



**INFORME PERIODO.....2011-2012.....**

1. APELLIDO...REYNALDO.....  
Nombre(s)...Mirta.. Beatriz.....  
Título(s)...Lic. 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 de poblaciones neuronales productoras de TRH que se activan en respuesta al frío.....

**4. DIRECTOR**

Apellido y Nombre (s)... PERELLÓ, Mario.....

Cargo Institución..... Investigador Adjunto sin Director del CONICET.....

Dirección: Calle.. Camino Gral Belgrano y 526.....N° ..s/n.....Ciudad...La Plata.....

C.P.:1900. Prov:Buenos Aires.Tel:(0221) 4210112. 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 y 526..... 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.....Nº.....

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

- a) El informe debe contener los títulos y subtítulos completos que se detallan en hojas adjuntas y un índice
- b) **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.**
- c) El informe se deberá presentar impreso en hojas perforadas A-4. En la etiqueta de mismo se consignará el apellido y nombre del Personal de Apoyo y la leyenda «Informe Científico-tecnológico período 2011/2012.
- d) La presentación deberá realizarse en papel y enviar copia del mismo en soporte electrónico al e- mail [personalapoyo@cic.gba.gov.ar](mailto:personalapoyo@cic.gba.gov.ar)
- e) Incluir en la presentación del informe (en sobre cerrado) la opinión del Director.
- f) En caso de solicitar recategorización deberán hacerlo mediante nota aparte firmada por el Director fundamentando la solicitud encuadrada en el artículo 10 de la Ley 13.487

## **INDICE**

<b>INDICE</b> .....	1
<b>7. EXPOSICIÓN SINTÉTICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO</b> ...	2
<b>7.1.- ACTIVIDAD DESARROLLADA</b> .....	2
7.1.1.- Descripción concisa del material estudiado .....	2
7.1.2.- Perfusión - Corte y Preservación: procedimiento general .....	3
7.1.3.- Tinciones: técnicas empleadas.....	3
a) inmunohistoquímica simple o doble .....	3
b) coloración de Nissl.....	4
c) binding .....	4
d) pruebas para disminuir autofluorescencia.....	4
e) pruebas para desenmascarar antígenos.....	4
7.1.4.- Análisis microscópico y fotomicrografías .....	4
7.1.5.- Análisis de imágenes.....	4
7.1.6.- Inclusión en parafina.....	5
<b>8. OTRAS ACTIVIDADES</b> .....	5
<b>8.1.- PUBLICACIONES, COMUNICACIONES, ETC.</b> .....	5
8.1.1.- Publicaciones.....	5
8.1.2.- Congresos.....	5
<b>8.2.- CURSOS DE PERFECCIONAMIENTO, VIAJES DE ESTUDIO, ETC.</b> .....	6
<b>8.3.- ASISTENCIA A REUNIONES CIENTIFICAS/TECNOLOGICAS o EVENTOS SIMILARES</b> .....	6
<b>10. OTROS ELEMENTOS DE JUICIO NO CONTEMPLADOS EN LOS TITULOS ANTERIORES.</b> .....	6
<b>Plate I</b> .....	7
<b>Plate II</b> .....	9
<b>ANEXO SOLUCIONES</b> .....	11
<b>Certificaciones</b> .....	13

## **7. EXPOSICIÓN SINTÉTICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO**

### **7.1.- ACTIVIDAD DESARROLLADA**

En el período comprendido entre Agosto 2011- Agosto 2012, desarrollé en el Laboratorio de Neurofisiología del IMBICE, con dirección del Dr. Mario Perelló, las siguientes tareas: colaboración en perfusiones y extracción de cerebros de animales en experimentación, cortes de cerebros con crióstato, montaje de cortes de cerebros, pruebas para disminuir autofluorescencia y desenmascarar antígenos, binding, tinciones de Nissl e inmunohistoquímicas para c-Fos (marcador de actividad neuronal), TRH (Hormona Liberadora de TSH), TH (Tirosina Hidroxilasa), NPY (Neuropéptido Y), CRF (Factor Liberador de Corticotropina), conteo de expresión de señales en cortes de cerebro para diferentes bregmas, fotomicrografías por captura digital y análisis de imágenes tanto para presentaciones a congresos como para publicaciones. También se llevaron a cabo prácticas de inclusión de cerebros en parafina. Por otra parte y además de integrar la Comisión del Bioterio del Servicio Bioterio del IMBICE, participé de seminarios internos y de la Semana de la Ciencia y la Tecnología.

#### **7.1.1.- Descripción concisa del material estudiado**

Las tareas desarrolladas estuvieron en parte destinadas a aportar datos para entender cómo la ghrelina regula los circuitos neuronales, que controlan diversas respuestas fisiológicas y de comportamiento. Algunas evidencias indican que ghrelina activa neuronas hipofisiotrópicas productoras de CRF del núcleo paraventricular hipotalámico (PVN) y en consecuencia el eje neuroendócrino hipotálamo-hipófiso-adrenal. Sin embargo, los mecanismos neuronales que median esta acción aún se desconocen. Por ello, estudiamos la posibilidad de que la activación de neuronas productoras de CRF, inducida por ghrelina, ocurra por combinación de mecanismos directos e indirectos vía otros núcleos hipotalámicos. Cabe señalar que, recientemente se demostró que ghrelina incrementa la satisfacción que produce la ingesta de dietas ricas en grasas; aunque los circuitos neuronales que median esta acción aún no han sido caracterizados. También, evaluamos la posibilidad de que neuronas productoras de CRF localizadas en el núcleo central de la amígdala (CeA) sean parte del circuito que media este rol de ghrelina sobre la ingesta de alimento basada en el placer. En ambos casos es importante contar con un método confiable y seguro de identificación de neuronas productoras de CRF; pero los anticuerpos generados contra la secuencia de CRF no son óptimos para las inmunotinciones, dado que reconocen únicamente el neuropéptido maduro presente en las terminales neuronales y no en el soma neuronal. Una estrategia para identificar estas neuronas consiste en emplear anticuerpos dirigidos contra proCRF, el precursor peptídico a partir del cual se genera CRF luego de ser post-traduccionalmente procesado. Actualmente, contamos con tres anticuerpos dirigidos contra distintas secuencias de proCRF, que identificarían neuronas CRF del PVN y del CeA. Sin embargo, las condiciones experimentales en las que los mismos pueden usarse no han sido sistemáticamente evaluadas, por lo cual el objetivo de esta etapa consistió en optimizar inmunohistoquímicamente las condiciones para que los anticuerpos anti-proCRF puedan ser utilizados para identificar las neuronas CRF del PVN y del CeA. Finalmente, es necesario mencionar que en todas las evaluaciones se empleó material proveniente de cepas de ratones C57BL6/j 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: procedimiento general**

Los animales en experimentación se sometieron al siguiente procedimiento:

- a) pesaje.
- b) anestesia IP con hidrato de cloral.
- c) perfusión por el ventrículo izquierdo del corazón con solución de lavado (Solución Buffer Fosfato 0,01M – PBS- con heparina) y solución fijadora de formaldehído al 4% (Biopack, Argentina).
- d) decapitación y extracción de cerebros.
- e) 2 horas de post-fijación en formaldehído al 4%.
- f) crio-preservación “overnight” con sacarosa al 20%.
- g) congelación con hielo seco y conservación a -80°C.
- h) cortes coronales y seriados de 25 µm de espesor con crióstato (Minotome American Instrument Exchange Inc., USA).
- i) mantención de cortes en solución criopreservante hasta su uso a -20°C.

Nota: en Anexo soluciones.

### **7.1.3.- Tinciones**

#### **a) inmunohistoquímica simple o doble**

Los cortes seriados de cerebros montados sobre portaobjetos gelatinizados fueron inmunoteñidos como se detalla a continuación:

- 1) 3 lavados en agitación de 10 min cada uno con PBS 0,01M (Solución Buffer Fosfato).
- 2) incubación en agitación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,5% (ratón) ó al 0,3% (rata) durante 30 min.
- 3) repetición del paso 1.
- 4) permeabilización en agitación con Dodesyl Sulfato de Sodio -SDS- (Sigma) por 15 min. *Este punto solo se realiza con muestras de rata.*
- 5) bloqueo en agitación durante 60 min con Suero Normal de Burro –NDS- (Equitech-Bio Inc, USA) en Buffer de Fosfatos Tritón –PBT-.
- 6) incubación con anticuerpo primario anti-c-Fos (Calbiochem PC38, USA) y/o TRH y NPY (generados por Dr. Eduardo Nillni de Universidad de Brown, USA) o CRF (generado por Dra. Castro, Universidad de Michigan, USA) o TH (Sigma T2928) por 24-48 horas a temperatura ambiente ó 4°C, según corresponda.
- 7) repetición del paso 1.
- 8) incubación en agitación a temperatura ambiente con anticuerpo secundario anti-rabbit 1:1000 (Jackson Lab, USA) por 60 min.
- 9) repetición del paso 1.
- 10) incubación en agitación con solución peroxidasa biotinilada-avidina (ABC, Vector Kit PK-6200, USA) durante 60 min a temperatura ambiente.
- 11) repetición del paso 1.
- 12) revelado en agitación con DAB (3,3'-diaminobenzidine, Vector, SK-4100, USA) con o sin cloruro de níquel (Biopack, Argentina) durante 7-10 min.
- 13) repetición del paso 1.
- 14) deshidratación en alcoholes 70°, 96° (Biopack, Argentina) y 99,5° (Biopack, Argentina) por 2 min en cada uno.
- 15) aclaración con xilol (Biopack, Argentina) durante 30 min.
- 16) montaje con Bálsamo de Canadá (Biopack, Argentina) o anti-fading con o sin Höechst, según tipo de muestra.

Nota: en Anexo soluciones.

#### **b) coloración de Nissl**

- 1) 1 min en H<sub>2</sub>O destilada
- 2) 20 min en Solución de Tionina (Certistain®, Merck)
- 3) 1 min en H<sub>2</sub>O destilada
- 4) 2 pasajes de 1 min cada uno en alcohol 96°
- 5) 2 pasajes de 1 min cada uno en alcohol 100°
- 6) 5 min en xilol
- 7) montaje de la muestra con Bálsamo de Canadá

Nota: en Anexo soluciones.

#### **c) binding**

- 1) incubar los cortes montados sobre portaobjetos en estufa a 37°C por 30 min
- 2) 3 lavados en agitación de 10 min cada uno con PBS 0,01M
- 3) incubar el anticuerpo fluorescente durante 1 hora a 37°C en cámara húmeda
- 4) incubar con formaldehído al 4% por 30 min a temperatura ambiente
- 5) 6 lavados en agitación de 10 min cada uno con PBS 0,01M
- 6) dejar secar en oscuridad
- 7) montar con anti-fading Hóechst

Nota: en Anexo soluciones.

#### **d) pruebas para disminuir autofluorescencia**

Para bajar la autofluorescencia se realizaron ensayos con SO<sub>4</sub>Cu

- 1) lavado con PBS 0,01M por 5 min
- 2) lavado con etanol 70° durante 5 min
- 3) lavado con SO<sub>4</sub>Cu por 5 min
- 4) 3 lavados en etanol 70° durante 1 min
- 5) secado en oscuridad y montaje con anti-fading Hóechst

#### **e) pruebas para desenmascarar antígenos**

- 1) 3 lavados en agitación de 10 min cada uno con PBS 0,01M
- 2) permeabilización con Buffer Tris-HCl pH 5,5 (cedido por el laboratorio de Neuroendocrinología del IMBICE) a baño María a 95°C por 10 min o con SDS 0,03% durante 15 min
- 3) 3 lavados en agitación de 10 min cada uno con PBS 0,01M
- 4) incubación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,5% por 30 min
- 5) 3 lavados en agitación de 10 min cada uno con PBS 0,01M
- 6) incubación con solución bloqueante
- 7) incubación con anticuerpo primario CRF 1:1500
- 8) continuación de la técnica de inmunohistoquímica tal como se describió en el punto 7.1.3.- a)

#### **7.1.4.- Análisis microscópico y fotomicrografías**

Todo el material ensayado fue observado con microscopio Nikon (Nikon Corporation, Japan), lentes múltiples neofluar-PH y óptica de campo claro. Por su parte, las fotomicrografías se captaron con cámara Nikon Digital Sight D5-U3 y software NIS-Elements, Versión 3.22. En la **Plate I** y **Plate II** se muestran fotomicrografías de la activación de neuronas productoras de CRF, empleando tinciones inmunohistoquímicas, en muestras con y sin colchicina tanto en el PVN como en el CeA en diferentes bregmas.

#### **7.1.5.- Análisis de imágenes**

Las imágenes obtenidas se analizaron con los software's Adobe Photoshop CS2 9.0.2, Focus Magic 3.02 y/o Noiseware Professional 4.1.1 y las mediciones celulares y nucleares con los software's Image-Pro Plus 6.0 e ImageJ versión 1.44p.

### **7.1.6.- Inclusión en parafina**

- 1) cerebro perfundido solo con solución de lavado se fijó en formol por 1 hora
- 2) mantención en alcohol 70° por 24 horas a 4°C
- 3) 2 pasajes en alcohol 96° por 1 hora 45 min
- 4) 2 pasajes en alcohol 100° por 1 hora 45 min
- 5) pasaje en xilol por 40 min
- 6) pasaje en xilol "overnight"
- 7) inclusión en parafina (Histoplast, Biopack Argentina) "overnight" a 54°C
- 8) 2 baños en parafina por 2-4 horas cada uno
- 9) completada la impregnación se retiró la muestra, se volcó en molde, cuidando que el cerebro quede ubicado en el medio del bloque y de manera tal que permitiera su posterior corte en sentido antero-posterior.
- 10) tallado y adhesión del bloque de parafina a un taco de madera
- 11) antes de proceder al corte del cerebro en láminas, con micrótopo manual MANOT (American Optical), se consideró el ángulo de corte y temperatura ambiente al momento del corte, entre otros aspectos.
- 12) láminas seriadas de 4-5µ de espesor fueron recogidas con pinceles, extendidas en agua tibia, levantadas con portaobjetos y mantenidas overnight" a 60-70°C en estufa (Reichert-Jung) hasta su total secado y adhesión.

Nota: esta es una primer práctica por lo cual resta aún su puesta a punto.

## **8. - OTRAS ACTIVIDADES**

### **8.1.- PUBLICACIONES, COMUNICACIONES, ETC.**

#### **8.1.1.- Publicaciones**

##### **Año 2012**

- Short-term cold exposure activates TRH neurons exclusively in the hypothalamic paraventricular nucleus and raphe pallidus. Agustina Cabral, Spring Valdivia, Mirta Reynaldo, Nicole E. Cyrb, Eduardo A. Nillni and Mario Perelló. Neuroscience Letters 518 (June 2012) 86– 91. ISSN 0304-3940. Se adjunta copia.

- Ghrelin Indirectly Activates Hypophysiotropic CRF Neurons in Rodents. Agustina Cabral, Olga Suescun, Jeffrey M. Zigman and Mario Perelló. PLoS ONE | www.plosone.org. February 2012 | Volume 7 | Issue 2 | e31462. En agradecimientos por colaboración técnica. Se adjunta copia.

#### **8.1.2.- Comunicaciones en congresos**

##### **Año 2011**

- Ghrelin indirectly activates hypophysiotropic CRF neurons. Agustina Cabral, Spring Valdivia, Anabela Patrone, Mirta Reynaldo, Olga Suescun, Jeffrey M Zigman and Mario Perelló. XXVI Congreso Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Neurociencia (SAN). Huerta Grande, Córdoba, 18-22 Octubre. Se adjunta resumen y póster.

- Cold exposure activates Thyrotropin Releasing Hormone (TRH)-producing neurons in specific brain nuclei. Spring Valdivia, Agustina Cabral, Mirta Reynaldo, Silvia Gordon, Yamila Quiroga, Eduardo Nillni and Mario Perelló. XXVI Congreso Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Neurociencia (SAN). Huerta Grande, Córdoba, 18-22 Octubre. Se adjunta resumen y póster.

- Study of the interaction between ghrelin and high fat diet-induced acute food intake in mice. Spring Valdivia, Agustina Cabral, Anabela Patrone, Mirta Reynaldo and Mario Perelló. XXVI Congreso Anual de la Sociedad Argentina

de Investigación en Neurociencia (SAN). Huerta Grande, Córdoba, 18-22 Octubre. Se adjunta resumen y póster.

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

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

### **Año 2012**

- "Fronteras en BioCiencias" Simposio Conjunto de la Sociedad Max Planck y el Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva Polo Científico Buenos Aires – Argentina. 22 a 25 abril 2012. Se concurreó solo el día 23. Se adjunta programa.

- Dictado de Seminario interno "Herramientas digitales para el procesamiento de imágenes"

- *Seminarios*. Organizados por IMBICE. Se adjunta cronogramas.

- Participación en la X Semana de la Ciencia y la Tecnología del 6 al 18 de Junio.

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

### **10.1.- Co-Dirección de Tesina**

#### **Año 2010 - 2012**

Co-Director y Tutor de Tesina de Ezequiel Oviedo para acceder al grado de Licenciado en Biotecnología y Biología Molecular de Facultad de Ciencias Exactas, UNLP (Título y Plan adjuntado en segunda sección del Informe de Tareas).

### **10. 2.- Tareas de Apoyo a Técnicos y Becarios**

- Explicación a usuarios de microscopios de diferentes laboratorios del IMBICE sobre manejo del software NIS-Elements para captura de fotomicrografías.

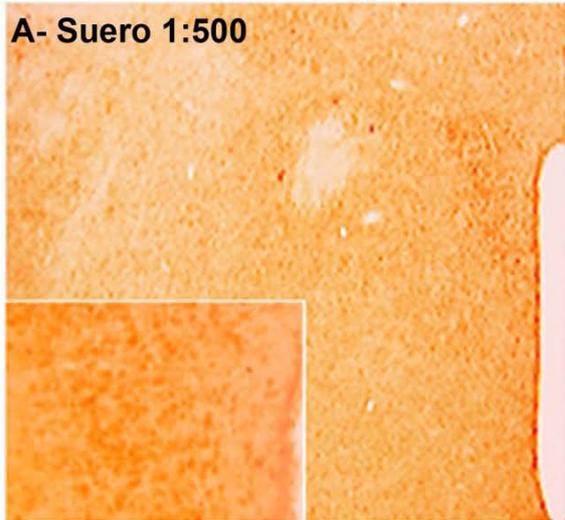
- Tareas de apoyo en análisis de imágenes e inmunohistoquímica a las becarias Agustina Cabral y Spring Valdivia.

- Preparación de soluciones empleadas en los diferentes ensayos

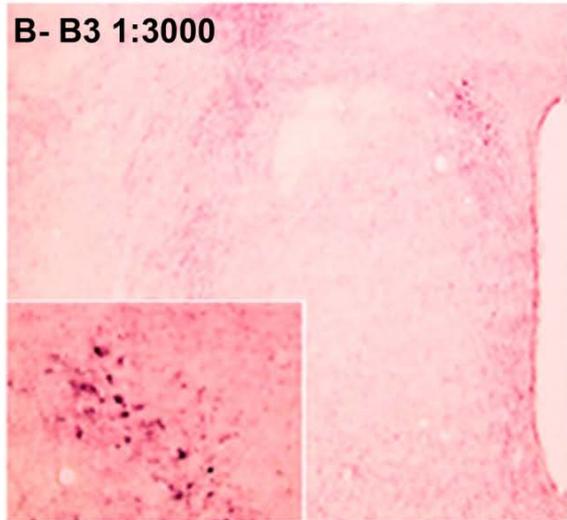
## PLATE I

**Resultados de inmunoreactividad contra CRF observada en el PVN utilizando diferentes anticuerpos contra este neuropéptido.** Los ratones fueron anestesiados y perfundidos con formaldehído (4%), 2 horas después del tratamiento. A los cerebros disecados, congelados y cortados en secciones coronales de 25  $\mu\text{m}$  con crióstato se les realizó una IHQ con anticuerpos hechos contra CRF. Cada panel muestra, en baja (10x) y alta (60x) magnificación, el resultado obtenido para cada anticuerpo en animales control (**A-D**) o pre-tratados centralmente con colchicina (**E-F**) y la dilución ensayada. Los anticuerpos empleados fueron: 1) Suero de conejo anti-CRF que reconoce la secuencia del neuropéptido maduro (**A** y **E**). 2) Suero de conejo anti-proCRF denominado B3, que reconoce la secuencia central del precursor de CRF (**B** y **F**). 3) Suero de conejo anti-proCRF denominado MP235, que reconoce la secuencia amino terminal del precursor de CRF, incluyendo CRF maduro (**C**) y 4) Suero de cabra anti-proCRF de origen comercial (Santa Cruz) que reconoce la secuencia del neuropéptido maduro (**D**). La inmunoreactividad positiva contra CRF se visualiza como un precipitado marrón debido al tratamiento de las muestras con anticuerpo secundario biotinilado, seguido por incubación con el complejo ABC y finalmente, por el sustrato DAB.

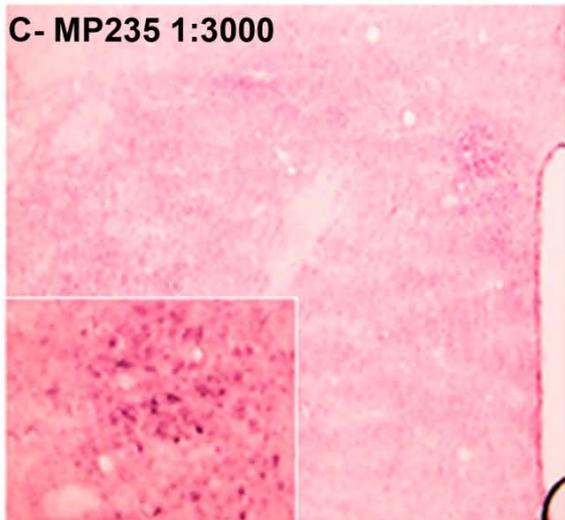
**A- Suero 1:500**



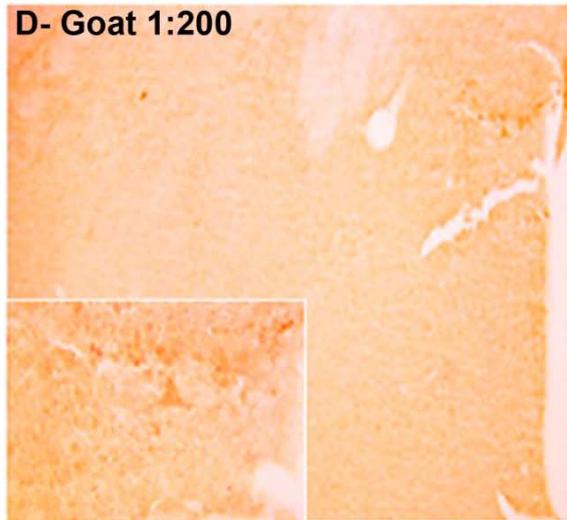
**B- B3 1:3000**



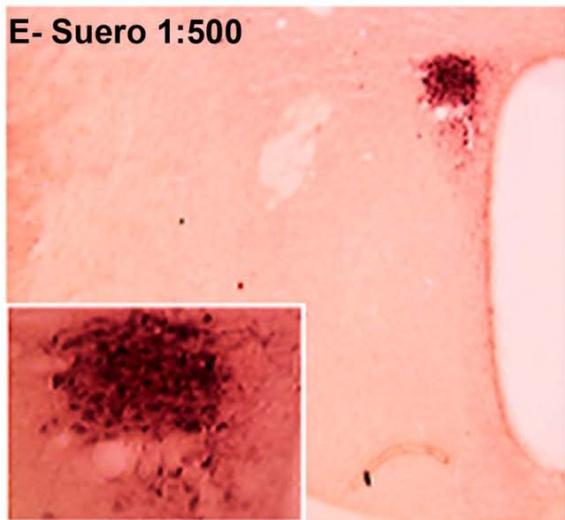
**C- MP235 1:3000**



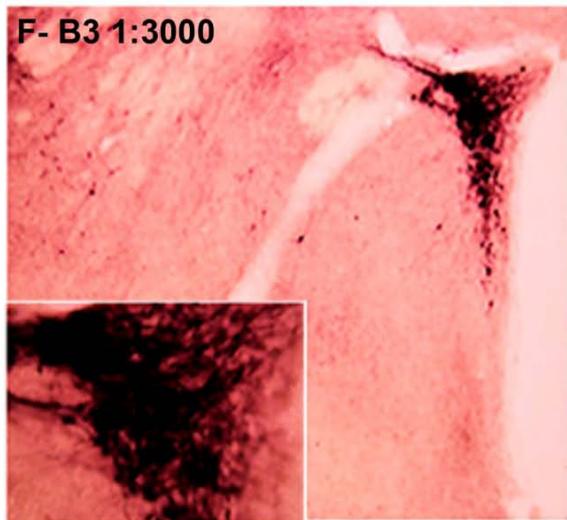
**D- Goat 1:200**



**E- Suero 1:500**

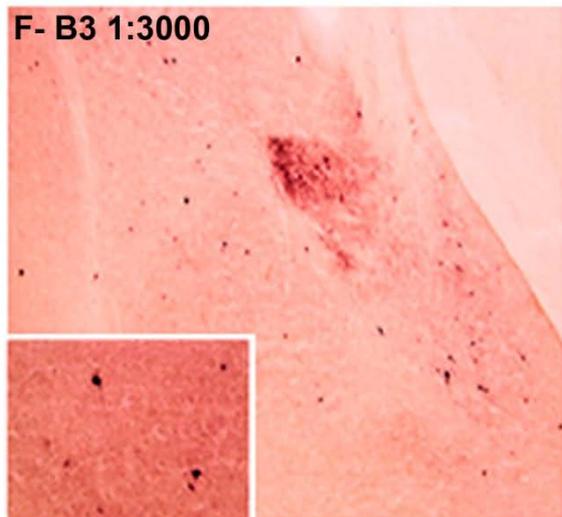
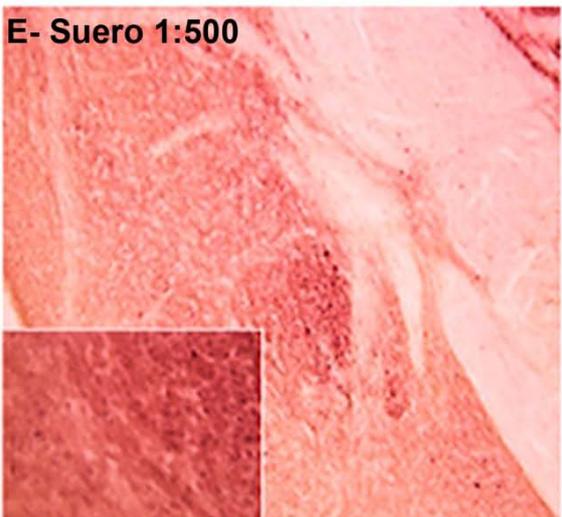
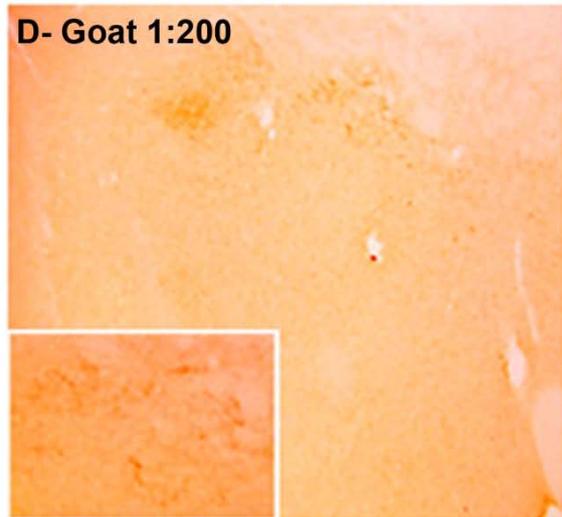
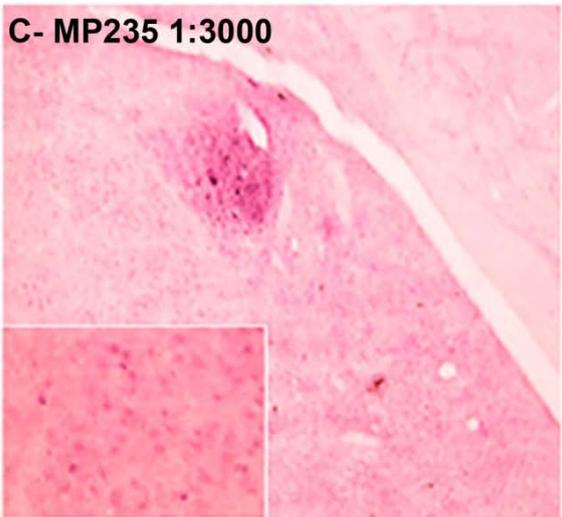
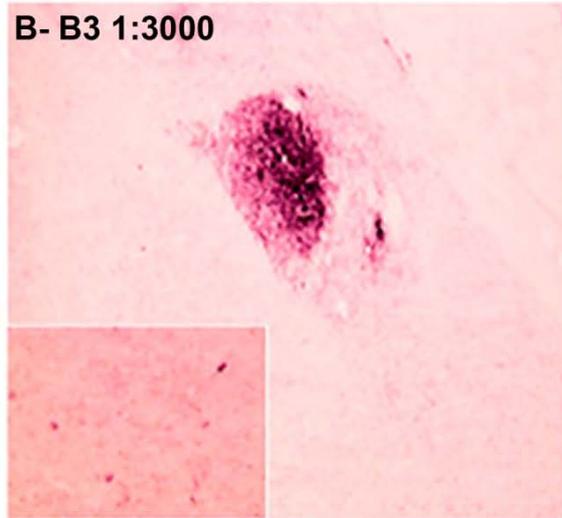
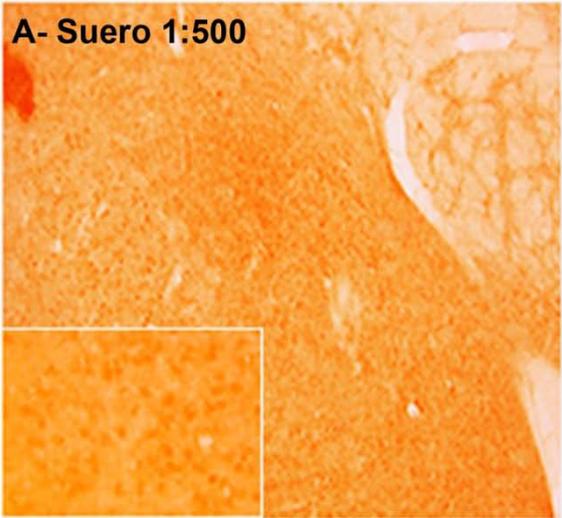


**F- B3 1:3000**



## PLATE II

**Resultados de inmunoreactividad contra CRF observada en el CeA utilizando diferentes anticuerpos contra este neuropéptido.** Los ratones fueron anestesiados y perfundidos con formaldehído (4%), 2 horas después del tratamiento. A los cerebros disecados, congelados y cortados en secciones coronales de 25  $\mu\text{m}$  con crióstato se les realizó una IHQ con anticuerpos hechos contra CRF. Cada panel muestra, en baja (10x) y alta (60x) magnificación, el resultado obtenido para cada anticuerpo en animales control (**A-D**) o pre-tratados centralmente con colchicina (**E-F**) y la dilución ensayada. Los anticuerpos empleados fueron: 1) Suero de conejo anti-CRF que reconoce la secuencia del neuropéptido maduro (**A** y **E**). 2) Suero de conejo anti-proCRF denominado B3, que reconoce la secuencia central del precursor de CRF (**B** y **F**). 3) Suero de conejo anti-proCRF denominado MP235, que reconoce la secuencia amino terminal del precursor de CRF, incluyendo CRF maduro (**C**) y 4) Suero de cabra anti-proCRF de origen comercial (Santa Cruz) que reconoce la secuencia del neuropéptido maduro (**D**). La inmunoreactividad positiva contra CRF se visualiza como un precipitado marrón debido al tratamiento de las muestras con anticuerpo secundario biotilado, seguido por incubación con el complejo ABC y finalmente, por el sustrato DAB.



## ANEXO Soluciones

### **ABC 1: 500**

5 ml de PBS, 10 µl de reactivo A y 10 µl de reactivo B

### **Cloruro de Níquel al 8%**

0,8 g de cloruro de níquel en 10 ml de H<sub>2</sub>O destilada

### **DAB**

Solución Stock al 1%:

1. 0.1g de DAB en 10 ml de H<sub>2</sub>O destilada

2. Adicionar 1ml de HCl 1N y agitar por 10 min hasta su total disolución

Dilución para un volumen final de 2ml:

40 µl de DAB, 40 µl de cloruro de níquel (0.8g de cloruro de níquel en 10 ml de H<sub>2</sub>O destilada), 40 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,3% (100 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% en 10 ml de H<sub>2</sub>O destilada, pH 7.2) y 40 µl de PBS 0,01M

Solución de Trabajo:

250µl de DAB al 1% en 5 ml de PBS, pH7.2 más 250 µl de cloruro de níquel al 1% y 250µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.3%

### **Dodesyl Sulfato de Sodio (SDS)**

300 µl de SDS en 10000 µl de PBS 0,01M

### **Gelatinización de portaobjetos**

Calentar 500 ml de H<sub>2</sub>O desionizada a 60°C e incorporar 1,5 gr de gelatina (Biopack, Argentina) y 0,25 gr de alúmina (Biopack, Argentina), colocar los portaobjetos en racks y sumergir en un recipiente con la mezcla durante 5 min, escurrir sobre papel y cubrir con papel de aluminio y secar en estufa a 60°C por 48 horas

### **Hidrato de Cloral**

3 gr de hidrato de cloral en 5 ml de H<sub>2</sub>O destilada

### **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,5%**

166 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% en 10 ml PBS 0,01M

### **Solución Bloqueante**

150 µl de NDS en 5000 µl de PBT

### **Solución Buffer Fosfato (PBS) 0,1 M 10x pH 7,4**

Disolver en 1000 ml de H<sub>2</sub>O destilada: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10,9 g, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3,2 g y NaCl 81,6 g. Ajustar a pH con 10M NaOH

### **Buffer de Fosfatos Tritón (PBT)**

Agitar a temperatura ambiente 200 ml de PBS 0.01M y agregar 500 µl de tritón X (Biopack, Argentina) y mantener agitando el tiempo necesario hasta su total disolución

### **Solución Anti-Fading**

0,1g de DABCO (1,4-Diazabicyclo [2.2.2]- octane, Sigma), 5 ml de glicerol y 5 ml de PBS 0,01M

### **Solución Anti-Fading con H<sub>ö</sub>echst**

Agregar 10 µl de bisBenzimide H33258 (Sigma) en 1 ml de Solución anti-fading

### **Solución Criopreservante**

Para 100 ml: 50 ml de PBS 0,1 M, 30 ml de etilenglicol y 20 ml de glicerol

### **Solución Fijadora de Formaldehído al 4%**

50 ml de formaldehído (Biopack, Argentina) en 450 ml de PBS 0,01M

**Solución de Lavado**

200 µl de heparina cálcica de solución de 12500 UI (Sanofi Aventis, France) en 500 ml de PBS 0,01M

**Solución de Tionina**

Disolver 25 mgr de Tionina en 100 ml de buffer de acetato pH 3,8-4,6

**Solución de Sacarosa al 20%**

8 gr de sacarosa (Biopack, Argentina) en 40 ml de PBS 0.01M

## **CERTIFICACIONES**



## **INSTITUTO MULTIDISCIPLINARIO DE BIOLOGÍA CELULAR (IMBICE) Ciclo de Seminarios 2011**

**Aula Fernando Estivariz –IMBICE - Calle 526 entre 10 y 11 – La Plata  
11:00 – 12:00 hs**

**Entrada libre y gratuita. Consultas: tel. 421-0112**

**Coordinadores: Dra. H. Campaña, Dra. C. I. Catanesi, Dra. Marina Muzzio**

### **JULIO**

13: Dr. Eduardo Llambías. Centro de Investigaciones Geológicas  
"La actividad volcánica en Argentina. Balance negativo y positivo"

27: Vacaciones de Invierno

### **AGOSTO**

10: Bioq. Luisina Ongaro. Lab. de Neuroendocrinología, IMBICE  
"Rol de la función endocrina testicular sobre la secreción de adipoquinas".

24: Dr. Horacio Heras. INIBIOLP (CONICET-UNLP) Facultad de Medicina, UNLP  
"Rol de la neurotoxina PV2 en la defensa de los embriones de *Pomacea canaliculata*"

### **SEPTIEMBRE**

7: Lic. Laura Glesmann. Lab. de Genética Molecular, IMBICE  
"Variación de X-STRs en wichíes de la provincia de Chaco"

28: Dra. Marina Sardi. Div. Antropología, FCNyM, UNLP  
"Ontogenia craneofacial humana: todo en partes"

### **OCTUBRE**

12: Lic. Mariela S. Pawluk. Lab. de Epidemiología, IMBICE  
"Impacto de la condición socioeconómica adversa sobre labio leporino en Argentina"

24 (lunes): Dra. Emma Alfaro. Instituto de Biología de la Altura, UNJu  
Título a confirmar

### **NOVIEMBRE**

9: Lic. M. Rita Santos. Lab. de Genética Molecular Poblacional, IMBICE  
"Ancestralidad y factores de riesgo en fisuras orales"

23: Bioq. Agustina Cabral. Lab de Endocrinología de la Reproducción y Lab. de Neurofisiología, IMBICE.  
"Estudios del rol modulador de Ghrelina sobre la actividad neuroendocrina"

**INSTITUTO MULTIDISCIPLINARIO DE BIOLOGÍA CELULAR (IMBICE)**  
**Ciclo de Seminarios 2012**

**Aula Fernando Estivariz –IMBICE - Calle 526 entre 10 y 11 – La Plata**

Febrero

28: Dra. Tábita Hünemeier. “Las prácticas culturales y su papel en la evolución de las poblaciones humanas”.

Marzo

9: Lic. Ana Alzamendi. “Efecto de la ingesta de una dieta rica en fructosa por la rata gestante o lactante sobre la actividad endócrino-metabólica de la primera progeñie”.

14: Dr. Mariano Grasselli. “Síntesis y modificación de materiales poliméricos para biotecnología”.

20: Dra Silvia Alonso. “Diseño y caracterización biofísica y funcional de micro y nanovectores”.

27: Dr. Rolando González José. “Diferentes enfoques sobre la integración morfológica en humanos modernos: casos de estudio en poblaciones actuales y extinguidas desde la óptica de la genética cuantitativa”.

Abril

11: Dra. Vilma G. Rosato. “Líquenes (Fungi lichenisati): morfología, reproducción y hábitat”.

17: Dra Nadia Chiaramoni. “Formulaciones liposomales: Aplicaciones en la industria alimenticia y drug delivery”.

Mayo

2: Dr. Francisco Barrantes. “Aspectos biofísicos de receptores nicotínicos”.

8: Dr. Enrique Portiansky. Envejecimiento y sus efectos sobre el sistema nervioso central.

15: Dr. Mario Ermácora Director IMBICE. “Biología estructural del receptor ICA 512 involucrado en la secreción de insulina”.

22: Dra. Marina Muzzio. Lab. de Genética Molecular Poblacional – IMBICE. “Reconstruyendo la diversidad genética nativa americana en Puerto Rico a partir de poblaciones contemporáneas”.

Junio

7: Dr. Diego Ferreira. Depto. de Química Biológica, Fac. Cs. Exactas y Naturales - UBA. “Proteínas repetitivas: secuencia, estructura, función y más allá la frustración”

19: Dr. Francisco Urbano. “Comparative study of cocaine and methylphenidate-mediated alterations on thalamic GABAergic transmission in mice.

26: Dr. Luis Epele y Dr. Carlos W. Rapela. “Plan estratégico de desarrollo científico y tecnológico del CCT CONICET La Plata”.

Julio

10: Dr. Guillermo R. Castro. “Biomateriales para liberación controlada de moléculas”

## "Fronteras en BioCiencias"

### Simposio Conjunto de la Sociedad Max Planck y el Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva

Polo Científico Buenos Aires - Argentina  
22 a 25 abril 2012

#### Programa

#### Domingo, 22 de abril 2012

##### Biología General

Coordinador: **Herbert Jäckle** (Instituto Max Planck de Química Biofísica, Göttingen)

- 14.30 a 14.55 **Philippe Bastiaens** (Instituto Max Planck de Fisiología Molecular, Dortmund)  
*Modulación de la organización espacial de un producto de oncogén como un nuevo enfoque para tratar el fenotipo de las células cancerosas*
- 14.55 a 15.20 **Bill Hansson** (Instituto Max Planck de Ecología Química, Jena)  
*Representación de valencia de olor en el lóbulo antenal de la Drosophila*
- 15.20 a 15.45 **Rolf Kemler** (Instituto Max Planck de Inmunobiología y Epigenética, Freiburg)  
*La vía Wnt / $\beta$ -catenina y la pluripotencia*
- 15.45 a 16.10 **Ralf J. Sommer** (Instituto Max Planck para Biología del Desarrollo, Tübingen)  
*Del desarrollo a la evolución y más allá - un enfoque integrador de la biología de los nematodos*
- 16.10 - 16.35 **Linda Partridge** (Instituto Max Planck para la Biología del Envejecimiento, Köln)  
*Vías sensoras de nutrientes y envejecimiento*
- 16.35 a 17.00 **Thomas Jenuwein** (Instituto Max Planck de Inmunobiología y Epigenética, Freiburg)  
*Control epigenético por metilación de histonas*
- 17.00 a 18.00 *Café*

##### Inauguración Oficial

- 18.00 a 18.30 Recepción  
**Lino Barañao** (Ministro de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva Argentina)  
**Günter Kniess** (Embajador de Alemania)  
**Eduardo Arzt** (Director de IBioBA-MPSP)
- 18,30 a 19,10 **Herbert Jäckle** (Vicepresidente de la Sociedad Max-Planck)  
La Sociedad Max Planck  
**Florian Holsboer**: (Instituto Max Planck de Psiquiatría, München)  
Historia de una relación

- 19:15 Conferencia Vespertina** : **Robert Huber** (Instituto Max Planck de Bioquímica, Martinsried), Premio Nobel  
Proteólisis intracelular, ciencia básica y desarrollo de fármacos  
Coordinador: Marisa Colombo (IHEM CONICET-Mendoza)

Lunes, 23 de abril 2012

**Neurobiología**

Coordinador: **Daniel Tomsic** (IFIBYNE - CONICET - UBA, Buenos Aires)

- 09:00-09:25 **Peter Mombaerts** (Instituto Max Planck para la Investigación del Cerebro, Frankfurt)  
*Codificación del olfato*
- 9:25-9:50 **Tobias Bonhoeffer** (Instituto Max Planck de Neurobiología, Martinsried)  
*Modificación de la sinapsis por la actividad en el cerebro de los mamíferos*
- 09:50-10:15 **Luis Barbeito** (Instituto Pasteur de Montevideo)  
*Rol patogénico de los astrocitos en las enfermedades neurodegenerativas*
- 10:15 - 10:40 **David Fitzpatrick** (Instituto Max Planck de Florida )  
*Construcción de representaciones corticales con la experiencia: Reflexiones sobre la Corteza Visual*
- 10:40-11:05 **Nils Brose** (Instituto Max Planck de Medicina Experimental, Göttingen)  
*Proteínas sinápticas para la adhesión celular: Desde la formación de sinapsis a los trastornos del Espectro Autista*
- 11:05 - 11:30 **Damián Refojo** (Instituto Max Planck de Psiquiatría, Munchen, y IBioBA MPSP)  
*Nedilación: una nueva vía de señalización en el cerebro con funciones críticas en el desarrollo neuronal*
- 11:30 - 12:00 *Café*
- 12:00 - 12:25 **Alfredo Cáceres** (Instituto MM Ferreira Córdoba)  
*Dinámica de microtúbulos , señalización de Rho GTPasa y formación del axón*
- 12:25-12:50 **Axel Borst** (Instituto Max Planck de Neurobiología)  
*En busca del Santo Grial de la Visión del Movimiento en la Mosca*
- 12:50-13:15 **Michael Morgan** (Instituto Max Planck de Investigación Neurológica, Köln)  
*Percepción Visual*

**Biología Vegetal**

Coordinador : Jorge Muschietti (INGEBI-CONICET, Buenos Aires)

- 15:00-15:25 **Marcos Stitt** (Instituto Max Planck de Fisiología Molecular Vegetal) Golm)  
*Equilibrio del Metabolismo y crecimiento en ciclos diurnos: ¿Cómo hacen las plantas para superar a nuestros banqueros y políticos?*
- 15:25 - 15:50 **Lothar Willmitzer** (Instituto Max Planck de Fisiología Molecular Vegetal, Golm)  
*Interacción entre los Vegetales y el Medio Ambiente – Un análisis de sistemas*
- 15:50-16:15 **Fernando Carrari** (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria)  
*Abordaje del metabolismo de importantes compuestos nutricionales en especies de plantas de cultivo*
- 16:15-16:40 **Detlef Weigel** (Instituto Max Planck para Biología del Desarrollo, Tübingen)  
*Diseción de las contribuciones genéticas y epigenéticas en la evolución vegetal*
- 16:40-17:05 **José Estévez** (LFBM-IFIBYNE, CONICET-UBA)  
*Incremento del dulzor en células vegetales. Los nuevos protagonistas de la vía de O-glicosilación*
- 17:05 - 17:30 *Café*

- 17:30-17:55 **Regine Kahmann** (Instituto Max Planck de Microbiología Terrestre, Marburg)  
*Colonización fúngica de plantas: estrategias y sorpresas*
- 17:55-18:20 **Marcelo Yanosky** (Instituto Leloir de Buenos Aires)  
*¿Cómo hacen las plantas para saber la hora? Mecanismos moleculares que subyacen a los relojes biológicos y Calendarios*

**18:30 Conferencia de la tarde: Bert Sakmann** (Instituto Max Planck de Florida), Premio Nobel  
Columna cortical: Si no comprende el funcionamiento, comprenda la estructura  
Coordinadora: **Juana Pasquini** (IQUIFIB / CONICET Buenos Aires)

**Martes, 24 de abril 2012**

*En memoria de Elizabeth Jares-Erijman*

**Moléculas y Estructura** Coordinador : **Francisco Barrantes** (UCA-CONICET)

- 08:50 **Tom Jovin**: Evocación de la memoria de EliJares-Erijman († 2011)
- 09:00-09:25 **Reinhard Luhrmann** (Instituto Max Planck de Química Biofísica, Göttingen)  
*Estructura y función del espliceosoma*
- 09:25-09:50 **Luis S. Mayorga** (IHEM Mendoza)  
*Dinámica de la remodelación de la membrana durante la exocitosis acrosomal*
- 09:50 - 10:15 **Pedro Aramendía** (INQUIMAE CONICET-UBA)  
uso de nanopartículas de metal con moléculas fluorescentes para mejorar el funcionamiento de los sensores
- 10:15-10:40 **Tom Jovin** (Instituto Max Planck de Química Biofísica, Göttingen)  
*Principios de organización molecular en las enfermedades neurodegenerativas: "acunas" membranas, y mitocondrias*
- 10:40 - 11:05 **Christian Griesinger** (Instituto Max Planck de Química Biofísica, Göttingen)  
*Neurodegeneración y protección: visión espectroscópica de RMN*
- 11:05-11:35 *Café*
- 11:35 - 12:00 **Claudio O. Fernández** (IBR-CONICET, Rosario)  
*Biología Estructural de las enfermedades neurodegenerativas: diseño de fármacos y terapia*
- 12:00-12:25 **Darío Estrin** (DQIAF-INQUIMAE, FCEN-UBA, CONICET)  
*Simulación por computadora de hemo proteínas*
- 12:25 - 12:50 **Helmut Grubmueller** (Instituto Max Planck de Química Biofísica, Göttingen)  
*Mecanoenzimática de nanomáquinas biomoleculares: Que la fuerza te acompañe*
- 12:50-13:15 **Benjamin Kaupp** (Caesar, Bonn)  
*Sensibilidad en el límite físico. ¿Cómo detectan las células las moléculas individuales?*

**Miércoles, 25 de abril de 2012**

**Descubrimientos y Aplicaciones** Coordinador: **Claudia Pérez Leirós** (FCEN-UBA)

- 09:00-09:25 **Manfred Gahr** (Instituto Max Planck de ornitología, Seewiesen)  
*Del cerebro sexuado a las canciones sensuales*
- 09:25 - 09:50 **Claudio Cavasotto** (IBioBA-MPSP)  
*Caracterización in silico de las interacciones moleculares en los sistemas biológicos*

09:50 - 10:15	<b>Walter Stuehmer</b> (Instituto Max Planck de Medicina Experimental, Göttingen) <i>¿Un nuevo fármaco de uso secundario para mitigar la enfermedad de Parkinson?</i>
10:15-10:40	<b>Fernando Goldbaum</b> (Instituto Leloir BA) <i>Ingeniería de proteínas para el diseño de vacunas: la plataforma BLS</i>
10:40-11:05	<b>Arturo Zychlinsky</b> (Instituto Max Planck de Biología de Infecciones, Berlín) <i>TEN: trampas extracelulares neutrófilas en salud y enfermedad</i>
11 : 05 - 11:35	Café
11:35-12:05	<b>Florian Holsboer</b> (Instituto Max Planck de Psiquiatría, München) <i>¿Cómo podemos cumplir la promesa de brindar un tratamiento antidepresivo personalizado: CRFR1 un caso en particular.</i>
12:05-12:45	<b>Herbert Waldmann</b> (Instituto Max Planck de Fisiología Molecular, Dortmund) <i>Análisis químico-biológico de de la dinámica de los procesos biológicos</i>
12:45	<b>"Lo que queremos saber" acerca de la MPS y el Polo Científico:</b> Preguntas y respuestas. Coordinador: Eduardo Arzt y Herbert Jäckle

Este simposio es uno de los puntos de partida para el desarrollo de las actividades académicas de extensión y postgrado de IBioBA - CONICET - MPSP

*Comité Organizador del Evento*

- Dirección Nacional de Relaciones Internacionales, Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva, Argentina
- Instituto de Investigación Biomédica de Buenos Aires - CONICET – Institución Asociada a la Sociedad Max Planck (IBioBA-CONICET-MPSP)
- Embajada de Alemania en Argentina

*Agradecemos especialmente al Dr. Karl Harlos por su generoso apoyo financiero que nos ha permitido realizar este simposio*

# SAN2011

XXVI CONGRESO ANUAL  
DE LA SOCIEDAD ARGENTINA  
DE INVESTIGACIÓN EN NEUROCIENCIA

HUERTA GRANDE, CÓRDOBA  
18-22 OCTUBRE 2011.



1- ORGANIZING COMMITTEE.....	11
2- PROGRAM.....	13
3- COURSE ABSTRACTS.....	19
4- MEETING ABSTRACTS.....	27
5- YOUNG INVESTIGATORS ABSTRACTS.....	43
6- POSTERS ABSTRACTS	
INDEX BY AREA AND SESSION.....	53
CELLULAR AND MOLECULAR NEUROBIOLOGY.....	69
CHRONOBIOLOGY.....	122
COGNITION, BEHAVIOR, AND MEMORY.....	130
COMPUTATIONAL NEUROSCIENCE.....	174
MOTOR SYSTEMS.....	180
NEURAL CIRCUIT PHYSIOLOGY.....	186
NEUROCHEMISTRY AND NEUROPHARMACOLOGY.....	194
NEUROENDOCRINOLOGY AND NEUROIMMUNOLOGY.....	208
SENSORY SYSTEMS.....	217
SYNAPTIC TRANSMISSION AND EXCITABILITY.....	227
7- AUTHORS LIST.....	241

## INDEX

# 9

# 5

within the immune system is involved in the diazepam effect on EAE and indicate that increasing GABAergic activity potentially ameliorate EAE.

Neuroendocrinology and Neuroimmunology  
Poster Number 203 | Session 2

*"Ghrelin indirectly activates hypophysiotropic CRF neurons"*

Agustina Cabral<sup>2,3</sup>, Spring Valdivia<sup>3</sup>, Anabela Patrone<sup>3</sup>, Mirta Reynaldo<sup>3</sup>, Olga Suescun<sup>2</sup>, Jeffrey M Zigman<sup>1</sup>, Mario Perelló<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Divisions of Hypothalamic Research and Psychiatry, Departments of Internal Medicine The University of Texas, <sup>2</sup>Laboratorio de Endocrinología de la Reproducción, Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE), <sup>3</sup>Laboratorio de Neurofisiología, Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE)

marioperello@yahoo.com

Ghrelin is a stomach-derived hormone that acts on specific hypothalamic neurons and potently increases appetite. Also, ghrelin activates the CRF (Corticotropin-Releasing Factor)-producing neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) and, as a consequence, the neuroendocrine hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HHA). However, the neural circuits mediating this activation are mostly uncharacterized. Here, we studied the circuits by which ghrelin activates the hypophysiotropic CRF neurons in vivo. We found that peripheral and central administration of ghrelin to wild type mice strongly activates the marker of cellular activation cfos in CRF-producing neurons. Also, ghrelin increase CRF mRNA expression in the PVN and the HHA axis at peripheral level. When directly administrated on the PVN, we found that ghrelin also activates the CRF-producing neurons and the HHA axis, without any significant effect on food intake. Unexpectedly, we found that CRF neurons do not express ghrelin receptor as indicated by in situ hybridization histochemistry and ghrelin binding studies. Thus, we conclude that ghrelin activates hypophysiotropic CRF neurons indirectly, likely via a local pre-synaptic mechanism.

# Ghrelin indirectly activates hypophysiotropic CRF neurons in rodents

Agustina Cabral<sup>1,2</sup>, Spring Valdivia<sup>1</sup>, Anabela Patrone<sup>1</sup>, Mirta Reynaldo<sup>1</sup>, Olga Suescun<sup>1,2</sup>, Jeffrey M. Zigman<sup>3,4</sup>, Mario Perello<sup>1</sup>

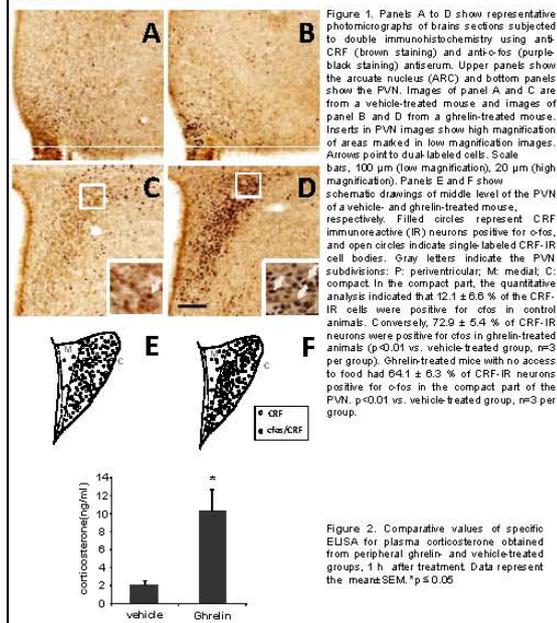
<sup>1</sup>Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE), CIC-CONICET, CCT-La Plata, Argentina, <sup>2</sup>Cátedra de Endocrinología, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP; <sup>3</sup>Department of Medicine (Divisions of Hypothalamic Research and Endocrinology and Metabolism) and <sup>4</sup>Department of Psychiatry, The University of Texas, USA.

## INTRODUCTION

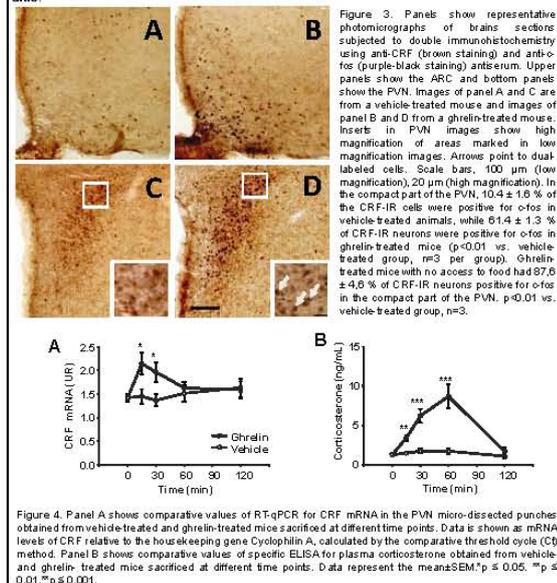
- Ghrelin is a stomach-derived hormone that acts on the central nervous system to regulate different actions, including roles in the control of growth hormone secretion, food intake/energy expenditure regulation and glucose homeostasis regulation by acting on its receptor, GHSR (*Growth Hormone Secretagogue Receptor*).
- The hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) neuroendocrine axis is one of targets of ghrelin's central actions. In response to stress, the corticotropin-releasing factor (CRF)-producing neurons of the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN) are activated, and, as a consequence, plasma glucocorticoids increase. Glucocorticoids have a variety of important effects including increases in glycaemia and body weight.
- Recently, a role of ghrelin as an activator of the HPA axis has been reported in humans and rodents. However, the neuronal pathways that mediate this activation remain unclear. **The aim of this study** was to examine the response of the CRF-producing neurons and the HPA axis of wild type mice after peripheral and central ghrelin treatment, and finally, assess if CRF-producing neurons express ghrelin receptor.

## RESULTS

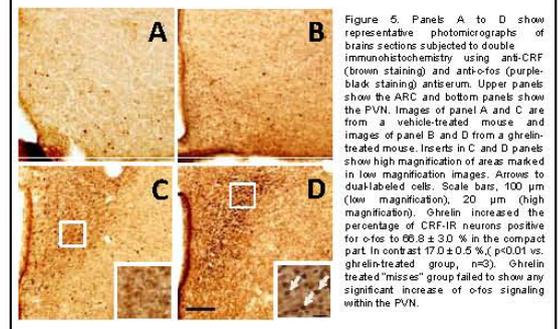
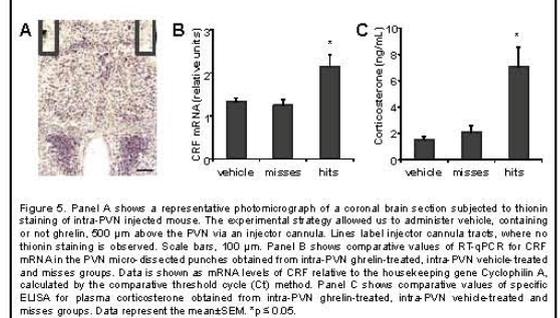
### 1) Peripheral ghrelin administration activates CRF neurons of the PVN and the HPA axis.



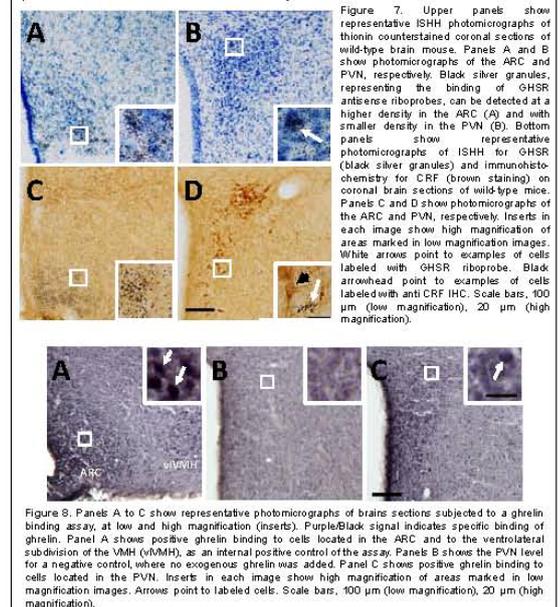
### 2) Central ghrelin administration activates CRF neurons of the PVN and the HPA axis.



### 3) Ghrelin microinjection into the PVN activates CRF neurons and the HPA axis.



### 4) CRF-IR neurons of the PVN do not express GHSR.



## CONCLUSIONS

- Ghrelin modulates CRF neurons and the HPA axis.
- Ghrelin infused into the PVN is sufficient to activate the HPA axis.
- CRF-IR neurons of the PVN do not express GHSR in normal conditions.

In summary, our results indicate that ghrelin is able to activate the CRF neurons of the PVN, via an indirect mechanism, and that this action is sufficient to acutely increase the plasma glucocorticoid concentration. Interestingly, the ghrelin-induced activation of hypophysiotropic CRF neurons can occur independently of those circuitries controlling food intake. Thus, the ghrelin's functions as an orexigenic or stress signal could be, potentially, dissociated.

ACKNOWLEDGEMENTS: This study was supported by Florencio Fiorini Foundation, International Brain Research Organization and PIC2010-1954-grants. AC, SV and MR were funded by the Commission of Scientific Investigations of the Province of Buenos Aires.

*and MR expression, MR/GR balance, anxiety and hedonic behavior"*

**Verónica Trujillo, Patricia Durando, Marta Suárez**

*Laboratorio de Fisiología Animal, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, U.N.C.*

vero.trujillo@yahoo.com.ar

The aim of this work was to determine the effect of chronic treatment with 10 mg/Kg of tianeptine on GR and MR expression, GR/MR balance in the dorsal hippocampus, anxiety and hedonic behavior in male adult Wistar rats separated from their mother as neonates and submitted to variable chronic stress for 24 days, which is considerate an animal model of depression. GR and MR levels were determined by immunohistochemistry in the layers CA1, CA2, CA3 and dentate gyrus of dorsal hippocampus. Plus Maze test was performed in order to calculate anxiety indexes. Sucrose intake and preference were used as anhedonic indexes. Our results show that maternal separation significantly decreased MR- positive cells in all layers of rats treated with vehicle, while the treatment with tianeptine reverted this effect; and MR/GR balance was decreased in the layer CA3. On the other hand, stress significantly increased the immunoreactive cells to GR in the layer CA2 and tianeptine increased GR levels in layer CA3. Anxiety indexes were not altered by any of the treatments. In the Sucrose Preference Test, stressed animals showed a tendency to reduce this index at the end of treatments. On the contrary, stressed and treated with tianeptine groups showed a decrease of anhedonic behavior.

Neuroendocrinology and Neuroimmunology

Poster Number 209 | Session 2

*"Cold exposure activates Thyrotropin Releasing Hormone (TRH)-producing neurons in specific brain nuclei"*

**Spring Valdivia<sup>2</sup>, Agustina Cabral<sup>2</sup>, Mirta Reynaldo<sup>2</sup>, Silvia Gordon<sup>2</sup>, Yamila Quiroga<sup>2</sup>, Eduardo Nillni<sup>1</sup>, Mario Perelló<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Division of Endocrinology, Department of Medicine; Brown University, <sup>2</sup>Laboratorio de Neurofisiología. Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE)

marioperello@yahoo.com

TRH mediates cold-induced thermogenesis via both neuroendocrine and autonomic mechanisms. It is known that the TRH neurons located in the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) regulate the neuroendocrine thyroid axis. In contrast, what populations of TRH neurons mediate the activation of the sympathetic mechanisms induced by cold exposure is unclear. Here, we

# 211

systematically examined the distribution of TRH neurons activated in response to cold exposure throughout the adult rat brain. To map the activation TRH neurons, we used double immunohistochemistry for the marker of cellular activation, cfos, and the TRH prohormone. To further assess the functional consequences of the cfos expression in TRH neurons, we evaluated the preproTRH mRNA levels in brain micro-dissections where TRH is produced. Our analysis was focused on hypothalamic regions including the PVN, the pre-optic area, dorsomedial nucleus and the lateral hypothalamus, and areas of the medulla including raphe obscurus, raphe pallidus (RPa) and parapyramidal regions. Our data indicated that only the TRH neurons located in the PVN and the RPa are activated in animals exposed to cold. Thus, these groups of TRH neurons are the main candidates participating in cold-induced thermogenic mechanisms.

Neuroendocrinology and Neuroimmunology  
Poster Number 210 | Session 3

*"Study of the interaction between ghrelin and high fat diet-induced acute food intake in mice"*

**Spring Valdivia**, Agustina Cabral, Anabela Patrone, Mirta Reynaldo, Mario Perello  
*Laboratorio de Neurofisiología, Instituto Multidisciplinario de Biología Celular*  
marioperello@yahoo.com

Ghrelin is a stomach-derived hormone that acts on homeostatic and hedonic brain centers to increase food intake. We have shown that ghrelin administration affects the rewarding value of high fat diet. However, it is currently unclear how the neural circuits activated by either ghrelin or high fat diet (HFD) interact to modulate eating. Here, we quantified acute food intake in wild type mice injected with ghrelin and exposed to either HFD alone, regular chow alone or a combination of both diets. Also, we performed immunohistochemistry for cfos in the mouse brains to map the neuronal circuits activated in each experimental condition. We found that i-ghrelin increases food intake of regular chow; ii-HFD alone strongly activates food intake; and iii-ghrelin fails to further affect HFD intake or short-term HFD preference. Also, we found i-ghrelin increases cfos expression mainly in hypothalamic nuclei; ii-HFD intake increases cfos mainly in centers of the mesolimbic pathway; and iii-the combination of HFD ingestion and ghrelin administration increase cfos expression in both hypothalamic and mesolimbic pathways. Thus, we conclude that HFD potently induces food intake due to the activation of hedonic centers, which override the acute effects of ghrelin on eating.

212 #

# Cold exposure activates Thyrotropin Releasing Hormone (TRH)-producing neurons in specific brain nuclei

Spring Valdivia<sup>1,2</sup>, Agustina Cabral<sup>1</sup>, Mirta Reynaldo<sup>1</sup>, Silvia Gordon<sup>1</sup>, Yamila Quiroga<sup>1</sup>, Eduardo A. Nilin<sup>2,3</sup>, Mario Perello<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Neurophysiology of the Multidisciplinary Institute of Cell Biology (CONICET/CICPBA), La Plata, Buenos Aires, Argentina 1900. <sup>2</sup>Division of Endocrinology, Department of Medicine, The Warren Alpert Medical School of Brown University/Rhode Island Hospital, and <sup>3</sup>Department of Molecular Biology, Cell Biology and Biochemistry, Brown University, Providence, RI 02903, USA. Email: marioperello@yahoo.com

## INTRODUCTION

The neuropeptide Thyrotropin Releasing Hormone (TRH) is necessary for an adequate cold-induced thermogenesis. TRH increases body temperature via both neuroendocrine and autonomic mechanisms. It has been earlier shown that hypophysiotropic TRH neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) regulate thermogenic effects through the hypothalamic-pituitary-thyroid axis during cold exposure. However, little is known about TRH neurons involved in the activation of sympathetic mechanism in response to cold exposure. Here, we examined the response of TRH neurons to cold exposure in different brain nuclei. To map the activation of TRH neurons during cold exposure, we focused on hypothalamic regions known to have TRH neurons including the PVN, dorsomedial nucleus (DMN) and the lateral hypothalamus (LH), and areas of the ventral medulla including raphe *obscurus* (ROB), raphe *palidus* (RPa) and parapyramidal regions (PPR). Using a double immunohistochemistry protocol for the marker of cellular activation *c-fos* and the TRH prohormone, followed by analysis of the *preproTRH* gene expression, we were able to demonstrate that only TRH neurons located in the PVN and the RPa are activated in animals exposed to a cold environment. Thus, these populations of TRH neurons are the main candidates participating in short-term cold-induced thermogenic mechanisms.

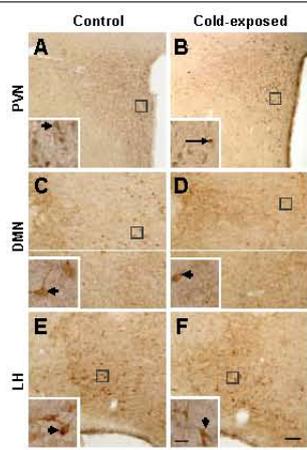
## MATERIAL AND METHODS

**Double immunohistochemistry and quantitative analysis.** Male Sprague-Dawley rats (250-270 g) exposed to either cold or room temperature, for 2 h, were systemically perfused with 4% formalin in phosphate buffer (PBS, pH 7.4). Then, brains frozen and cut coronally at 21 µm into four equal series on a sliding cryostat. Double *c-fos*/*preproTRH* staining was performed. For this, floating brain coronal sections were pretreated with 0.5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, blocked with blocking solution (3% normal donkey serum and 0.25% TritonX in PBS), and incubated with anti-*c-fos* antibody (Calbiochem/Oncogene, cat#PC39, 1:5,000) for two days at 4°C. Then, sections were treated with biotinylated donkey anti-rabbit antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories, cat# 711-065-152, 1:1,000) for 1 h, and with Vectastain Elite ABC kit (Vector Laboratories, cat#PK-6100) for 1 h, according to manufacturer's protocols. Then, visible signal was developed with 3'-3'-diaminobenzidine (DAB, cat#D5637)/Nickel solution, giving a black/purple precipitate. Consecutively, sections were washed and incubated overnight with rabbit anti-*preproTRH* antibody (1:3,000). Next day, sections were sequentially incubated with biotinylated donkey anti-rabbit antibody and Vectastain Elite ABC kit as detailed above. Finally, visible signal was developed by incubation with DAB solution, giving a brown precipitate. Sections were sequentially mounted on glass slides, and cover slipped with mounting media. Results were visualized using bright-field light sources. Bright-field images were acquired with an Eclipse 50i microscope and a DS-R1 digital camera. For each brain region, total and *c-fos*-positive *preproTRH* cells were quantified in one out of four complete series of coronal sections and then number were multiply by four. The data were corrected for double counting, according to the method of Abercrombie.

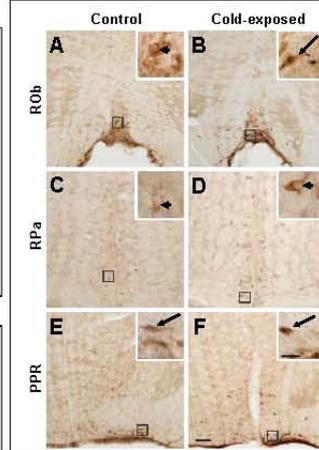
**Gene expression analysis.** Rats exposed for 1 h to either cold or room temperature were sacrificed by decapitation. Brains were dissected, placed in cold diethylpyrocarbonate-PBS, and micro-dissections of tissue corresponding to the location of different brain regions [identified by comparing the coronal slices to a rat brain atlas of Paxinos and Watson] were excised from 1 mm coronal using a 15 g needle. The brain micro-dissection included: PVN, DMN, LH, RPa, ROB and PPR. Total RNA was isolated using RNeasy Reagent, quantified and treated with DNase I. cDNA synthesis was generated using random hexamer primers and SuperScript III reverse transcriptase. Quantitative real-time PCR were done using the SYBR Green® PCR Core Reagents and the ABI 7500 Fast-Real time PCR system. Averaged levels of *preproTRH* normalized to the housekeeping gene hypoxanthine phosphoribosyl transferase (*hprt1*), calculated by the comparative threshold cycle (Ct) method, and then the data is presented as a percentage of levels observed in the same brain areas of control animals. Primers sequences were: upstream *preproTRH*, 5'-GAGAGGGTGTCTTAATGCCT-3'; downstream *preproTRH*, 5'-GGCCTGTTTGACACAAAGTCC-3'; upstream *hprt1*, 5'-GCAAGCTTTCCTTCTGG-3'; downstream *hprt1*, 5'-GTCTGGCCTGTATCCAACT-3'. All reactions were performed per triplicate in sealed fast optical 96-well reaction plates. Standard curves for *preproTRH* and *hprt1* transcript levels were generated using hypothalamic cDNA of lean rat with ABI 7500 Fast System SDS Software v1.3.1.

Statistical analyses. The data expressed as the mean ± SEM. Data were analyzed by Student's t-test for comparison of different mean values. Significant differences were considered when P < 0.05.

## RESULTS



**Figure 1. *c-fos* and *preproTRH* double immunostaining in hypothalamic areas of control and cold exposure animals.** Panels show a series of photomicrographs of coronal sections of different hypothalamic regions after double immunohistochemistry for *preproTRH* (brown signal) and *c-fos* (black/purple signal). Left and right vertical panels show representative photomicrographs of animal exposed to 24 or 4°C, respectively. Upper (A-B), middle (C-D) and bottom (E-F) horizontal panels show representative photomicrographs of the PVN (bregma -1.88 mm), DMN (bregma -2.80 mm) and LH (bregma -2.12 mm) regions, respectively, for each experimental group. Each panel show images in low magnification (x20) and inserts in high magnification (x120). Arrows point *preproTRH*-IR neurons positive for *c-fos*, and arrowheads point *preproTRH*-IR neurons negative for *c-fos*. Scale bar in low magnification photomicrographs: 100 µm. Scale bar in high magnification photomicrographs: 20 µm.



**Figure 2. *c-fos* and *preproTRH* double immunostaining in ventral regions of the medulla of control and cold exposure animals.** Panels show a series of photomicrographs of coronal sections of different regions of the medulla after double immunohistochemistry for *preproTRH* (brown signal) and *c-fos* (black/purple signal). Left and right vertical panels show representative photomicrographs of animal exposed to 24 or 4°C, respectively. Upper (A-B), middle (C-D) and bottom (E-F) horizontal panels show representative photomicrographs of the RPa (bregma -12.80 mm), ROB (bregma -11.80 mm) and PPR (bregma -11.00 mm) regions, respectively, for each experimental group. Each panel show images in low magnification (x20) and inserts in high magnification (x120). Arrowheads point *preproTRH*-IR neurons negative for *c-fos*, and arrows point *preproTRH*-IR neurons positive for *c-fos*. Scale bar in low magnification photomicrographs: 100 µm. Scale bar in high magnification photomicrographs: 20 µm.

**TABLE 1. Estimates of percentage of *preproTRH*-IR cells positive for *c-fos*.**

	Control	Cold exposed
Hypothalamus		
Paraventricular Nucleus-PVN	2 ± 2	11 ± 3*
Dorsomedial Nucleus-DMN		
Lateral Hypothalamus-LH	2 ± 2	3 ± 3
Medulla		
Raphe <i>palidus</i> -RPa	4 ± 2	47 ± 7**
Raphe <i>obscurus</i> -ROB	-	-
Parapyramidal region-PPR	56 ± 6	64 ± 8

\* The percentage of *preproTRH*-IR cells positive for *c-fos* was determined in the whole nuclei. Strict criteria (described in Materials and Methods) were used to make these estimates. The data were corrected for over counting as per Abercrombie (Abercrombie, 1946) and reported as mean percentage ± SEM for 5 different brains in each group. Dashes indicate regions without *preproTRH*-IR cells positive for *c-fos*. Representative photomicrographs can be found in Figure 1 and 2. \*, P < 0.05. \*\*, P < 0.01.

**TABLE 2. Relative mRNA levels of *preproTRH* in control and cold-exposed animals.**

	Control	Cold exposed
Hypothalamus		
Paraventricular Nucleus-PVN	100.0 ± 4.5	226.4 ± 29.1**
Dorsomedial Nucleus-DMN	100.0 ± 7.2	114.4 ± 12.4
Lateral Hypothalamus-LH	100.2 ± 9.1	106.3 ± 9.1
Medulla		
Raphe <i>palidus</i> -RPa	99.9 ± 9.0	187.9 ± 15.2**
Raphe <i>obscurus</i> -ROB	100.2 ± 9.5	109.3 ± 10.5
Parapyramidal region-PPR	99.9 ± 7.4	108.9 ± 8.9

\* Relative mRNA levels of *preproTRH* in control and cold-exposed animals was determined in micro-punches of each brain nuclei (described in Materials and Methods). All values are normalized to the levels of the housekeeping gene *hprt1*, calculated by the comparative threshold cycle (Ct) method, and then data is presented as a percentage of levels observed in the same brain areas of control animals. \*\*, P < 0.01.

## CONCLUSIONS

- TRH neurons in the PVN are activated in animals exposed to cold.
- TRH neurons located in the DMN and LH regions of the hypothalamus are not activated in animals exposed to a cold environment for 2 h.
- TRH neurons in the RPa are one of the two unique populations, in addition to TRH neurons of the PVN, activated in response to cold exposure.
- TRH neurons located in other ventral regions of the medulla, such as the ROB and PPR were not activated in response to cold exposure.

**In summary, we found that TRH-producing neurons located in the PVN and RPa participate in the neuronal circuits activated in response to cold exposure. In contrast, TRH neurons located in other central areas failed to show signs of activation in our experimental conditions. Future studies will be needed to elucidate the role of some of these TRH-producing neurons, particularly for the ones located in the DMN and LH since their physiological role remains unknown.**

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by Florencio Fiorini Foundation, International Brain Research Organization and PICT2010-1954 grants. AC, SV and MR were supported by the Commission of Scientific Investigations of the Province of Buenos Aires.

# Study of the interaction between ghrelin- and high fat diet-induced acute food intake in mice

Spring Valdivia<sup>1</sup>, Agustina Cabral<sup>1</sup>, Anabela Patrone<sup>1</sup>, Mirta Reynaldo<sup>1</sup>, Mario Perello<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Neurophysiology of the Multidisciplinary Institute of Cell Biology (CONICET/CICPBA), La Plata, Buenos Aires, Argentina 1900.

## INTRODUCTION

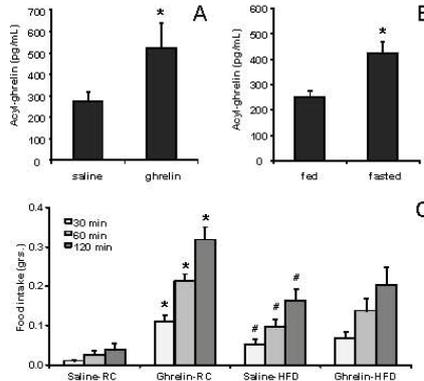
Food intake involves an integrated regulatory system in which peripheral signals regulate homeostatic and hedonic brain circuits to maintain body weight. Currently, little is known about the relative contributions of feeding-related hormones to homeostatic vs. hedonic controls of feeding behavior.

One candidate to mediate both body weight homeostasis and food reward processing is the orexigenic hormone ghrelin. Preprandial and calorie restriction-associated increases in plasma ghrelin suggest a role for ghrelin in body weight homeostasis-related eating. In addition, ghrelin receptors (GHSRs) are expressed in areas known to regulate homeostatic feeding, such as the arcuate nucleus (ARC) and the paraventricular nucleus (PVN) of the hypothalamus and the dorsal vagal complex (DVC). GHSRs are also expressed in and ghrelin interacts with several brain regions involved with reward processing, such as the mesolimbic pathway. In particular, GHSRs are highly expressed in the ventral tegmental area (VTA) neurons, which innervate the nucleus accumbens (Acc) and the central amygdala (CeA). However, whether ghrelin affects specific behaviors associated with rewarding aspects of eating remains unclear.

Here, we characterized ghrelin's effects on food intake of regular chow (RC) and high fat diet (HFD). Also, we used immunohistochemistry for c-fos, as a marker of cellular activation, to map the activation cells in different brain nuclei. Finally, we tested whether ingestion of HFD in presence of elevated plasma ghrelin has any long term impact on food intake behavior.

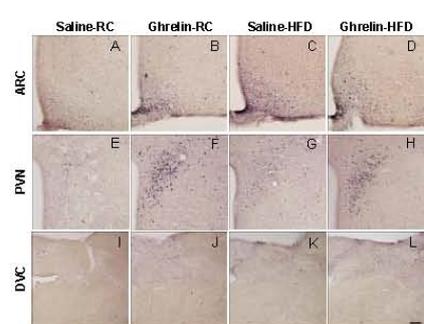
## RESULTS

### 1) Ghrelin treatment increased intake of RC, and failed to affect intake of HFD



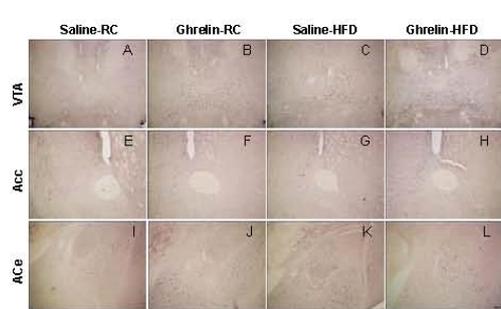
**Figure 1.** *Ad libitum* fed male C57BL6J mice were injected with saline with or without acyl-ghrelin (0.2 µg/g body weight, Global Peptide, cat. #C-et-004, s.c.). This protocol induces an acute increase in plasma acyl-ghrelin (A) that is similar to a physiological increase of acyl-plasma ghrelin induced by overnight fasting (B). Plasma acyl-ghrelin levels were measured in EDTA- and protease inhibitor-treated samples with an EIA kit (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI). Acute ghrelin treatment increased intake of RC [3.8 % fat, 2.48 cal/gr]. Exposure to HFD [22.2 % fat, 3.69 cal/gr] induced food intake that was not further increased by ghrelin (C). \*, P < 0.05 vs. saline-treated group; #, P < 0.05 vs. RC group, same treatment. (n=7-9 per group).

### 2) Ghrelin treatment activate brain nuclei involved in homeostatic food intake



**Figure 4.** Mice were treated with ghrelin as explained in Figure 1. Then, animals were fixed and brains removed and processed for immuno-histochemical analysis. Upper (A-D), middle (E-H) and bottom (I-L) horizontal panels show photomicrographs of coronal sections of ARC, PVN and DVC, respectively, after immunohistochemistry for c-fos (Calbiochem/Oncogene, cat#FC38, 1:7,500; black/purple signal). Column of panels group photomicrographs of each region for each experimental group as follows: Saline-RC (Panels A, E and I), Ghrelin-RC (B, F and J), Saline-HFD (C, G and K) and Ghrelin-HFD (D, H and L). Magnification: 20x. Scale bar: 50 µm.

### 3) Ghrelin treatment enhanced the impact of the HFD on the mesolimbic pathway



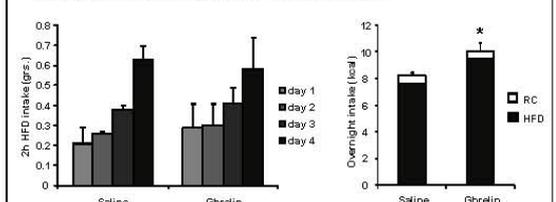
**Figure 3.** Mice were treated with ghrelin as explained in Figure 1. Then, animals were fixed and brains removed and processed for immuno-histochemical analysis. Upper (A-D), middle (E-H) and bottom (I-L) horizontal panels show photomicrographs of coronal sections of VTA, Acc and CeA, respectively, after immunohistochemistry for c-fos (black/purple signal). Column of panels group photomicrographs of each region for each experimental group as follows: Saline-RC (Panels A, E and I), Ghrelin-RC (B, F and J), Saline-HFD (C, G and K) and Ghrelin-HFD (D, H and L). Magnification: 10x. Scale bar: 50 µm.

**TABLE 1.** Estimates of cells positive for c-fos in specific brain nuclei<sup>1</sup>.

	Saline-RC	Ghrelin-RC	Saline-HFD	Ghrelin-HFD
Arcuate Nucleus-ARC	7±3	45±6 a	12±2	27±5 a
Paraventricular Nucleus-PVN	10±3	114±22 a	20±8	97±15 a
Dorsal Vagal complex-DVC	1±1	15±3	2±2	17±4
Ventral tegmental area-VTA	53±13	72±20	122±14 b	184±15 ab
Nucleus Accumbens-Acc	--	--	30±4 b	37±1 b
Central Amygala-CeA	--	--	13±2 b	15±2 b

<sup>1</sup> Cells positive for c-fos was determined in one level of each nuclei (n=3-4 per group). Levels were based on "The Mouse Brain Atlas" of Paxinos and Franklin (2001). The chosen level from Bregma for each nucleus was as follows: ARC: -1.70 mm, PVN: -0.82 mm, VTA: -7.56 mm, VTA: -2.92 mm, Acc: 1.18 mm and CeA: -1.48 mm. The data is reported as mean±SEM for 4-3 different brains in each group. Dashes indicate regions without cells positive for c-fos. Representative photomicrographs can be found in Figure 2 and 3. a, P < 0.05 vs. saline-treated same diet; b, P < 0.05 vs. RC same treatment.

### 4) Chronic intake of HFD, in the presence of high plasma ghrelin, increases the subsequent HFD intake in absence of ghrelin administration



**Figure 4.** *Ad libitum* fed male C57BL6J mice were injected with saline with or without acyl-ghrelin (0.2 µg/g body weight, Global Peptide, cat. #C-et-004, s.c.) and allowed to eat HFD for 2 h everyday for 4 consecutive days (A). In the fifth day, mice were exposed to both diets and overnight food intake was quantified (B). \*, P < 0.05 vs. saline treated group. (n=3 per group).

## CONCLUSIONS

- Increase of plasma ghrelin, within a physiological range, is able to induce RC intake in mice.
- c-fos mapping indicates that ghrelin treatment activate brain nuclei involved in homeostatic food intake and failed to affect nuclei of the meso-limbic pathway.
- HFD potently induces food intake, which is not further affected by acute ghrelin administration.
- HFD intake exclusively activate nuclei of the meso-limbic pathway, as indicated by c-fos immunostaining.
- Ghrelin treatment enhances HFD-induced increase of c-fos in the VTA, although food intake is not further affected.
- Chronic intake of HFD, in the presence of high plasma ghrelin, increases the subsequent HFD intake in absence of ghrelin administration.

**In summary, we propose that ghrelin enhances the rewarding value of HFD and, as a consequence, determines the specific overeating of this diet.**

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by Florencio Fiorini Foundation, International Brain Research Organization and PICT2010-1954 grants. AC, SV and MR were supported by the Commission of Scientific Investigations of the Province of Buenos Aires.