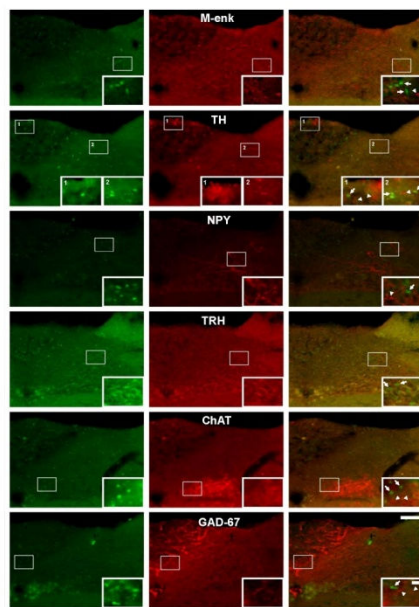


Figure 2. Panels show representative photomicrographs of coronal brain sections of GHSR-GFP mice subjected to IHC using different markers of specific neuronal populations. The first column shows the GFP autofluorescence. The second column shows, from top to bottom, the IHC using either anti Met-enkephalin (M-enk), anti-tyrosine hydroxylase (TH), anti-neuropeptide Y (NPY), anti-tyrosin releasing hormone (TRH), anti-choline acetyltransferase (CHAT), or anti- glutamate decarboxylase 67 (GAD-67) antibodies (red staining). The third column shows the merge of the respective green and red images. Inserts in each panel shows in high magnification the areas marked in low magnification photomicrographs. Arrows point to GFP cells and arrowheads point to IR cells. No GFP cells were found positive for the markers used in the current study. Scale bars: 100 µm (low magnification) 10 µm (high magnification).

3) Responsiveness of GHSR-expressing neurons of the DVC to central or peripheral ghrelin administration

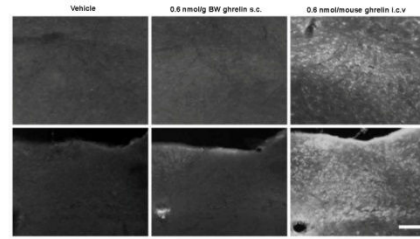


Figure 3. Panels show a series of photomicrographs of coronal sections of the DVC of wild type mice that were treated with either vehicle (left panel), fluorescein-ghrelin peripherally (subcutaneously, s.c., BW: body weight, middle panel) or fluorescein-ghrelin centrally (intra-cerebroventricular, i.c.v., right panel) and perfused 15 min later. Coronal brain sections were processed for IHC using an anti-fluorescein antibody and followed by a chromogenic reaction achieved by using a biotinylated secondary antibody, a streptavidin-peroxidase complex and diaminobenzidine. Top and bottom horizontal panels show inverted series of images of the chromogenic immunostaining of the anterior and posterior levels of the DVC, respectively. Scale bar: 100 µm.

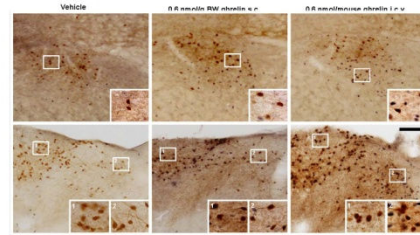


Figure 4. Panels show representative photomicrographs of coronal brain sections of GHSR-GFP mice subjected to double IHC for GFP (brown) and c-Fos (black) in anterior (upper line) and posterior DVC (bottom line) of vehicle- and ghrelin-treated mice. Inserts in each panel show high magnification areas marked in low magnification photomicrographs. Scale bars: 100 µm (low magnification), 10 µm (high magnification). Bar graphs show the quantitative analysis of GFP-IR cells positive for c-Fos and c-Fos-IR cells in the AP, anterior NTS, and posterior NTS of vehicle- and ghrelin-treated mice. Data represent the mean ± SEM. * p < 0.05 vs. vehicle-treated group by one-way ANOVA. ** p < 0.05 vs. vehicle-treated group by Student's t-test.

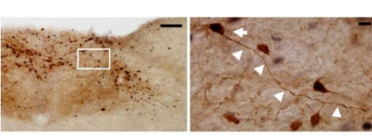
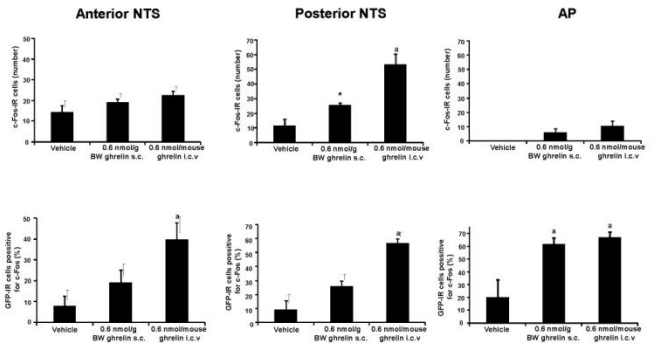
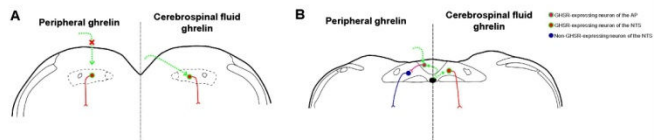


Figure 5. Panels show photomicrographs of the posterior DVC of a ghrelin-treated GHSR-GFP mouse subjected to double IHC for GFP (brown) and c-Fos (black) in which it can be appreciated that GHSR-expressing neurons of the AP project to the NTS. Right photomicrograph shows high magnification area marked in low magnification photomicrographs (left). Arrows point to the cell body of a dual-labeled cell located in the AP and arrowheads point to its axon. Scale bars: 100 µm (low magnification), 10 µm (high magnification).

CONCLUSIONS

- GHSR-expressing neurons are present in all three components of the DVC and enriched in the AP.
- The phenotype of GHSR-expressing neurons of the DVC remains to be elucidated.
- The following model summarizes current results and displays a potential mechanism of ghrelin action on the DVC.



Images A and B depict coronal views of the anterior and posterior levels of the DVC, respectively. Peripheral ghrelin would activate GHSR-expressing neurons of the AP directly while peripheral ghrelin would be unable to reach the NTS and, as a consequence, GHSR-expressing neurons of the NTS could not respond directly to the hormone. However, a subset of NTS neurons could respond indirectly to peripheral ghrelin via the initial activation of GHSR-expressing neurons of the AP that innervate the NTS. Ghrelin present in the cerebrospinal fluid can access not only to the AP but also to the NTS, where it directly activates GHSR-expressing neurons of the anterior and posterior levels of this nucleus. NTS neurons that respond to ghrelin via direct and indirect mechanisms may have different physiological roles.

Acknowledgements
This work was supported by grants of the National Agency of Scientific and Technological Promotion of Argentina (PICT2010-1954 and PICT2011-2142) to MP.

Unveiling the CRF Neurons of the Amygdala: Neuroanatomical and Functional Characterization using a Novel Transgenic Mouse Model

De Francesco, Nicolás; Valdivia, Spring; Cabral, Agustina; Patrone, Anabela; Reynaldo, Mirta; Perelló, Mario
Laboratorio de Neurofisiología, Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE), CIC-CONICET, La Plata, Argentina.



INTRODUCTION

The amygdalar corticotropin releasing factor (CRF)-producing neurons have been implicated in mediating behavioral and physiological responses related to fear, anxiety, stress and reward. Yet, the study of this set of neurons has been hindered by their challenging identification. By means of a novel transgenic mouse line in which humanized green fluorescent protein (hrGFP) is under the control of the CRF promoter (CRF-hrGFP mice), we were able to overcome this issue, allowing for a detailed neuroanatomical insight as well as serving as functional exploratory tool.

AIMS

The aim of the present work was to make a comprehensive neuroanatomical description of the distribution of CRF neurons in the amygdaloid complex, by taking advantage of this novel CRF-hrGFP mouse line, as well as to explore the different responses in which this particular neuronal subset may participate.

RESULTS

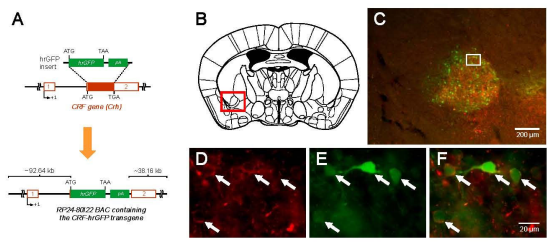


Figure 1. Novel CRF-hrGFP mice. Panel A shows a schematic diagram of the derivation of CRF-hrGFP mice. In order to generate the transgene, the 564-bp of CRF's coding sequence (denoted by a red filled rectangle) was replaced by the coding sequence of hrGFP followed by an SV40 polyadenylation signal (pA). This specific transgenic line was derived from the R24-8022 CRF BAC. CRF's and the transgene's transcriptional start sites (+1), CRF's exons (denoted by numbered rectangles outlined in red), and the start codons (ATG) and stop codons (TGA or TAA) for CRF and hrGFP are all indicated. Panel B shows a schematic diagram of a coronal section of the mouse brain at the level where microphotographs were taken. Panel C shows low magnification merge microphotographs of hrGFP and CRF-IR signal within the amygdala of a colchicine-treated CRF-hrGFP transgenic mouse. Panels D-F show high magnification microphotographs of the area marked in panel C. Panel D shows hrGFP-irreducible (IR) in green, panel E shows CRF-IR in red, and panel F shows the merge of both images. White arrows point to dual-labeled cells.

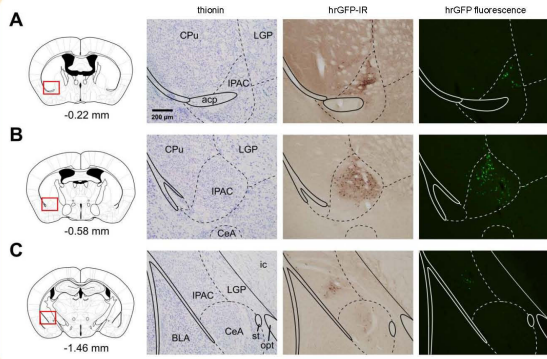


Figure 3. Detailed pattern distribution of hrGFP-positive neurons within the sub-nuclei of the amygdala of CRF-hrGFP mice. These panels depict a set of representative images from the anterior (bregma -0.22, Panel A), medial (bregma -0.58, Panel B), and posterior (bregma -1.46, Panel C) levels of the amygdala containing hrGFP-positive neurons. For each level, a diagram of the corresponding coronal section is shown, with a rectangle indicating the approximate region from where the images were obtained, along with microphotographs of three consecutive 42 μ m slices presented in the following order from left to right: thionin-stained section, anti-hrGFP immunohistochemistry section, and hrGFP fluorescence microscopy section. Every image has an overlay delineating the main histological features present. CRF neurons were observed mainly along the interstitial nucleus of the posterior limb of the anterior commissure (IPAC), with a distribution ranging from the medial part of the central amygdala (CeA) to the posterior limb of the anterior commissure (acp). BLA, basolateral amygdala; CPu, caudate putamen; LGP, lateral globus pallidus; ic, internal commissure; st, stria terminalis; opt, optic tract. The atlas from Paxinos and Franklin, 2001, was used as the primary anatomical reference for bregma coordinates estimation and structure delineation.

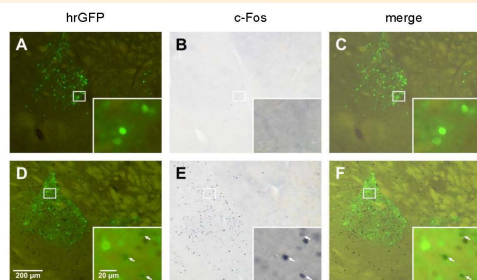


Figure 4. Releasing after fasting protocol activates amygdalar hrGFP-positive neurons in CRF-hrGFP mice. CRF-hrGFP mice were deprived from food for 48 h, and then were either perfused or given access to food for 2 h and then perfused. c-Fos-IHC was performed on coronal sections of their brains, and colocalization for hrGFP and c-Fos was evaluated by fluorescence and bright-field microscopy. Representative images of the amygdalar region of a control (A, B, C) and a refed mice (D, E, F) are shown. In both panels fluorescence of hrGFP (A, D), staining of c-Fos (B, E), and a merge (C, F) of both are shown, along with their corresponding insets at higher magnification. Colocalization of c-Fos and hrGFP is indicated by the white arrows. This protocol proved to be the most efficient at activating CRF neurons within the amygdalar region.

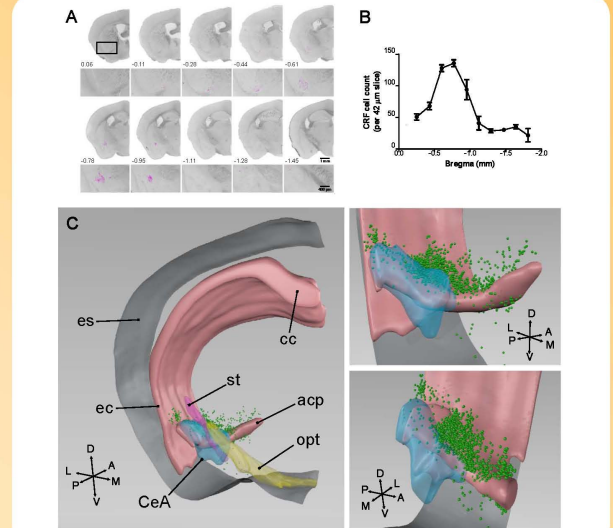


Figure 2. Distribution pattern of hrGFP-positive neurons within the amygdala of CRF-hrGFP mice. Panel A shows a composite of wide-field photographs of every 4th successive 42 μ m brain slices, superimposed with fluorescence microscopy images of the hrGFP signal channel in magenta false coloring. The corresponding bregma coordinates for each slice are indicated. Both sets of images were registered before merging, and then merged using the microscopy set as the primary reference. The array of images shown also contains a higher magnification inset of each slice. Panel B shows a plot of the hemilateral count of CRF-hrGFP cells per 42 μ m slice determined by immunohistochemistry in the bregma range from -0.25 to -1.81. The values shown are the mean of 4 to 6 measures, presented along with their corresponding SEM. Panel C shows different views of a 3D reconstruction of the amygdalar region, generated from the whole 42 μ m series shown in panel A (30 slices in total). The position of every CRF-hrGFP cell observed by fluorescence microscopy is marked by a green ball, and the main white matter tracts (corpus callosum (cc), external capsule (ec), posterior limb of the anterior commissure (acp), stria terminalis (st), optic tract (opt)), as well as the central amygdala (CeA), are shown as volumes. The external surface of the brain is presented in light gray (es). The left image shows a general view from a posterior position. The top and bottom right images show a close-up view of the amygdalar region from a posterior-medial and an antero-medial position, respectively, with the st and opt omitted for better clarity. In each figure the axes indicate the orientation of the view.

Experimental Condition	Brief protocol	n	c-Fos	c-Fos positive GFP-IR neurons
Control	Mice used as control for the experiments (such as naive mice, mice i.p. treated with vehicle, mice ICV-treated with vehicle, etc.) were pooled and termed the control group, as no c-Fos signal was observed in the hrGFP-IR neurons.	6	-	0±0
LPS	Mice were injected with LPS (25 μ g/kg, i.p.) and perfused 2 h later.	3	+	243±49 ***
Acute social defeat stress	Mice were introduced for 10 minutes in a cage with a dominant aggressive older C57BL/6J mouse was kept. Following this exposure, experimental mice were returned to their home cages and perfused 2 h later. Control mice were introduced for 10 minutes in a clean cage, returned to their home cage and perfused 2 h later.	5	++	303±64 ***
Fasting / refeeding	Mice were fasted by removing their food from the home cages at 9:00 am. After 48 h, mice were given access to food for 2 h and then perfused.	3	++	663±24 ***
Fasting	Mice were fasted by removing their food from the home cages at 9:00 am. After 48 h, mice were perfused.	3	+	59±10
Acute HFD	In the morning of the experimental day, mice were exposed to high fat diet (HFD) ad libitum and perfused after 2 h of food consumption, which was verified to increase compared to mice exposed to regular chow.	5	+	24±24
Intermittent HFD	In the morning, mice were given HFD ad libitum for 2 h during 4 consecutive days. Their HFD intake was recorded and verified to rise. Animals were perfused 2 h post last HFD consumption.	6	+	65±20
HFD ad libitum	Mice were given HFD ad libitum all day for 15 days and perfused afterwards.	3	-	0±0
HFD withdrawal	Mice were given HFD ad libitum all day for 14 days, then fed with regular chow for 24h and perfused afterwards.	3	±	0±0
Conditioned HFD aversion	In the mornings of the first and second day, mice were ad libitum exposed to HFD for 2 h and then injected with LCI (150 mM, 12ml/kg, i.p.) or saline. On the third day, mice were exposed to HFD for 2 h again and perfused afterwards. HFD intake was significantly reduced in the LCI-treated group as compared to the saline-treated group.	6	+	0±0
Acute restraint stress	Mice were restrained in a perforated 50-ml plastic Falcon tube for 30 min, returned to their home cages and perfused 1.5 h later. Control mice were briefly handled, returned to their home cage and perfused 1.5 h later.	3	+	0±0
Forced cold swimming test	Mice were individually placed during 90 s into polystyrene cylinders (height 25 cm, diameter 10 cm) containing 15 cm of water maintained at 0-2 °C. Then, mice were gently dried, returned to their home cages and perfused 2 h later.	3	++	0±0
Ghrelin	Mice were injected ghrelin (2 μ g/mice, ICV), and perfused 2 h later.	2	+	10±2
MC4R agonist	Mice were injected a melanocortin-4 receptor (MC4R) specific agonist, RO 27-3225 (4 μ g/mice, ICV) and perfused 2 h later.	4	++	0±0

Table 1. Specific experimental conditions activate amygdalar CRF-hrGFP. Several protocols known to activate neurons in the amygdalar region, listed in this table, were performed in CRF-hrGFP mice, and evaluated using c-Fos as a marker for neuronal activation. IHC staining of c-Fos positive nuclei was performed on coronal brain sections of each experimental mice, and colocalization for hrGFP and c-Fos was evaluated by fluorescence and bright-field microscopy. Of all the tested conditions only three (fasting/refeeding, social defeat and i.p. LPS) significantly induced c-Fos in amygdalar CRF neurons, while the rest failed to do so. For each condition, a brief description of the followed experimental protocol is included, along with the number of experimental animals used, a qualitative estimate of c-Fos-IR in the amygdala (++, high density; +, moderate density; ±, inconsistent) and the total number of hrGFP-IR neurons with nuclei positive for c-Fos in the amygdala (colocalized stain, expressed as mean and SEM). ***, p<0.001 compared to control.

CONCLUSIONS

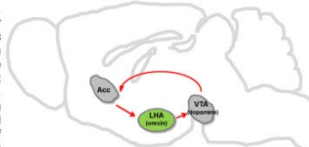
- This transgenic CRF-hrGFP line proved to be an excellent tool for the comprehensive characterization of the precise anatomical distribution of CRF neurons within the mouse amygdaloid complex. These cells were shown to be mainly distributed within the IPAC, with only a small fraction populating the CeA.
- Thus far, our results suggest that amygdalar CRF neurons would be involved in responses associated with the fasting/refeeding paradigm, social defeat stress and LPS-induced stress. Further work in this direction is needed to elucidate their precise role under each of these specific conditions.
- In summary, this novel CRF-hrGFP line was shown to be a promising tool to dissect the role of this particular neuronal subset of the amygdala.

Acknowledgements: This work was supported by grants of the National Agency of Scientific and Technological Promotion of Argentina (PICT2010-1954 and PICT2011-2142) and the NIH (R03TW006925-01A1).

Spring Valdivia^{1,2}, María P. Cornejo¹, Pablo N. De Francesco¹, Guadalupe García Romero¹, Mirta Reynaldo^{1,2}, Mario Perelló¹.
¹Laboratory of Neurophysiology of the Multidisciplinary Institute of Cell Biology (CONICET/CICPBA), La Plata, Buenos Aires, Argentina, 1900.

INTRODUCTION

Binge eating is characterized by the consumption of large amounts of food in a discrete period of time, while feeling a sense of loss of control over eating. The etiology of the human binge eating is currently unknown. *Ad lib* fed rodents exposed to a palatable food display events of hyperphagia, which gradually escalates over the initial accesses until it finally stabilizes. Intake escalation has been proposed to mediate the transition from a controlled to a compulsive behavior. Binge eating intake in animals with intermittent access to palatable foods involves neuronal circuits regulating hedonic eating. These neuronal circuits include the dopaminergic pathways emanating from the ventral tegmental area (VTA), which project to the nucleus accumbens (Acc) among other brain areas, and the orexin neurons of the lateral hypothalamic area (LHA), which project to the VTA and are a link between homeostatic and hedonic circuits regulating food intake. The molecular substrates controlling the escalation in high-fat intake in binge eating models has not been studied. Interestingly, ghrelin is recognized as the only circulating peptide hormone known to increase food intake, and several evidences show that ghrelin plays a key role as regulator of hedonic eating. However, a potential role of ghrelin signaling on binge eating models induced by intermittent access to palatable foods has not been tested.



Proposed circuitries involved in HFD reward processing

Here, we used mice to determine the neuronal brain centers activated in a binge eating model induced by intermittent access to high fat diet (HFD). We also examined the potential role of ghrelin signaling in the modulation of this behavior.

RESULTS

1) Intermittent and limited access to HFD induces events of hyperphagia with an escalating profile

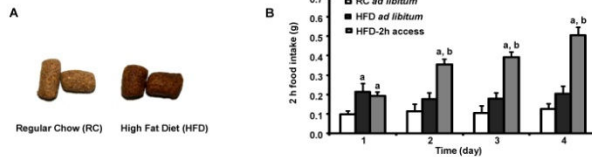


Figure 1. Panel A shows images of RC and HFD pellets used in the current study. Panel B shows 2 h food intake in mice with access to RC *ad lib*, HFD *ad lib* or intermittent access to HFD. Values are the mean±SEM. a, p<0.05 vs. RC *ad lib* group at the same day, b, p<0.05 vs. same group at day 1.

2) Intermittent and limited access to HFD activates the mesolimbic pathway

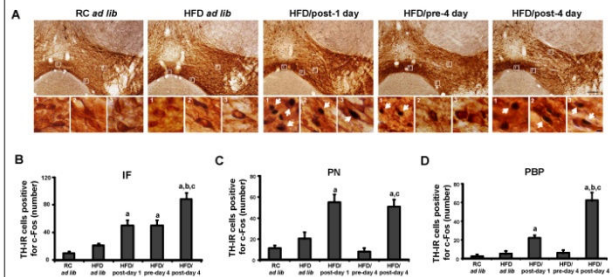


Figure 2. Intermittent and limited access to HFD differentially induces c-Fos in dopaminergic neurons of VTA sub-regions. RC *ad lib* or HFD *ad lib* groups were sacrificed 2 h after food intake on day 4 while mice of the intermittent HFD access group were sacrificed: 2 h after HFD on day 1 (HFD/post-day 1), right before HFD on day 4 (HFD/pre-day 4) or 2 h after HFD on day 4 (HFD/post-day 4). Panel A shows low and high magnification photo-micrographs of brain sections containing the VTA and subjected to double immuno-histochemistry using anti-tyrosine hydroxylase (TH, brown staining) and anti-c-Fos (black staining) antibodies in all experimental groups. For each group, upper panel shows low magnification images and bottom panels show high magnification images of the areas marked in low magnification images. High magnification images show the interfascicular nucleus (IF, insert 1), the paragnal nucleus (PN, insert 2) and parabrachial pigmented area (PBP, insert 3) sub-regions of the VTA. Arrows point to dual-labeled cells. Scale bars, 200 µm (low magnification), 20 µm (high magnification). Panels B-D show quantitative analysis of the total number of TH-immunoreactive (IR) cells positive for c-Fos staining in the IF (B), PN (C) and PBP (D) for each group. Values are the mean±SEM. a, p<0.05 vs. RC *ad lib* group, b, p<0.05 vs. HFD/post-day 1 group, c, p<0.05 vs. HFD/pre-day 4 group.

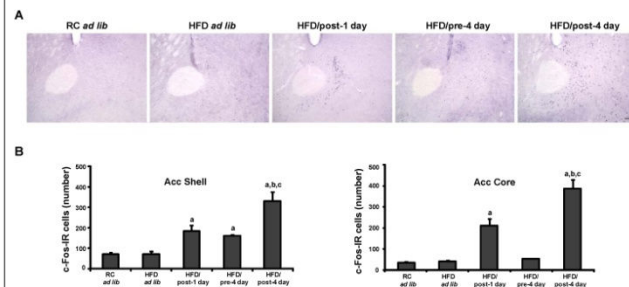


Figure 3. Intermittent and limited access to HFD differentially induces c-Fos in the shell and core sub-regions of the Acc. Panel A shows photomicrographs of the Acc region in coronal brain sections subjected to c-Fos (black staining) immuno-staining of all experimental groups. Scale bar: 100 µm. Panel B shows quantitative analysis of the total number of c-Fos-IR neurons in the shell (right) and core (left) sub-regions of the Acc of all experimental groups. Values are the mean±SEM. a, p<0.05 vs. RC *ad lib* group, b, p<0.05 vs. HFD/post-day 1 group, c, p<0.05 vs. HFD/pre-day 4 group.

3) Intermittent and limited access to HFD activates c-Fos expression in orexin-IR and non orexin-IR neurons of the LHA

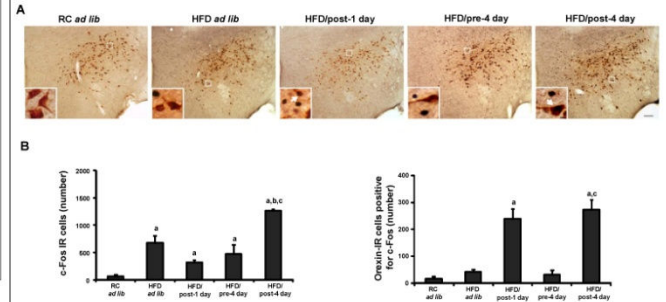


Figure 4. Panel A shows photomicrographs of brain sections subjected to double immuno-histochemistry using anti-orexin (brown staining) and anti-c-Fos (black staining) antibodies in samples from all experimental groups. Insets show the areas marked in low magnification images at higher magnification. Arrows point to dual-labeled cells. Scale bars, 200 µm (low magnification), 20 µm (high magnification). Panel B shows quantitative analysis of the total number of c-Fos-IR neurons (right) and the total number of orexin-IR cells positive for c-Fos (left) in the LHA of all the experimental groups. Values are the mean±SEM. a, p<0.05 vs. RC *ad lib* group, b, p<0.05 vs. HFD/post-day 1 group, c, p<0.05 vs. HFD/pre-day 4 group.

4) Ghrelin signaling is required for the escalation in HFD intake and full c-Fos induction in the mesolimbic pathway during repeated events of hyperphagia

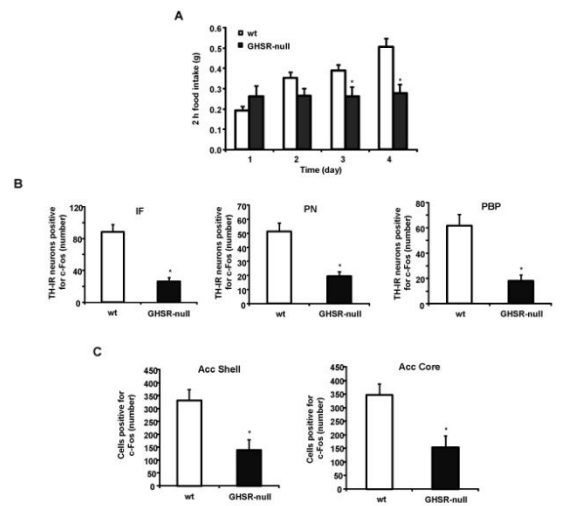


Figure 5. Panel A shows daily 2 h food intake in wild type (wt) and GHSR-null mice with intermittent access to HFD for 4 days. Panel B shows quantitative analysis of the total number of TH-IR cells positive for c-Fos in the IF (left), PN (middle) and PBP (right) sub-regions of the VTA of wt and GHSR-null mice with intermittent access to HFD for 4 days and perfused 2 h after last HFD consumption event. Panel C shows quantitative analysis of the total number of c-Fos-IR neurons in the shell (right) and core (left) sub-regions of the Acc of wt and GHSR-null mice with intermittent access to HFD for 4 days and perfused 2 h after last HFD consumption event. Values are the mean±SEM. a, p<0.05 vs. wt mice in the same experimental condition.

CONCLUSIONS

- Intermittent and limited access to HFD induced acute events of hyperphagia with an escalating profile.
- Repeated events of hyperphagia induce different patterns of c-Fos expression in VTA and Acc.
- Orexin-IR cells of LHA are activated by intermittent and limited access to HFD.
- Ghrelin signaling is necessary for the escalation in HFD intake during repeated events of hyperphagia.

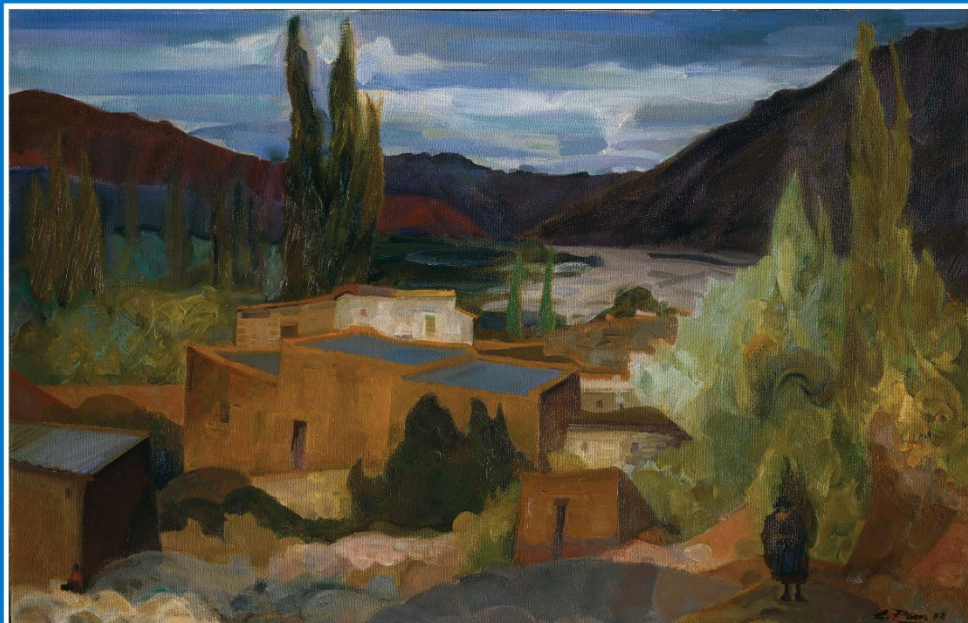
Thus, intermittent and limited access to HFD activates the mesolimbic dopamine system and ghrelin signaling is required for the escalation in HFD consumption

Acknowledgements

This study was supported by PICT2011-2142 and PICT2013-0065 grants. SV and MR were supported by the Commission of Scientific Investigations of the Province of Buenos Aires.

medicina

BUENOS AIRES VOL. 74 Supl. III - 2014



medicina

BUENOS AIRES, VOL. 74 Supl. III - 2014

COMITÉ DE REDACCIÓN

Héctor O. Alonso
Pablo J. Azurmendi
Juan Antonio Barcat
Damasia Becú Villalobos
María Marta E. Bracco
Eduardo L. De Vito
Guillermo Jaim Etcheverry
Isabel N. Kantor
Basilio A. Kotsias
Daniel A. Manigot
Jorge A. Manni
Rodolfo S. Martin
Guillermo D. Mazzolini
Isabel N. P. Miceli
Christiane Dosne Pasqualini
Rodolfo C. Puche
Viviana Ritacco
Guillermo B. Semeniuk

La tapa (ver p VIII)
El río Grande en Tilcara, 1982
Eolo Pons

ISSN 0025-7680 (IMPRESA)
ISSN 1669-9106 (EN LÍNEA)

LIX ANNUAL MEETING
Argentine Society for Clinical Investigation

LXII ANNUAL MEETING
Argentine Society for Immunology

November 19-22, 2014
13 de Julio Hotel – Mar del Plata

9	Program Summary
18	SAIC Presidential Address
20	SAI Presidential Address
22	Conferences, Symposia and Awards
93	Abstracts
301	Author Index

SAIC

Presidente

Héctor M. Targovnik

Vicepresidente

Juan Carlos Caivo

Secretaria

María Cecilia Carreras

Tesorero

Guillermo J. Juvenal

Prosecretaria

Carolina Mondillo

Vocales

María Sonia Baquedano

Liliana Bianciotti

Marianela Candolfi

Cristina E. Carnovale

Javier Cotignola

Alberto Crottogni

Alejandro C. Curino

Cora B. Cymeryng

Carlos Laino

Irene Larripa

Paola Lev

María Fernanda Riera

Eduardo Sandes



19 al 22 de Noviembre . MAR DEL PLATA

saic · sai

LIX Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC)
LXII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología (SAI)

LIX Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC)

El JURADO Coordinado por la Dra. Marianela Candolfi e integrado por los Dres. Alberto J. Ramos, Andrea de Laurentis y Daniel A. Pisera ha otorgado el **SEGUNDO PREMIO POSTER ÁREA NEUROCIENCIAS** al trabajo:

GHRELINA ACTIVA LAS NEURONAS CRF DEL NÚCLEO PARAVENTRICULAR HIPOTALÁMICO A TRAVÉS DE UN CIRCUITO LOCAL QUE INVOLUCRARÍA LA INHIBICIÓN DEL TONO GABAÉRGICO LOCAL.

Cabral, Agustina; Castrogiovanni, Daniel; Frassa, María Victoria; Reynaldo, Mirta; Portiansky, Enrique; Perelló, Mario

Dr. Héctor M. Targovnik
Presidente SAIC

Dra. María Cecilia Carreras
Secretaria SAIC

DIPLOMA

NEUROCIENCIAS 2

272. (227) EFECTOS DIFERENCIALES ENTRE LA PROGESTERONA Y UN PROGESTÍNICO SINTÉTICO SOBRE LA NEUROINFLAMACIÓN EN EL RATÓN WOBBLER, MODELO DE ENFERMEDAD DE MOTONEURONA

Gargiulo-Monachelli, Gisella M^{1,2}; Meyer, María¹; Garay, Laura^{1,4}; Lima, Analía¹; Roig, Paulina¹; De Nicola, Alejandro Federico^{1,4}; González Deniselle, María Claudia^{1,3}
Laboratorio de Bioquímica Neuroendocrina, Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET¹ Servicio de Neurología, Hospital General de Agudos Dr. J.A. Fernández² Depto. de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires³ Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires⁴

Progesterona (PROG) y el progestínico sintético noretindrona (NOR) atenuaron la patología neuronal e incrementaron la oligodendroglia CC1+ en la médula cervical (MC) del ratón Wobbler (WR). Sin embargo, NOR redujo marcadamente la astrogliosis GFAP+ y empeoró la atrofia muscular en WR a diferencia de PROG que mejoró la atrofia muscular y disminuyó levemente GFAP. Objetivo: Estudiar efectos de PROG y NOR sobre mediadores inflamatorios en MC de WR. Grupos experimentales: control (CTL), WR, WR+PROG (pellet de 20 mg s.c.) y WR+NOR (pellet 1mg s.c.) x 18 días. Se cuantificaron número y morfología de células Iba1+área x inmunofluorescencia. Se determinó el ARNm para CD11b, marcador de microglía, el factor de necrosis tumoral alfa (TNFalfa), el receptor tipo Toll TLR4, NFkB y su inhibidor IκB. Análisis estadístico: Chi-cuadrado o ANOVA/ Newman-Keuls. Demostramos microgliosis Iba1+ en WR vs CTL que disminuyó en WR+PROG y WR+NOR (media ± SEM células+/mm²: CTL: 37,34±5,5, p<0,001; WR+PROG: 57,67±4,9, p<0,001; WR+NOR: 62,22±5,9, p<0,01 vs WR: 111,23±16,7). El 100% de células Iba1+ en WR mostró ≥2 prolongaciones, los CTL ≥2 prolongaciones: 87,5% y <2: 12,5%; WR+PROG: distribución similar a CTL, mientras que WR+NOR: 75% con <2 prolongaciones (p<0,0001). El ARNm para CD11b, TNFalfa, TLR4 y NFkB aumentó en WR vs CTL (p<0,05), mientras para IκB disminuyó (p<0,001 vs CTL). PROG redujo el ARNm para CD11b, TLR4 y NFkB en WR (p<0,05, p<0,01, p<0,05 vs WR) y aumentó IκB (p<0,001). NOR sólo moduló NFkB e IκB en menor grado que PROG (p<0,05 vs WR). La reducción en el número de prolongaciones microgliales con NOR podría asociarse a un fenotipo microglial reactivo o fagocítico, ya que no tuvo efecto sobre algunos de los mediadores inflamatorios estudiados. Los efectos neuroprotectores diferenciales de PROG en WR podrían depender, en parte, a su metabolización a derivados reducidos, a los cuales no se metaboliza NOR (dihidroprogesterona y tetrahidroprogesterona).

273. (231) MODULACIÓN DEL PROCESO APOPTÓTICO GLANDULAR POR ANTICUERPOS ANTI-M3 SÉRICOS DE PACIENTES CON SÍNDROME DE SJÖGREN

Reina, Silvia; Enri Borda
Cátedra de Farmacología, Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires

El Síndrome de Sjögren (SS) es un trastorno autoinmunitario crónico que se caracteriza por una infiltración linfoplasmocitaria de las glándulas exócrinas con destrucción epitelial, provocando un síndrome seco definido por sequedad oral (xerostomía) y ocular (xerofalmía). Existen dos formas clínico-patológicas de SS: Síndrome de Sjögren primario (SSp) y una forma asociada (SSa) a otras enfermedades del tejido conectivo. En el suero de los pacientes con SSp está presente un autoanticuerpo anti-receptor mAChR M₃ (media ± ETM: SSp: 0,751±0,01; control: 0,125±0,01). La activación de la cascada de la vía intrínseca de la apoptosis, con la participación de la caspasa-9 (densidad óptica (DO)/mg prot.: basal: 0,14±0,01; SSp: 0,27±0,02; pilocarpina: 0,023±0,02; n=6 en cada caso) y caspasa-3 (DO/mg prot.: basal: 0,4±0,01; SSp: 1,2±0,11; pilocarpina: 0,9±0,01; n=6 en cada caso) en la glándula salival aislada de la rata por los autoanticuerpos anti-receptor mAChR M₃ y la pilocarpina con incremento del calcio

intracelular por aumento del flujo del mismo (verapamilo 1x10⁻⁵ M+SSp: 0,15±0,01, n=5), serían los efectores responsables de este fenómeno-apoptótico-receptor dependiente (J104129+SSp: 0,19±0,01, n=5). Por otro lado, el autoanticuerpo anti-receptor mAChR M₃ y la pilocarpina son capaces de provocar una inhibición de la actividad de la superóxido dismutasa (SOD: basal: 2,5 Uml±0,02, SSp: 1,2 Uml±0,01, n=7) y de la catalasa (CAT: basal: 810 μM±50, SSp: 600 μM±45, n=7), mostrando así la presencia de productos reactivos del oxígeno en la acción del autoanticuerpo y de pilocarpina en la glándula submandibular de la rata por activación del mAChR M₃ ya que el J104129 (1x10⁻⁶ M inhibidor específico M₃) bloquea dicha acción. El péptido sintético M₃ (1x10⁻⁵ M) tiene la capacidad de absorber el "efecto muscarínico" del autoanticuerpo anti-receptor mAChR M₃, dando así una muestra de especificidad farmacológica. Con estos hallazgos demostramos un mecanismo plausible donde los receptores colinérgicos del subtipo M₃ presentes en las glándulas salivales de pacientes con SS, dispararían el proceso apoptótico glandular, provocando una disfuncionalidad parasimpática glandular en los pacientes con SS.

274. (235) GHRELINA ACTIVA LAS NEURONAS CRF DEL NÚCLEO PARAVENTRICULAR HIPOTALÁMICO A TRAVÉS DE UN CIRCUITO LOCAL QUE INVOLUCRARÍA LA INHIBICIÓN DEL TONO GABAÉRGICO LOCAL.

Cabral, Agustina¹; Castrogiovanni, Daniel¹; Frassa, María Victoria¹; Reynaldo, Mirta¹; Portiansky, Enrique²; Perelló, Mario¹
Instituto Multidisciplinario de Biología Celular¹ Laboratorio de Análisis de Imágenes, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata²

La ghrelina es una hormona producida por el estómago implicada en el control del apetito y la regulación de diversas funciones neuroendocrinas. Entre estas funciones se destaca el potente rol de ghrelina sobre las neuronas productoras de factor liberador de corticotrofina (CRF) del núcleo paraventricular hipotalámico (NPV) y la consecuente activación del eje hipotálamo-hipofiso-adrenal. El circuito neuronal a través del cual ghrelina activa las neuronas CRF del NPV es actualmente desconocido. Dado que las neuronas CRF del NPV son fuertemente reguladas por el tono GABAérgico, el objetivo de este trabajo fue estudiar la hipótesis que ghrelina activa las neuronas CRF mediante la inhibición del tono GABAérgico local y para ello se utilizaron ratones macho adultos C57BL/6J. Nuestros resultados indicaron que el 88,1±5,7% de los terminales sinápticos presentes en el NPV que expresan el marcador de neuronas GABAérgicas GAD67 unen un análogo fluorescente de ghrelina sugiriendo que el receptor de ghrelina se expresa en dichos terminales. Por otro lado, el pre-tratamiento de los ratones con un agonista selectivo del receptor GABA_A muscimol (500 ng/ratón), administrado directamente en el NPV inhibió significativamente la expresión del marcador de activación neuronal, c-Fos, inducida por ghrelina (0,6 nmol/ratón) en las neuronas CRF. Mediante la evaluación de la secreción basal y estimulada de [3H]GABA en explantes del NPV en ausencia o presencia de ghrelina, pudimos demostrar que la ghrelina inhibe la secreción de GABA inducida por cloruro de potasio (1,11±0,09 vs. 1,35±0,05 veces de estímulo en explantes expuestos o no a ghrelina 100 nM, respectivamente). Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la ghrelina activa las neuronas CRF del NPV mediante la disminución del tono GABAérgico local.

275. (246) EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN SP1 PROMUEVE LA DESREGULACIÓN DE LA DINÁMICA MITOCONDRIAL Y LA MUERTE CELULAR DE NEURONAS MOTORAS PORTADORAS DE LA MUTANTE FAMILIAR SOD1G93A RELACIONADA A LA ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA

Alaimo, Agustina¹; Gorojod, Roxana Mayra¹; Uchitel, Osvaldo Daniel²; Kotler, Mónica Lidia¹
Depto. de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (IQUIBICEN)-CONICET¹ Depto. de Fisiología,

Agustina Cabral¹, Daniel Castrogiovanni¹, M. Victoria Frassa^{1,3}, Mirta Reynaldo^{1,3}, Enrique Porstiansky², Mario Perello¹

¹Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE), CIC³-CONICET, CCT-La Plata, Buenos Aires, Argentina 1900

²Laboratorio de Análisis de Imágenes, Instituto de Patología, Facultad de Cs. Veterinarias Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Buenos Aires, Argentina 1900

INTRODUCCIÓN

- La ghrelina es una hormona derivada del estómago que actúa en el cerebro, vía el receptor de secretagogos de la hormona de crecimiento (GHSR), y cuya acción principal se basa en la regulación de la ingesta de alimentos, el estrés y la homeostasis de la glucosa.

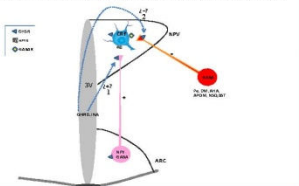
- El eje Hipotálamo-Hipofiso-Adrenal (HHA) es uno de los sitios de acción de ghrelina a nivel central. En respuesta al estrés, las neuronas productoras del factor liberador de corticotrofina (CRF del inglés) del núcleo paraventricular hipotalámico (NPV) se activan y en consecuencia, aumentan los niveles de glucocorticoides en plasma. Estos ejercen un gran número de funciones, entre las que podemos mencionar al aumento en la glucemia y el peso corporal.

- La ghrelina activa el eje HHA tanto en humanos como en roedores. Sin embargo, el mecanismo neuronal por el cual esta activación ocurre es desconocido. En trabajos previos hemos demostrado que las neuronas CRF del NPV no expresan GHSR sugiriendo que el mecanismo por el cual la ghrelina activa estas neuronas es indirecto.

Objetivo del estudio: Determinar el circuito neuronal por el cual ghrelina activa neuronas CRF del NPV en ratones macho.

Por lo tanto, nuestras hipótesis de trabajo son:

- 1- La ghrelina activa a las neuronas CRF a través de las neuronas productoras del neuropeptido Y (NPY) del núcleo arcuato (ARC), que es uno de los núcleos principales mediante el cual ghrelina aumenta la ingesta de alimento.
- 2- La ghrelina activa a las neuronas CRF a través de la inhibición del tono GABAérgico que modula la actividad de dichas neuronas.



RESULTADOS

1) La administración central de ghrelina activa las neuronas CRF del NPV y el eje HHA

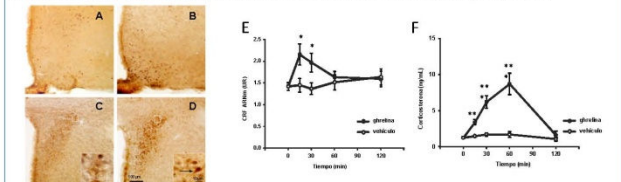


Figura 1. Paneles A-D: Micrografías de secciones de cerebros sometidas a doble inmunohistoquímica (IHQ) usando anti-ghrelina (negro) y anti-CRF (rojo). Los paneles superiores muestran el ARC y los inferiores el NPV. Los gráficos A y C corresponden a ratones tratados con vehículo y B y D a ratones tratados con ghrelina (0.6 nmol/kg). Los insertos muestran a mayor magnificación las áreas marcadas en las imágenes de baja magnificación y la flecha señala células doblemente positivas. En la parte compacta del NPV, el 10.4±1.6% y el 72.2±1.1% de las células CRF fueron positivas para c-fos en animales tratados con vehículo y con ghrelina (p<0.01, respectivamente). Panel E: Valores de RT-qPCR para el ARNm de CRF en micro-disecciones del NPV en animales tratados con vehículo o ghrelina. Los datos indican los niveles de ARNm de CRF en relación con el gen de la ciclofilina A. Panel F: Valores de corticosterona plasmática de ratones tratados con vehículo o ghrelina. Los datos representan la media ±SEM *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

2) La acción del NPY es innecesaria para que ghrelina active a neuronas CRF

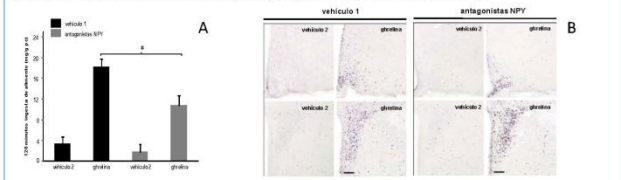


Figura 2. Panel A: Muestra la ingesta de alimento en ratones inyectados centralmente primero con vehículo 1 (DMSO 4% en solución salina) o con una combinación de antagonistas del receptor Y1 e Y5 (BBO3004 y CGP71683, respectivamente, 1 µg de cada uno/ratón) y 30 min más tarde con vehículo 2 (solución salina) conteniendo o no ghrelina (0.6 nmol/kg peso corporal). El bloqueo farmacológico del NPY disminuyó en un 40.5±4.1% la ingesta de alimentos respecto de los tratados con vehículo (**p<0.05). Panel B: Micrografías de secciones de cerebro sometidas a IHQ para c-fos (negro) del ARC (superior) y NPV (inferior). Los ratones fueron tratados como se indica en el panel A y perfundidos 2 h luego de la administración de ghrelina. En el NPV, 39±11 y 197±47 células/sección fueron c-fos positivas en animales tratados con vehículo o ghrelina únicamente y respectivamente (p<0.01). En ratones con bloqueo farmacológico del PVN por acción del NPY, el 52±13 y 15±50 células/sección presentaron positividad para c-fos en los animales tratados con vehículo o ghrelina, respectivamente (p<0.01).

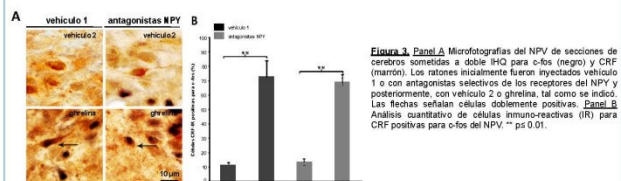


Figura 3. Panel A: Micrografías del NPV de secciones de cerebro sometidas a doble IHQ para c-fos (negro) y CRF (rojo). Los ratones inicialmente fueron inyectados vehículo 1 o con antagonistas selectivos de los receptores del NPY y posteriormente, con vehículo 2 o ghrelina, tal como se indicó. Las flechas señalan células doblemente positivas. Panel B: Análisis cuantitativo de células IR para CRF positivas para c-fos en la parte compacta del NPV. **p<0.01.

3) La inhibición del tono GABAérgico local por ghrelina mediaría la activación de neuronas CRF

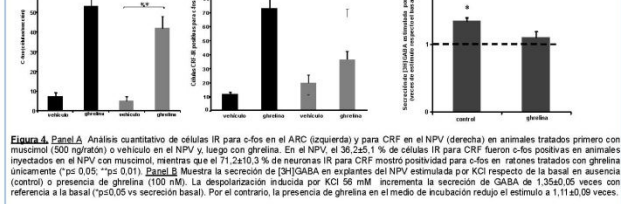


Figura 4. Panel A: Análisis cuantitativo de células IR para c-fos en el ARC (izquierda) y para CRF en el NPV (derecha) en animales tratados primero con muscimol (500 ng/ratón) o vehículo en el NPV y luego con ghrelina. En el NPV, el 30.2±5.1% de células IR para CRF fueron c-fos positivas en animales inyectados en el NPV con muscimol, mientras que el 71.2±10.3% de neuronas IR para CRF mostraron positividad para c-fos en ratones tratados con ghrelina únicamente (**p<0.05, ***p<0.01). Panel B: Muestra la secreción de [3H]GABA en explantes del NPV estimulada por KCl respecto de la basal en ausencia (control) o presencia de ghrelina (100 nM). La despolarización inducida por KCl 50 mM incrementa la secreción de GABA de 1.35±0.05 veces con referencia a la basal (**p<0.05 vs secreción basal). Por el contrario, la presencia de ghrelina en el medio de incubación redujo el estímulo a 1.11±0.09 veces.

4) Ghrelina se une a la terminales GABAérgicas del NPV

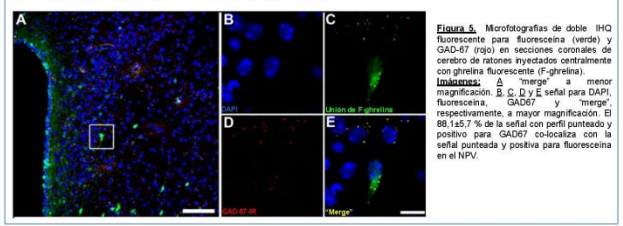


Figura 5. Micrografías de doble IHQ fluorescente para fluoresceína (verde) y GAD67 (rojo) en secciones coronales de cerebro de ratones inyectados centralmente con ghrelina fluorescente (F-ghrelina). **Insertos:** B "merge" a menor magnificación. C, D y E señalan para DAPI, fluoresceína, GAD67 y "merge" respectivamente a mayor magnificación. El 88.1±5.7% de la señal con perfil puntuado y positivo para GAD67 colocaliza con la señal puntuada y positiva para fluoresceína en el NPV.

5) Neuronas GABAérgicas del ARC y la zona periventricular (Pe) mediarían el efecto estimulador de ghrelina sobre neuronas CRF del PVN

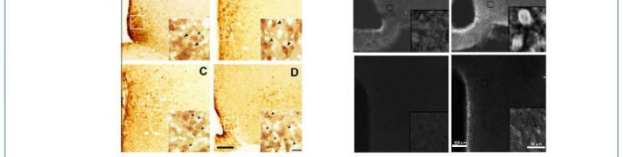


Figura 6. Micrografías de histología de hibridación in situ para GAD67 (gránulos negro de plata) e IHQ cromogénica para fluoresceína (rojo) en secciones superiores de cerebro de ratón inyectados centralmente con F-ghrelina. Paneles A y B muestran el área pre-óptica (APO), zona Pe, núcleo dorsomedial (DM) y ARC, respectivamente. Los insertos representan a mayor magnificación (10 µm) las áreas marcadas en imágenes de baja magnificación (100 µm) y las cabezas de flecha células IR para fluoresceína marcadas con la fibrosa para GAD67.

6) El núcleo ARC es innecesario para que ghrelina active a neuronas CRF

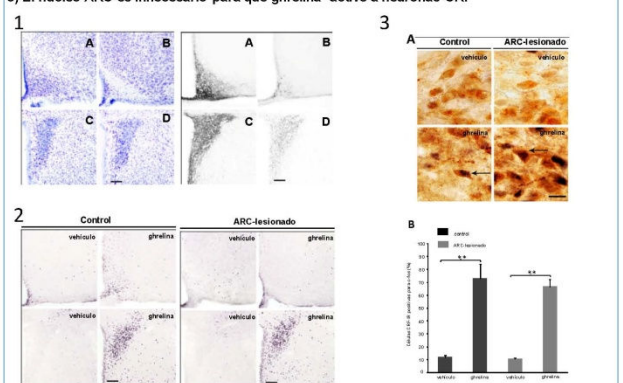


Figura 7. Panel 1: A la izquierda micrografías de secciones de cerebro teñidas con Nissl y a la derecha sometidas a IHQ para NPY (negro), en donde los paneles superiores muestran el ARC y los inferiores el NPV. A y B: micrografías de ratones control y B y C con lesión neurotóxica del ARC. Para generar la lesión del ARC se inyectó por vía subcutánea en el día postnatal (4 día óvula de nacimiento) con 100 µl de glutamato mono sódico a una dosis final de 4 mg/kg de peso (ratones ARC-lesionado) o con vehículo solo (ratones control). Panel 2: Micrografías de secciones de cerebros procesadas por IHQ para c-fos (negro) de ratones control o con el ARC lesionado. Ambos grupos fueron inyectados subcutáneamente con vehículo o con ghrelina (0.6 nmol/kg). Los paneles superiores muestran el ARC y los inferiores el NPV. En el NPV, 34±19 y 190±46 células/sección fueron positivas para c-fos en los animales control tratados con vehículo o ghrelina, respectivamente (p<0.01). La lesión del ARC no afectó el número basal de células positivas para c-fos en la parte compacta del NPV como tampoco en los tratados con ghrelina (20±12 y 115±31 células/sección, respectivamente). Panel 3: A: Micrografías del NPV de secciones de cerebro sometidas a doble IHQ para c-fos (negro) y para CRF (rojo) en ratones control y con el ARC lesionado. Ambos grupos fueron inyectados subcutáneamente con vehículo o con ghrelina. Las flechas señalan las células doblemente positivas. Panel B: Análisis cuantitativo de células IR para CRF positivas para c-fos en la parte compacta del NPV (**p<0.01).

CONCLUSIONES

- La ghrelina activa las neuronas CRF del NPV a través de un circuito neuronal que es independiente del NPY.
- La ghrelina inhibe la secreción de GABA en el NPV y requiere de este efecto para activar a las neuronas CRF.
- La ghrelina activa las neuronas CRF del NPV por medio de un circuito neuronal que es independiente del núcleo ARC.
- Las neuronas GABAérgicas de la zona Pe podrían mediar los efectos de ghrelina sobre las neuronas CRF.



Este trabajo fue financiado por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica de Argentina (PCT2010-0194 y PCT2011-2142) y por la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires.

Neurociencia

preguntas claves y enfoques metodológicos actuales

14 y 15 de agosto de 2014 (8:30-18:00)
Facultad de Ciencias Exactas UNLP

Organizan: Veronica Milesi (IIFP Fac. Cs. Exactas UNLP)
Jesica Raingo (Lab de Electrofisiología IMBICE)



Inscripción:
por e-mail a
veronica@biol.unlp.edu.ar
hasta el viernes 8 de agosto

Disertantes: Verónica Milesi - Jesica Raingo - Sergio Masetto -
Fernando Marengo - Eleonora Katz - Juan Goutman - Joaquín
Piriz - Francisco Urbano - Pedro Martín

PROGRAMA DETALLADO:

Las clases consistirán en la exposición de un tema a cargo de los diversos docentes con abordajes a las diferentes problemáticas actuales. Con anterioridad se brindará, a los alumnos, material de lectura relacionado con el tema de cada exposición el cual se discutirá en forma grupal al final de misma.

JUEVES 14 de Agosto 2014

8:30 a 13 hs – 14:00 a 17:30 hs:

- | | |
|-------------|--|
| 8:30 a 9:30 | Sinapsis introducción y conceptos básicos
Dra. Verónica Milesi - Laboratorio de canales iónicos IIFP – CONICET – Fac. Ciencias Exactas UNLP |
| 9:30 – 11 | The hair cell – calyx junction: three modalities of signal transmission in one synapse?
Dr. Sergio Masetto . Dipartimento di Scienze Fisiologiche-Farmacologiche Cellulari-Molecolari, Sez. di Fisiologia Generale e Biofisica Cellulare, Università di Pavia, Pavia, Italia. |
| 11:30 a 13 | Regulación de la liberación de ACh en la sinapsis eferente olivo coclear del oído interno de los mamíferos.
Dra. Eleonora Katz (INGEBI, CONICET UBA) |
| 14 a 15:30 | Dinámica de Ca ²⁺ durante la transmisión sináptica en células ciliadas del oído interno
Dr. Juan Goutman (INGEBI, CONICET UBA) |
| 16 a 17:30 | La transmisión sináptica en la era de la optogenética
Dr. Joaquín Piriz (Fac. de Medicina UBA) |

VIERNES 15 de Agosto 2014

- | | |
|------------|---|
| 9:30 – 11 | Canales de calcio operados por voltaje como blanco de factores que controlan la neurotransmisión
Dra. Jesica Raingo (IMBICE CONICET CICPBA) |
| 11:30 a 13 | Estudio de las interacciones talamocorticales combinando colorantes fluorescentes voltaje-dependientes con rodajas de cerebro de ratón [®]
Dr. Francisco Urbano (IFIBYNE CONICET UBA) |
| 14 a 15:30 | Acople estímulo-secreción y reciclado vesicular en células cromafines de la glándula Adrenal
Dr. Fernando Marengo (IFIBYNE CONICET UBA) |
| 16 a 17 | Mecanismos clásicos de modulación de la neurotransmisión por fármacos
Dr. Pedro Martín (IIFP CONICET UNLP) |
| 17 a 18 | Evaluación y cierre del curso |



Universidad Nacional de La Plata

Facultad de Ciencias Exactas

El Decano de la Facultad de Ciencias Exactas, certifica que REYNALDO MIRTA ha asistido al Curso de Postgrado "Neurociencia: preguntas claves y enfoques metodológicos actuales" de dieciocho horas de duración, dictado durante el segundo semestre de 2014.

Directores: Dra. Verónica Milesi

La Plata, 20 de Octubre de 2014


Secretaria de Postgrado


Decano de la Facultad

NUEVAS MICROSCOPIAS. MICROSCOPIOS Y SISTEMAS DE REGISTRO Y EVALUACIÓN DE IMÁGENES

Viernes 3 de Octubre de 2014

**Campus Tecnológico CIC de Gonnet
Reunión CIOp-IMBICE**

9.00 – 9.30	"Live imaging" en microscopia invertida confocal y de epifluorescencia LED. Uso y restricciones técnicas.	Microscopía	Alejandra Attorresi IBioBA-CONICET.
9.45 – 10.15	Sistemas microscopicos de iluminación selectiva: "Apoptome y Lighshhet L1"	Microscopía	Roberto Rammdoman CARL ZEISS
10.30 – 10.50		Café, té o refresco	
10.51 – 11.21	Sistemas de microscopia para "live cell imaging"	Microscopía	Alejandro Cicculi NIKON
11.22– 12.00	"Super enhanced image", Imagen mejordada a través de más información de otros medios.	Imágenes	Sebastián Noó Bermúdez IMBICE
12.05 – 12.45		Lunch	
13.00 – 13.30	Análisis de Imágenes: ¿qué medimos en una imagen digitalizada?.	Imágenes	Enrique Portiansky Facultad de Veterinaria UNLP
13.45 – 14.15	Problemáticas y sus soluciones en aplicaciones in vivo de microscopia confocal	Microscopía	Hernan Mendoza Product Specialist Latin America Division OLYMPUS
14.30 – 14.45		Café, té o refresco	
15.00 – 15.30	Microscopia confocal espectral y sus beneficios: Localización intracelular. Eventos biológicos en tiempo y espacio. El auge de la super resolución.	Microscopía	Lucas Villegas LEICA
5.45 – 16.30	Microscopía AFM: aplicaciones a nanopartículas y fractales	Nanotec	Dr. Daniel Schinca Dra. Marcela Fernández van Raap CIOp

Por la presente certifico la Concurrencia y Participación de

REYNALDO MIRTA BEATRIZ

A las Jornadas de Microscopías realizadas el 3 de Octubre de 2014 por CIOp-IMBICE

en el Campus Tecnológico de CIC - Manuel B. Gonnet

Jornada sobre
**NUEVAS MICROSCOPIAS.
MICROSCOPIOS Y SISTEMAS DE REGISTRO
Y EVALUACIÓN DE IMÁGENES.**

Viernes 3 de octubre // 9.00 a 17.00 horas

Máximo 40 participantes

Inscripción libre y voluntaria
Por mail a administracion@ciopimibice.org
Nombre y Apellido:
Lugar de trabajo:
Teléfono:

Salón de Actos del CIC - Campus Tecnológico 130
Carril Centralizado 1302 y 1328 - Manuel B. Gonnet

Victor E. Coria

Instituto Multidisciplinario
de Biología Celular (IMBICE)
La Plata (1900) - Argentina

Por la presente certifico que Lic. Wirtz Reynaldo,
DNI N° 52.533.843, ha desarrollado
actividades en el marco de la XII Semana Nacional de la
Ciencia y la Tecnología, edición 2014.



Dra. Vera Brudny

Coordinadora del Programa Nacional de Popularización de la Ciencia y la Innovación





IMBICE

40
Aniversario

INSTITUTO MULTIDISCIPLINARIO DE BIOLOGÍA CELULAR

Jornadas de celebración - 40 años de actividad

Ceremonia de Apertura 28/11/2014

9:00 hs Autoridades CIC - CONICET - Provincia de Buenos Aires - IMBICE

Programa Científico 28/11/2014

10:30 hs

Simposio Fisiología. Coordinador: Dr. Andrés Giovambattista

Dra. Alejandra Bosco (Dept. Neurobiology & Anatomy, Univ. Utah, USA)
¿Qué hace la microglía durante la neurodegeneración?

Dr. Marcelo Perone (IBIOBA, Bs. As.)
Anuncio de una muerte inesperada: ¿homicidio de la célula β ?

Dr. Ricardo Dewey (IIB-INTECH, Chascomús)
Microambiente de células madre y Medicina Regenerativa

Dra. Jesica Raingo (IMBICE, La Plata)
Nuevos mecanismos de control sináptico en neuronas hipotalámicas

Dr. Andrés Giovambattista (IMBICE, La Plata)
Células progenitoras de adipocitos del tejido adiposo blanco. Inhibirlas o activarlas?



14:30 hs

Simposio Genética. Coordinador: Dra. Graciela Bailliet

Dr. Jorge López Carmelo (CEMIC, Bs. As.)
Epidemiología de las malformaciones congénitas en Sudamérica: ECLAMC, una red colaborativa

Dr. Andrés Zambelli (Centro Investigación en Biotecnología, Advanta Semillas, Balcarce)
Realidades, mitos y expectativas sobre la selección genómica aplicada al mejoramiento genético

Dra. Graciela Bailliet (IMBICE, La Plata)
Acervo genético autóctono en los Argentinos actuales

17: hs Conferencias Trayectoria del IMBICE

Dr. Néstor Bianchi (IMBICE, La Plata)
Dra. Lidia Vidal Rioja (IMBICE, La Plata)

Programa de Divulgación 29/11/2014

COMUNICACIONES ABIERTAS A LA COMUNIDAD

Desde 11 hs

¡ Viva la diversidad !

Dra. Cecilia Catanesi - Lab. Diversidad Genética

Genealogía, ancestría y genética

Dr. Claudio Bravi - Lab. Genética Molecular Poblacional

Comer: un delicado equilibrio entre la necesidad y el placer

Dr. Mario Perelló - Lab. Neurofisiología

Paternidades y otras relaciones familiares ¿ Qué nos dice el ADN ?

Dra. Florencia Di Rocco - Lab. Genética Molecular

Cultivando células como pasiones

Dr. Miguel Reigosa - Sección de Cultivos Celulares

STANDS DE LABORATORIOS Y SERVICIOS

Me duele mucho, poquito, nada

Lab. Diversidad Genética

Precaución ! Neuronas trabajando

Lab. Electrofisiología - Lab. Neurofisiología

Los camélidos de nuestra tierra ¿ Y esos quiénes son ?

Lab. Genética Molecular

Enredo de genes. Mi familia, mi ADN, y yo

Servicio de Identificación Genética

Cultivando células como pasiones

Servicio de Cultivos Celulares

Tejido adiposo : el tamaño es lo que importa

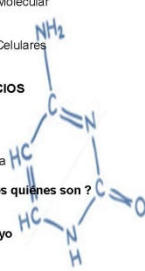
Lab. Neuroendocrinología

Al ritmo de las mutaciones

Lab. Citogenética y Mutagénesis

Historias secretas de nuestros genomas

Lab. Genética Molecular Poblacional



Avenida 7 esq. 49 - La Plata
Honorable Cámara de Senadores de la Provincia de Buenos Aires
Edificio Anexo Vicegobernador Alberto Balestrini (ex-Banco Hipotecario)

