



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Estudio molecular y funcional de la regulación del gen de *Pomc* en neuronas hipotalámicas y en corticotropos hipofisarios

Tesis presentada para optar por el título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas

Lic. María Agustina Soria

Director de Tesis: Dr. Marcelo Rubinstein

Consejera de Estudios: Dra. Eleonora Katz

Lugar de trabajo: Instituto de Ingeniería Genética y Biología Molecular, "Dr. Héctor N. Torres" (INGEBI-CONICET)

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 2024

Estudio molecular y funcional de la regulación del gen de *Pomc* en neuronas hipotalámicas y en corticotropos hipofisarios

RESUMEN

El gen de proopiomelanocortina (*POMC*) codifica para un precursor polipeptídico que a través de un procesamiento post traduccional tejido específico da lugar a una variedad de hormonas y neuropéptidos biológicamente activos. El precursor es sintetizado principalmente en las corticotropos y melanotropos de la hipófisis y en neuronas del núcleo arcuato del hipotálamo. La expresión diferencial del gen, en distintos grupos celulares, depende de repertorios específicos de factores de transcripción que reconocen secuencias presentes en distintos *enhancers*. Se ha identificado una región que actúa como *enhancer* de *POMC* en corticotropos hipofisarios, ubicada a -7 kb del sitio de inicio de la transcripción del gen. Sin embargo, aún se desconoce su función *in vivo*. Para caracterizar la importancia funcional del *enhancer* -7 kb en la expresión espacio-temporal de *Pomc* en la hipófisis y el hipotálamo, y sus implicancias fisiológicas, generamos un modelo de ratón mutante deficiente en esta región, utilizando la tecnología de edición génica CRISPR/Cas9. En primer lugar, observamos que la región -7 kb actúa como *enhancer* de *Pomc* en corticotropos de ratones, desde el desarrollo temprano hasta la adultez. En ratones *Pomc*^{Δ-7/Δ-7}, los niveles de mRNA, el número de células inmunomarcadas en el lóbulo anterior de la hipófisis y la intensidad de fluorescencia se vieron reducidos respecto a sus hermanos *Pomc*^{+/+}. Los ratones mutantes presentaron un menor desarrollo del área fasciculada de la glándula adrenal. No obstante, no se evidenciaron diferencias en los niveles de corticosterona en plasma ni tests conductuales que evalúan el impacto de estresores. También, observamos que ratones adultos deficientes en el *enhancer* -7 kb presentan menos neuronas inmunomarcadas POMC+ en el hipotálamo. Estudios en ratones transgénicos, generados en esta Tesis Doctoral, demuestran que la región -7kb tiene la capacidad de dirigir fuertemente la expresión de un gen reportero a melanotropos hipofisarios y, en menor medida, a corticotropos. En conjunto, nuestros resultados demuestran que la región -7 kb cumple un papel crítico en la expresión corticotrópica y melanotrópica de *Pomc* y posiblemente como facilitador o inhibidor facultativo en neuronas hipotalámicas.

Palabras claves: Proopiomelanocortina, *Enhancer*, Hipófisis, Hipotálamo, Regulación transcripcional, -7 kb, Estrés.

Molecular and functional study of the *Pomc* gene regulation in hypothalamic neurons and pituitary corticotrophs

ABSTRACT

The proopiomelanocortin gene (*POMC*) encodes for a multipeptide precursor that through tissue-specific post-translational processing gives rise to a variety of biologically active hormones and neuropeptides. The precursor is synthesized mainly in pituitary corticotrophs and melanotrophs and in neurons of the arcuate nucleus of the hypothalamus. Differential gene expression in different cell groups depends on specific repertoires of transcription factors that recognise sequences present in diverse transcriptional enhancers. A region has been identified as a transcriptional enhancer of *POMC* in pituitary corticotrophs, located -7 kb from the transcriptional start site of the gene. However, its function in vivo is still unknown. To characterize the functional significance of the -7 kb enhancer in the spatio-temporal expression of *Pomc* in the pituitary and hypothalamus, and its physiological implications, we generated a mutant mouse model deficient in this region, using CRISPR/Cas9 gene editing technology. Firstly, we observed that the -7 kb region acts as an enhancer of *Pomc* in mouse corticotrophs from early development to adulthood. In *Pomc*^{Δ-7/Δ-7} mice, mRNA levels, the number of immunolabeled cells in the anterior lobe of the pituitary and fluorescence intensity were reduced compared to their *Pomc*^{+/+} siblings. Secondly, the mutant mice showed less development of the fasciculated area of the adrenal gland. However, there were no differences in plasma corticosterone levels or in the parameters measured to assess stress. Finally, we observed that, in adult, -7 kb contributes weakly to *Pomc* expression in the hypothalamus. There was a reduction in the number of immune labeled neurons in mutant mice, of both sexes, compared to their control siblings. However, the body weight of these animals was not altered. Our results demonstrate that the -7 kb site of the *Pomc* TSS plays a pivotal role in tissue-specific expression of the gene, acting as a transcriptional enhancer in corticotrophs of the anterior lobe of the pituitary and possibly as a facilitator in hypothalamic neurons.

Keywords: Proopiomelanocortin, Enhancer, Pituitary, Hypothalamus, Transcriptional regulation, -7 kb, Stress.

AGRADECIMIENTOS

A CONICET, por financiar mis estudios todos estos años.

A la Universidad de Buenos Aires por brindarme una excelente formación académica.

A Marcelo, por abrir las puertas de su laboratorio, aceptar dirigir este trabajo y proporcionarme los recursos necesarios para hacerlo. Por sus conocimientos y experiencias transmitidas.

A Lucía, por toda su ayuda y cariño en este proceso. Por sus enseñanzas, consejos y conocimientos compartidos.

A mis compañeros de laboratorio, por toda la ayuda brindada y por estar siempre.

A Agus Villa por sus enseñanzas profesionales y personales, por su dedicación y disposición. Por su enorme generosidad, consejos y abrazos en momentos críticos. Pero, por sobre todo, por convertirme en su amiga.

A Clari, por ayudarme a pensar los proyectos, y enseñarme las técnicas de la mesada y por discutir los resultados conmigo. Pero, principalmente, por ser mi gran compañera de equipo, amiga y hermana por elección. Gracias Clari por convertir cada momento compartido en un recuerdo imborrable.

A Martita, no solo por hacer posible este proyecto con sus manos mágicas sino por cuidarme y querer lo mejor para mí. Por siempre estar, porque la amistad que construimos no entiende de fronteras.

A Dante, por su paciencia para enseñarme a manejar los ratones, por sus clases de histología y PhotoShop y por toda la ayuda brindada. Gracias Dante por estar ahí cada vez que te lo pedí, por ser un excelente compañero y amigo.

A Caro, por regalarme mi primer ratón mutante. Por ser una excelente compañera y amiga. Por sus consejos, por confiar en mí y acompañarme en todo el proceso.

A Lore porque en muy poquito tiempo llenó el laboratorio de luz. Por su alegría y energía joven. Por su predisposición, su escucha activa y sus tan necesarios ¿en qué te puedo ayudar? Gracias a ella porque me enseñó mucho más de lo que yo podía transmitirle.

A Vero, por sus ocurrencias y honestidad. Por darnos una mano no solo con las cosas del labo sino con la tecnología. Pero, en particular, por estar y escucharme cuando se lo pedí.

A Belu, porque si bien fue poco el tiempo que compartimos en el labo siempre estuvo ahí. Por su calidez humana y por toda la ayuda brindada.

A los chicos del laboratorio de Lucía, Elena y Belén por todo el cariño y por todas las experiencias compartidas en estos 5 años.

Al INGEBI. A los investigadores y becarios del instituto, que tantas veces me ayudaron. A Majo, Daniel, Belén, Claudia y Mariano, por su predisposición y ayuda en asuntos contables. A Rubén, Adrián, Norma y Graciela porque con su labor hacen posible que el instituto funcione.

A Gus, por apoyarme y motivarme a emprender este camino. Por jamás dudar de mí y acompañarme con mucho respeto. Gracias Gus por ofrecerme siempre tu ayuda cuando la necesite, por su amor tan cálido y libre. Nada de esto hubiera sido tan fácil y divertido sin vos.

A mi familia, todos mis logros se los debo a ellos. Jamás hubiera llegado tan lejos sin su apoyo incondicional. Gracias por acompañarme mis decisiones, por hacer posible este camino y por estar con mucho amor, respeto y sostén cuando la cosa se puso complicada. Gracias por celebrar de manera sincera este logro conmigo.

A mi mamá y a mi papá porque a su modo siempre me apoyaron y ayudaron a cumplir mis objetivos. Por inculcarme la importancia del trabajo, la constancia y la perseverancia. Por toda la ayuda económica y emocional cuando más lo necesitaba. Pero, por sobre todo gracias por estar siempre y hacerme sentir segura de mis logros.

A mi hermana Bachi, porque fue casa y corazón abierto todos estos años. Por sus sabios consejos, por apoyar mis sueños y ayudarme a lograrlos. Por acompañarme con tanto cariño, por pensar en mí y ser esa hermana mayor que guía.

A mis amigos, por estar siempre con una mano tendida. Por acompañarme, escucharme y regalarme un abrazo cuando lo necesite. Por confiar en mí, por alentarme a seguir adelante y por ser esa magia que me salva de todo siempre.

ABREVIATURAS

AL: Lóbulo anterior de la hipófisis

ACTH: Hormona adrenocorticotrópica

AgRP: Péptido relacionado con la proteína Agouti

ARC: Núcleo arcuato del hipotálamo

mRNA: Ácido ribonucleico mensajero

ATAC seq: Ensayo de cromatina accesible a transposasa con secuenciación

CCK: Colecistoquinina

cDNA: ADN complementario

CLIP: Péptido del lóbulo intermedio semejante a la corticotropina

CRH: Hormona liberadora de corticotropina

DSBs: Corte de doble hebra (del inglés *double strand breaks*)

FST: Prueba de natación forzada (del inglés *Forced Swim Test*)

FT: Factor de Transcripción

GC: Glucocorticoides

GHS: Grelina

GR: Receptor de glucocorticoides

HPA: Eje hipotalámico-hipofisario-adrenal

HYP: Hipotálamo

IL: Lóbulo intermedio de la hipófisis

INDELS: inserciones y/o deleciones

JP: Péptido de unión (del inglés *joining peptide*)

KO: Eliminación de un gen (del inglés *knock out*)

LepR: Receptor de leptina

MCR: Receptor de melanocortinas

MSH: Hormona estimulante de melanocitos

NHEJ: Unión de extremos no homólogos

NL: Lóbulo neural de la hipófisis

NT: Péptido N terminal

nt: Nucleótidos

NTS: Núcleo del tracto solitario

OF: Prueba de campo abierto (del inglés *open field*)

PAM: Motivo adyacente al protoespaciador (del inglés *protospacer adjacent motif*)

PC1 y PC2: Convertasas de prohormonas 1 y 2

PeVN: Núcleo periventricular del hipotálamo

PFA: Paraformaldehído

PIT: Hipófisis

POMC: Proopiomelanocortina

PVN: Núcleo paraventricular del hipotálamo

RNA seq: Secuenciación de moléculas de ARN

sgRNA: Guía única de RNA

SNA: Sistema nervioso autónomo

SNC: Sistema nervioso central

TSS: Sitio de inicio de la transcripción

V3: Tercer ventrículo

WT: Tipo salvaje (del inglés *wild-type*)

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
ABREVIATURAS	5
INTRODUCCIÓN.....	9
El gen <i>POMC</i>	9
Funciones biológicas de los péptidos derivados de <i>POMC</i>	10
Importancia de la expresión de <i>POMC</i> en corticotropos.....	11
El eje HPA y la respuesta al estrés.....	11
Estudio del estrés en modelos animales	13
Rol de los glucocorticoides en la fisiología de los vertebrados.....	14
Enfermedad de Addison y enfermedad de Cushing.....	14
Importancia de la expresión de <i>POMC</i> en el hipotálamo	15
Melanocortinas centrales y regulación de la ingesta alimentaria	16
Regulación de la expresión génica	17
Regulación transcripcional de <i>Pomc</i> en la hipófisis: elementos en <i>cis</i> y <i>trans</i>	19
Regulación transcripcional de <i>Pomc</i> en el hipotálamo	22
Factores de transcripción de la familia T- BOX	24
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	25
HIPÓTESIS.....	25
OBJETIVO GENERAL.....	25
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	26
Historia evolutiva del <i>enhancer</i> -7 kb.....	26
Generación de ratones mutantes deficientes en el <i>enhancer</i> -7 kb del gen <i>Pomc</i>	29
La ausencia del <i>enhancer</i> -7 kb reduce los niveles de expresión de <i>Pomc</i> en corticotropos hipofisarios.....	31
La ausencia del <i>enhancer</i> -7 kb reduce la cantidad de células POMC+ en el lóbulo anterior de la hipófisis en desarrollo	34
Efecto de la ausencia del <i>enhancer</i> -7 kb en células hipofisarias y neuronas hipotalámicas POMC+ en ratones adultos	37
El <i>enhancer</i> -7 kb resulta clave para el desarrollo de la glándula adrenal.....	43
Respuestas conductuales a estresores en ratones deficientes en el <i>enhancer</i> -7kb	45

Análisis espacio-temporal de la expresión de un gen reportero dirigido por el <i>enhancer</i> -7 kb en un modelo de ratón transgénico	51
Análisis de expresión de <i>lacZ</i> en ratones transgénicos -7kb <i>Pomc</i> (x2)- <i>lacZ</i>	54
Análisis de la expresión de <i>lacZ</i> en ratones transgénicos -7kb <i>Pomc-lacZ</i>	57
CONCLUSIONES	61
MATERIALES Y MÉTODOS	62
Animales	62
Ratones en el bioterio	62
Producción de ratones mutantes deficientes en la región -7 kb utilizando la tecnología CRISPR/CAS9	62
Producción de ratones <i>knock-in</i> para la región -7 kb dirigidos al sitio H11, utilizando la tecnología enSERT mediada por CRISPR/CAS9	67
Genotipificación de los ratones producidos por CRISPR/Cas9	72
Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa, con transcripción inversa (RT-qPCR) ..	76
Inmunofluorescencia	79
Tinción de X-gal	81
Inmunohistoquímica de embriones, hipotálamos e hipófisis de ratón	82
Medición de glucocorticoides en plasma	83
Batería de pruebas conductuales	83
Prueba de campo abierto (<i>Open field</i>)	84
Prueba de inmovilización (<i>Restraint test</i>)	84
Prueba de la natación forzada (<i>Forced swim test</i>)	85
Análisis histológico de la glándula suprarrenal	85
BIBLIOGRAFÍA	86

INTRODUCCIÓN

El gen *POMC*

El gen de proopiomelanocortina (*POMC*) codifica un precursor polipeptídico de 241 aa que a través de un complejo procesamiento post traduccional tejido específico da lugar a una variedad de hormonas y neuropéptidos biológicamente activos. En humanos, *POMC* se encuentra localizado en el cromosoma 2 (2p23.3) y tiene una unidad transcripcional de 8051 pb cuyo tamaño y organización estructural se encuentra muy conservada entre diferentes especies de mamíferos, incluido el ratón. La estructura del gen está compuesta por 3 exones separados por 2 intrones. El exón 1 (87 pb) contiene secuencias no codificantes, el exón 2 (152 pb) codifica para el péptido señal y para los primeros aminoácidos del péptido N terminal (NT) y el exón 3 (833 pb) codifica el péptido de unión (JP) y las hormonas y neuropéptidos biológicamente activos como la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), las hormonas estimulantes de melanocitos α , β , γ (MSH) y la β -endorfina (Chang *et al.*, 1980; Drouin & Goodman, 1980) (Figura 1).

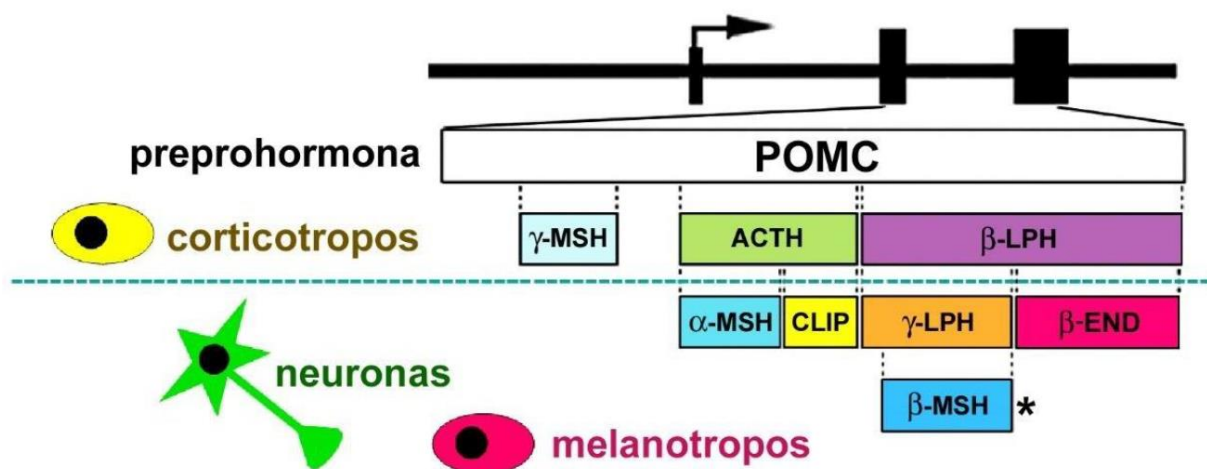


Figura 1. Esquema del gen, la prohormona y los péptidos funcionales de POMC. Arriba, con rectángulos negros se representan los 3 exones. Abajo, en rectángulos de colores los péptidos biológicamente activos derivados del procesamiento post-traduccional tejido-específico, dependiente de PC1 en corticotropos y PC1 y PC2 en melanotropos y neuronas.

POMC se expresa en altos niveles en la glándula hipofisaria, particularmente en dos tipos celulares relacionados: corticotropos presentes en el lóbulo anterior (AL) y melanotropos del lóbulo intermedio (IL). Además, se expresa en dos grupos de neuronas del sistema nervioso central (SNC), el núcleo arcuato del hipotálamo (ARC) y el núcleo del tracto solitario (NTS) del tronco encefálico. Por otro lado, se ha detectado mRNA de *POMC* en menores niveles en

varios tejidos periféricos como los melanocitos y queratinocitos cutáneos, los tractos génito-urinario y gastrointestinal, las glándulas suprarrenal y tiroides, el sistema inmune, la placenta y los pulmones (Cone, 2005; Smith & Funder, 1988).

Una vez sintetizada la preprohormona de 241 aminoácidos, POMC, alcanza el lumen del retículo endoplasmático rugoso y sigue el tráfico intracelular a través del aparato de Golgi hasta alcanzar los gránulos secretorios donde los productos finales del procesamiento son almacenados antes de ser secretados por exocitosis. Durante este tráfico, la prohormona es procesada por las endopeptidasas PC1 y PC2 y otras enzimas que introducen distintos tipos de modificaciones post-traduccionales como por ejemplo glicosilaciones, amidaciones, fosforilaciones, acetilaciones y sulfataciones, muchas de las cuales son específicas de cada célula y necesarias para el funcionamiento de los diferentes péptidos biológicamente activos. En corticotropos, PC1 genera los péptidos γ -MSH, ACTH y β -LPH. En el SNC la presencia de PC1 y PC2 da origen a γ -MSH, α -MSH, β -MSH, CLIP (péptido del lóbulo intermedio semejante a la corticotropina), y las β -endorfinas $_{1-27}$ y $_{1-31}$ (**Figura 1**).

Funciones biológicas de los péptidos derivados de POMC

Las melanocortinas son un grupo de pequeñas hormonas peptídicas (de 10 a 21 aa) cuya acción está mediada por una familia de 5 receptores acoplados a proteínas G conocidos como receptores de melanocortinas (MCRs).

La ACTH liberada por los corticotropos hipofisarios se une a los receptores de melanocortinas 2 (MC2R) presentes en la zona fasciculada de la corteza suprarrenal induciendo la síntesis y liberación de glucocorticoides (GC). En el cerebro, las melanocortinas inducen saciedad y aumento del gasto metabólico al unirse a los receptores de melanocortinas 3 y 4 (MC3R y MC4R) presentes en el SNC (Fan *et al.*, 1997; Rubinstein y Low, 2017). Por su parte, las β -endorfinas activan receptores opioides acoplados a proteínas G, preferentemente el receptor μ , y tienen un papel euforizante y propiedades analgésicas aumentando el umbral al dolor en situaciones de estrés (Rubinstein *et al.*, 1996). Por otra parte, la producción de ACTH y α -MSH en melanocitos, queratinocitos y células endoteliales de la dermis en humanos participan en la pigmentación de la piel y el pelo al unirse a los receptores de melanocortinas 1 (MC1R) (Schauer *et al.*, 1994; Scholzen *et al.*, 1999; Wintzen *et al.*, 1996). Por último, la activación del

receptor de melanocortinas 5 (MC5R) regula la secreción exocrina en distintos órganos periféricos (Chhajlani, 1996; Chen *et al.*, 1997).

Desde el punto de vista ontológico, la producción estequiométrica de los péptidos de POMC con actividades biológicas tan diversas, sugiere que POMC provee a los vertebrados un *kit* fisiológico de respuestas al estrés, capaz de integrar simultáneamente una variedad de mecanismos que aumentan la probabilidad de sobrevivir ante situaciones de ataque, pelea, huida, falta de disponibilidad de alimento o alta exposición al sol, al menos por un período corto de tiempo (Watson *et al.*, 1978; Leistner y Menke, 2020). La importancia fisiológica de POMC resultó evidente al estudiar ratones mutantes deficientes en POMC (Yaswen *et al.*, 1999) que presentaron insuficiencia suprarrenal, obesidad extrema y pigmentación alterada. Fenotipo similar al descrito en aquellos humanos con mutaciones bialélicas nulas en el gen de POMC (Krude *et al.*, 1998). Debido al rol fundamental que tiene la expresión de *Pomc* en la fisiología y supervivencia animal, nos enfocaremos en conocer los mecanismos moleculares que permiten la expresión de este gen en AL de la hipófisis y en el hipotálamo.

Importancia de la expresión de *POMC* en corticotropos

Entre los péptidos derivados de POMC se encuentra ACTH una de las hormonas más estudiadas debido a su implicancia en el eje hipotalámico - hipofisario – adrenal (HPA) y, por ende, en las funciones fisiológicas reguladas por él tales como la respuesta al estrés, el balance energético y el metabolismo corporal.

El eje HPA y la respuesta al estrés

El estudio del estrés ha recibido gran interés debido a su impacto en la salud física y mental de las personas. Comúnmente, se define al estrés como un estado de amenaza, real o percibido, al equilibrio homeostático y que puede poner en riesgo el bienestar y la salud de un organismo. Frente a un estresor, un individuo responde mediante una serie de reacciones fisiológicas coordinadas que suponen la activación de tres sistemas que interactúan armónicamente: el sistema nervioso autónomo (SNA), el eje HPA y el sistema inmunitario (Jurueña *et al.*, 2020; Joseph y Whirledge., 2017). Frente a una amenaza, el SNA puede realizar modificaciones rápidas en algunas funciones viscerales tales como aumentar la frecuencia

cardíaca y respiratoria e inhibir otros procesos fisiológicos no esenciales a corto plazo, como ser el sistema digestivo, y que suponen un alto costo energético (Chrousos y Gold, 1992), favoreciendo así la movilización de reservas energéticas del cuerpo al cerebro, el corazón y músculos, preparando al individuo para eficientizar respuestas de lucha o huida (Kandel et al. 2001).

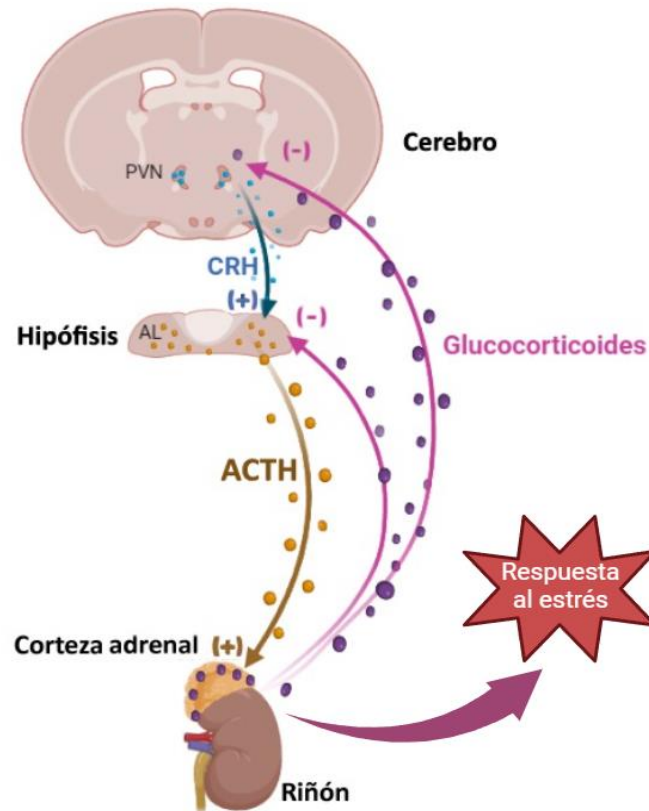


Figura 2. Esquema del eje hipotalámico – hipofisario – adrenal (HPA). Los círculos de colores indican las moléculas de CRH (azul), ACTH (marrón) y corticosterona (morado) y con flechas su trayectoria. **PVN:** Núcleo paraventricular del hipotálamo. **AL:** Lóbulo anterior de la hipófisis. **(-)** Retroalimentación negativa ejercida por glucocorticoides sobre el PVN y AL. **(+)** Activación hormonal.

Simultáneamente, el eje HPA también se activa ante un evento estresante. Las estructuras límbicas estimulan a las neuronas parvocelulares del núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN) que expresan el gen de la hormona liberadora de corticotropina (CRH). Esta hormona es liberada en los vasos portales y llega a la hipófisis anterior. Allí, los corticotropos expresan el gen del receptor de CRH el cual al unirse a la CRH hipotalámica activa la transcripción del gen *POMC*, estimulando a su vez la síntesis y liberación de ACTH al flujo sanguíneo sistémico. A su vez, ACTH se une a receptores MC2R en la glándula suprarrenal y activa la síntesis de GC a partir del colesterol. Los GC viajan a través del torrente sanguíneo y difunden libremente a

las células atravesando la membrana plasmática y nuclear donde activan a sus receptores específicos (GR), pertenecientes a la superfamilia de factores de transcripción dependientes de ligandos. Por otra parte, los GC también regulan al propio eje HPA a través de sistemas de retroalimentación negativa que inhiben la síntesis y liberación de CRH y ACTH en las neuronas del PVN y corticotropos hipofisarios, respectivamente (Busada y Cidlowski, 2017; Zimprich *et al.*, 2014) (**Figura 2**). Además, la unión de GC a los GR ubicados en neuronas GABAérgicas del hipocampo que proyectan al PVN inhiben al eje HPA a través de una segunda vía.

El funcionamiento del eje HPA es vital para el organismo ya que grandes desviaciones de los puntos de equilibrio homeostáticos pueden disparar consecuencias devastadoras para la salud, como los que existen por ejemplo en casos de depresión severa, trastornos de ansiedad y síndrome de Cushing (Zimprich *et al.*, 2014).

Estudio del estrés en modelos animales

Existen varios modelos de estrés fisiológico para ratones de laboratorio capaces de mimetizar parcialmente cambios conductuales y fisiológicos que se observan en humanos. Según el tipo de estresor elegido, la intensidad del estímulo y el tiempo que se lo aplica, las respuestas tienden a ser diferentes. Por lo general, las respuestas al estrés involucran ajustes homeostáticos y manifestaciones conductuales relacionadas con estados de ansiedad y alteraciones en el comportamiento social (Atrooz *et al.*, 2021; Zimprich *et al.*, 2014).

La metodología tradicional para evaluar estrés en ratones consiste en medir los niveles circulantes de corticosterona obtenidos en reposo y luego del evento estresante. Más recientemente se establecieron pautas para determinar distintos niveles de estrés de manera no invasiva, a partir de la evaluación de conductas relacionadas con ansiedad (*anxiety-like behaviour*) caracterizadas por un aumento de la vigilancia y la evitación de objetos o situaciones novedosas, incluso en ausencia de peligros o riesgos reales (Zimprich *et al.*, 2014). Existen mecanismos neuroquímicos comunes durante la exposición a un estresor y los implicados durante un proceso de ansiedad. Es por eso que resulta de interés evaluar los niveles de ansiedad en modelos de estrés como, por ejemplo, los *tests* de conflicto aproximación/evitación en los que se expone a los ratones a un entorno nuevo, que inicia episodios simultáneos de hipervigilancia y curiosidad, creando respuestas conductuales similares a las presentes en humanos con trastornos de ansiedad. Dos ejemplos

paradigmáticos de test conductuales donde medir la resolución de conflictos aproximación vs. evitación utilizados comúnmente en ratones de laboratorio son la prueba de campo abierto (OF) (utilizado en esta tesis doctoral) y el laberinto elevado en cruz.

Las situaciones de estrés severo y persistente pueden generar trastornos depresivos, caracterizados por pérdida de interés, curiosidad y aislamiento social. La evaluación de este tipo de conductas (depression-like behavior) incluyen el desinterés por búsqueda de recompensas, y patrones conductuales pasivos ante situaciones, objetos o individuos que constituyen una novedad ambiental (Atrooz *et al.*, 2021; Czéh *et al.*, 2016) los cuales pueden ser evaluados en la prueba de natación forzada (FST por *forced swim test* en inglés) que utilizamos en esta tesis (Atrooz *et al.*, 2021).

Rol de los glucocorticoides en la fisiología de los vertebrados

El cortisol en humanos y la corticosterona en ratones son hormonas esteroideas sintetizadas en la zona fascicular de la corteza de la glándula suprarrenal y liberadas como respuesta a estímulos estresantes. En condiciones normales los GC se liberan de manera circadiana siendo su cénit durante el ciclo de actividad y su nadir en el reposo profundo (Busada *et al.*, 2017; Miller *et al.*, 2018). La importancia fisiológica de los GC se manifiesta no sólo en la respuesta al estrés sino también en otros procesos biológicos cruciales en la vida animal como la regulación del metabolismo energético, el gasto cardíaco, la inflamación y la inmunidad. Los GC séricos aumentan drásticamente en las últimas semanas del embarazo y llegan al feto a través de la placenta jugando un rol fundamental en la maduración de los pulmones del recién nacido (Busada *et al.*, 2017).

En esta Tesis Doctoral estudiamos un *enhancer* transcripcional de *POMC* potencialmente implicado en el funcionamiento del eje HPA y de los GC en la vida animal.

Enfermedad de Addison y enfermedad de Cushing

La deficiencia o exceso de GC circulante originan trastornos patofisiológicos en el organismo. Una de las causas más frecuentes de insuficiencia adrenal primaria es la enfermedad de Addison, un trastorno autoinmune cuyos síntomas suelen desarrollarse de manera lenta y progresiva debido a la destrucción bilateral de la corteza suprarrenal causando insuficiencia

de hormonas esteroideas (Mitchell y Pearce, 2012; Candel González *et al.*, 2001). Sin embargo, la alta capacidad de producción y reserva funcional de GC por el tejido adrenal remanente hace que la sintomatología en esta enfermedad sólo se manifieste luego de la pérdida de al menos un 90% del tejido adrenal, momento a partir del cual la glándula remanente no consigue satisfacer las necesidades periféricas ante situaciones de estrés (Narváez-Casillas *et al.*, 2012). La insuficiencia adrenal secundaria se produce cuando la hipófisis no produce suficiente ACTH y por ende las glándulas adrenales no sintetizan suficientes GC pudiendo encogerse y dejar de funcionar con el tiempo. Finalmente, la insuficiencia adrenal terciaria ocurre cuando el hipotálamo no produce cantidades suficientes de CRH, lo cual conlleva a que la hipófisis produzca menos ACTH y consecuentemente se libere menos cortisol (Chabre *et al.*, 2017). De manera contraria, la enfermedad de Cushing cursa con un exceso de cortisol circulante causado por tumores hipofisarios benignos o extra hipofisarios productores de ACTH (Tritos y Biller, 2014).

Importancia de la expresión de *POMC* en el hipotálamo

El balance energético en mamíferos está regulado por mecanismos homeostáticos especializados en censar el gasto calórico realizado a través de la actividad física, el metabolismo basal y la termogénesis, y en recuperarlo a través de la energía química presente en los alimentos. También existen mecanismos alostáticos que anticipan necesidades nutricionales futuras permitiendo sobrecargas alimentarias durante períodos de alta tasa de demanda como ser los períodos de crecimiento corporal, la preñez y la lactancia o en las semanas previas a períodos de hibernación y migración. El control de la ingesta alimentaria depende de la activación de mecanismos anorexígenos (saciatorios) y orexígenos presentes en el SNC que son regulados por señales periféricas del tracto gastrointestinal y el tejido adiposo que, en su conjunto, permiten mantener una ingesta y gasto calórico diario relativamente constante durante largos períodos de tiempo, incluso en condiciones de abundancia de alimento. El sistema de melanocortinas central cumple un papel fundamental en el balance energético ya que es el punto de convergencia entre señales periféricas que indican el estado metabólico del organismo y circuitos neuronales que regulan la ingesta de alimentos y el gasto calórico (de Souza *et al.*, 2005).

Melanocortinas centrales y regulación de la ingesta alimentaria

En el ARC del hipotálamo coexisten dos grupos de neuronas funcionalmente antagónicas que presentan conexiones anatómicas recíprocas y proyecciones convergentes sobre neuronas del PVN que expresan receptores de melanocortinas 3 y 4 (**Figura 3**). Uno de estos grupos de neuronas expresa *POMC* y libera las melanocortinas α -, β - y γ -MSH que inducen saciedad alimentaria al estimular receptores MCR3 y MC4R en neuronas del PVN. El otro grupo de neuronas expresa los genes *AgRP* y *NPY*, cuyos productos peptídicos promueven la ingesta de alimentos. AGRP, en particular, es un neuropéptido que actúa como antagonista de las melanocortinas bloqueando de manera reversible a MC4R y MC3R. Así, mientras las melanocortinas inhiben la ingesta alimentaria e inducen el gasto energético, la liberación de AGRP produce el efecto contrario (Krashes *et al.*, 2016). Las neuronas hipotalámicas de POMC y AGRP censan señales aferentes periféricas a través de receptores de leptina (LepR), insulina (IR), grelina (GHSR), serotonina (5-HT_{2C}R) y canales de K_{ATP} sensibles a glucosa (Cheung *et al.*, 1997; Cowley *et al.*, 2003; Hill *et al.*, 2010) que reportan el estado energético y metabólico del organismo (**Figura 3**). Al igual que en humanos, en roedores la alimentación no es constante a lo largo del día, sino que ocurre en eventos discretos conocidos como comidas. El consumo diario total, la duración de cada comida y los intervalos entre comidas están regulados por múltiples señales periféricas que comunican al cerebro el estado energético en el que se encuentra el organismo. Dos hormonas fundamentales en esta señalización son la leptina y la insulina. Los niveles circulantes de leptina reportan a las neuronas de POMC y AGRP información acerca de las reservas lipídicas del organismo acumuladas en el tejido adiposo y, por lo tanto, del estado general de reservas energéticas. La leptina activa sus receptores expresados en las neuronas hipotalámicas de POMC (Cowley *et al.*, 2001) induciendo la liberación de α -MSH, mientras que en las neuronas de AGRP la leptina ejerce un efecto inhibitorio. De forma similar, la insulina secretada por las células β de los islotes pancreáticos reporta al cerebro acerca del metabolismo de la glucosa, reduciendo la ingesta alimentaria mediante la activación de la expresión de *POMC* y la inhibición de *AgRP* (Benoit *et al.*, 2002; Könner *et al.*, 2007; Woods *et al.*, 2006) (**Figura 3**).

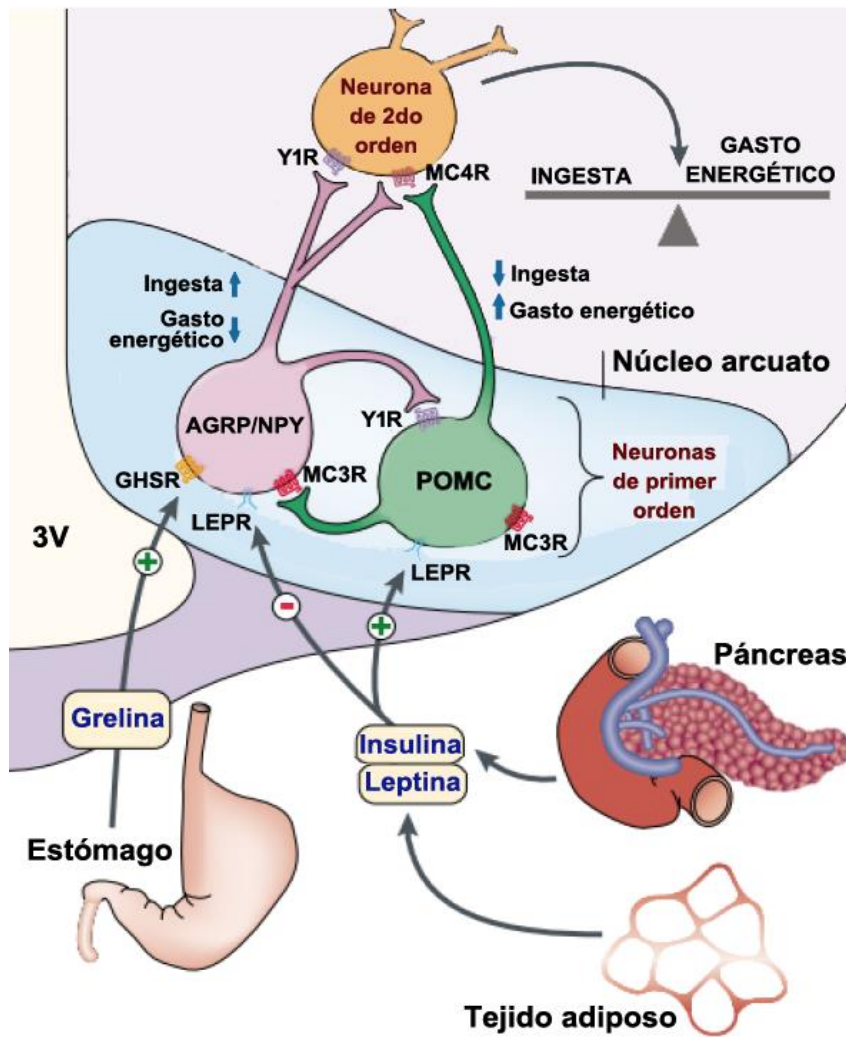


Figura 3. Esquema del circuito central de melanocortinas. Señales saciatorias de corto y largo término provenientes del tejido gastrointestinal, páncreas y tejido adiposo interaccionan con los circuitos centrales que regulan la ingesta de alimento. Las neuronas de POMC y de AGRP/NPY en el ARC censan variaciones en los niveles de leptina, insulina y grelina. Los neuropéptidos AGRP y NPY estimulan la ingesta y disminuyen el gasto energético, mientras que las melanocortinas inhiben la ingesta y aumentan el gasto energético. Adaptado de Barsh & Schwartz, 2002.

Regulación de la expresión génica

Si bien todas las células de un organismo multicelular contienen la misma información genética, en cada tipo celular se activa un conjunto distintivo de genes promoviendo la síntesis y acumulación de repertorios moleculares únicos que le confieren a cada tipo celular morfologías, conexiones y funciones especializadas. Debido a la importancia de la regulación célula-específica de la transcripción génica para el correcto desarrollo embrionario y la fisiología, el estudio de los códigos transcripcionales que operan en cada tipo celular y determinan su transcriptoma y capacidades funcionales distintivas se ha convertido en un

tema de gran interés para la biología y la genética molecular en las últimas décadas. La expresión génica está regulada por la acción precisa y concertada de un conjunto de elementos reguladores que participan en *cis*, incluyendo al promotor -región del gen vecina al sitio de inicio de la transcripción (TSS) capaz de reclutar al complejo mayor de la ARN polimerasa II-, y otros elementos proximales y distales al promotor como *enhancers*, *silencers*, *insulators* y *tethering elements* (Cramer, 2019). Los *enhancers* son regiones de ADN de 100-2000 pb que contienen múltiples secuencias cortas de 6-12 pb capaces de reclutar factores de transcripción (FTs) que actúan en *trans* de manera específica. Las combinaciones *cis/trans* únicas determinan la identidad transcripcional de un tipo celular en particular y, en consecuencia, sus características morfológicas y funcionales (ej. hepatocitos, adipocitos, fotorreceptores). Existen también *enhancers* “pleiotrópicos” que activan genes en más de un único contexto espacio-temporal (Sabarís *et al.*, 2019). Estudios recientes indican que aproximadamente el 75% de este tipo de *enhancers* regula la transcripción de un mismo gen en sólo 2 o 3 tejidos, el 24% en 4 a 20 tejidos y sólo el 0.4% tiene una función ubicua regulando la transcripción génica en más de 20 tejidos (Singh y Yi, 2021).

El término super *enhancer* (SE) se utiliza para describir a un conjunto de *enhancers* capaces de reclutar grandes cantidades de FTs y coactivadores transcripcionales como ser *Mediator*. Potencian la expresión de genes que son claves para la identidad celular y con frecuencia se encuentran mutados en las enfermedades genéticas. (Hnisz *et al.*, 2013; Blayney *et al.*, 2023). Un SE está constituido por *enhancers* clásicos y por facilitadores. Los facilitadores son regiones de cromatina abierta que reclutan FTs y contribuyen a elevar los niveles de expresión del gen que regulan pero carecen de actividad potenciadora intrínseca (Blayney *et al.*, 2023). Su presencia es fundamental en los SE ya que, sin ellos, los *enhancers* “clásicos” presentes en un SE no logran regular completamente a sus genes diana debido a una disminución en el reclutamiento de *Mediator* (Blayney *et al.*, 2023).

La participación de los *enhancers* en la expresión célula-específica de genes ha sido objeto en los últimos años de una nutrida gama de investigaciones y revisiones (Spitz y Furlong, 2012; Zabidi *et al.*, 2016). Se estima que el conjunto de elementos regulatorios que actúan en *cis* representa ~10% del genoma humano, una fracción considerablemente mayor al 2-3% de las secuencias codificantes. Por lo tanto, no sorprende que gran parte de los estudios poblacionales de asociación fenotipo/genotipo entre enfermedades humanas y variantes polimórficas presentes en los genomas (GWAS) detecten regiones distintivas en intrones o

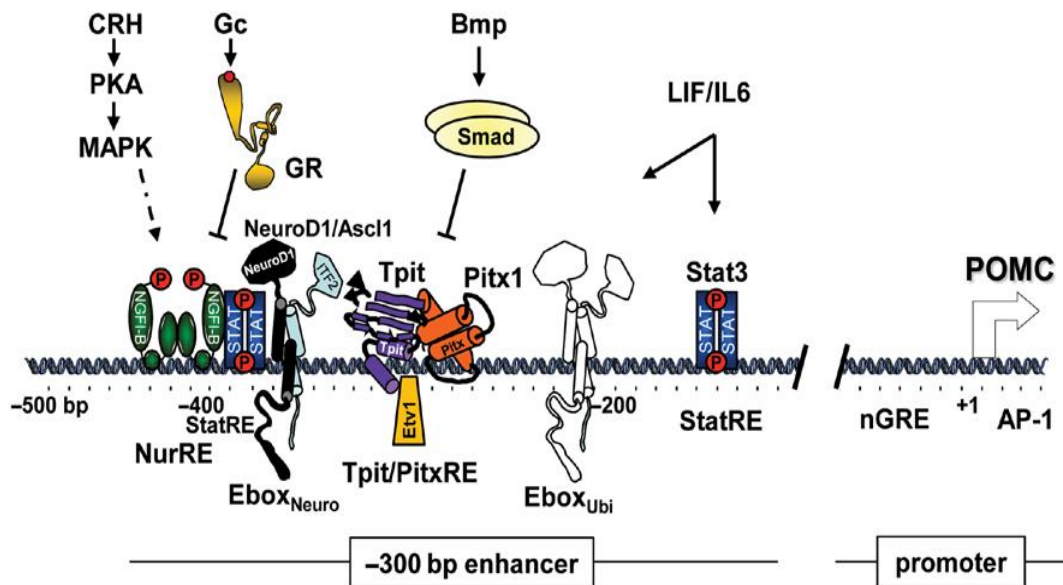
regiones intergénicas. La existencia de variantes polimórficas en regiones regulatorias no codificantes puede tener un efecto funcional decisivo sobre los niveles transcripcionales del gen que controlan e incluso inducir patrones espacio-temporales de expresión aberrantes con consecuencias fenotípicas evidentes y muchas veces perjudiciales para la salud. Las patologías debidas a mutaciones en *enhancers* transcripcionales han recibido el nombre de *enhanceropatías* (Smith y Shilatifard, 2014).

Regulación transcripcional de *Pomc* en la hipófisis: elementos en *cis* y *trans*

El gen *POMC* tiene la característica única de expresarse en dos linajes hipofisarios diferentes: corticotropos presentes en el AL y melanotropos en el IL. La diferenciación inicial de ambos grupos celulares depende del factor de transcripción de la familia T-box TBX19, también conocido como TPIT (Lamolet *et al.*, 2001). TBX19 activa la expresión de *Pomc* en distintos momentos del desarrollo embrionario de la hipófisis de ratón: E12.5 en corticotropos y E15.5 en melanotropos (Budry *et al.* 2012). Si bien los corticotropos y melanotropos hipofisarios tienen un origen embriológico común, la regulación transcripcional de *Pomc* y el procesamiento del precursor polipeptídico POMC presentan rasgos distintivos en estos dos tipos celulares (Rubinstein y Low, 2017; Langlais *et al.* 2011). Varios trabajos demostraron que la regulación de la expresión de *Pomc* en la hipófisis depende de la región 5' proximal al promotor, que en el ratón se extiende desde el nucleótido -480 hasta el -130 tomando al TSS como el nucleótido +1. Esta región de ~350 pb contiene sitios de unión para múltiples FT entre los que se destacan Nurr77, SP1 y los heterodímeros TBX19/PITX1 y NeuroD1/BETA2 (Drouin JME, 2016; Cawley *et al.*, 2016; **Figura 4A**). Al ser testeado en ratones transgénicos, este fragmento proximal de *Pomc* dirige la expresión de genes reporteros específicamente a melanotropos y corticotropos hipofisarios, con mayores niveles de expresión en los primeros que en los segundos (Rubinstein *et al.*, 1993), sugiriendo la existencia de al menos un *enhancer* distal adicional en la regulación de la expresión corticotrópica de *Pomc*. Efectivamente, una región genómica con estas características fue identificada fortuitamente por el grupo de Jacques Drouin (Universidad de Montreal, Canadá) durante la búsqueda de sitios de unión a STAT3 en el *locus* de *Pomc* mediante ensayos de ChIP-seq en la línea celular corticotrópica de ratón AtT20 (Langlais *et al.*, 2011). Estos experimentos revelaron que pSTAT3 se une fuertemente a una región ubicada a 7 kb río arriba del TSS de *Pomc* contenida,

a su vez, dentro de un fragmento de ~900 pb cuya secuencia resultó estar muy conservada en genomas de mamíferos placentarios (Langlais *et al.*, 2011). Experimentos de ChIP posteriores revelaron que esta misma región recluta varios FTs presentes en células AtT20 y que participan de la regulación transcripcional hipofisaria de *Pomc* como TPIT (TBX19), STAT3, NURR1, NEUROD1 y GR (Langlais *et al.*, 2011; Drouin, JME, 2016; **Figura 4B**).

A The rat/mouse POMC -300 bp enhancer and promoter



B Mouse -7 kb POMC enhancer - predicted TFBS

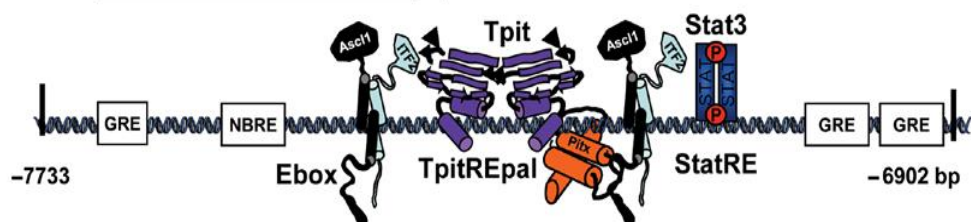


Figura 4. Promotor e enhancer -7kb del gen *Pomc* y factores de transcripción asociados en la hipófisis. Representación esquemática del promotor y *enhancers*, sitios de unión de factores de transcripción (TFBS) predichos y factores de transcripción conocidos que regulan la transcripción de *Pomc* en la hipófisis. (A) Promotor/enhancer -300bp (B) Enhancer -7 kb. Los factores de transcripción están representados por pictogramas. Figura tomada de Langlais *et al.*, 2011

Ensayos de expresión en células AtT20 demostraron que este fragmento distal al promotor potencia la actividad de la enzima reportera luciferasa, indicando que podría tratarse de un *enhancer* transcripcional de *Pomc* en corticotropos (Langlais *et al.*, 2011; **Figura 5**).

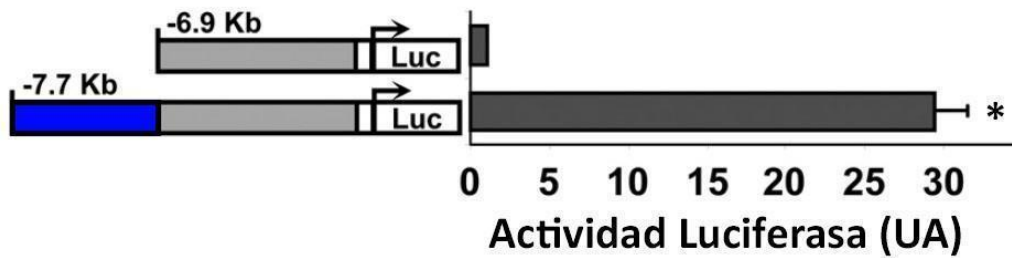


Figura 5. La región ubicada -7 kb río arriba del TSS de *Pomc* de ratón funciona como un *enhancer* transcripcional en células corticotrópicas de ratón AtT20. (Adaptada de Langlais *et al.*, 2011).

Dentro de esta región se destaca una T-BOX canónica muy conservada cuya secuencia palindrómica sugiere fuertemente la unión de TBX19, hipótesis confirmada experimentalmente en estudios de ChIP utilizando un anticuerpo anti TPIT y cromatina aislada de células AtT20 previamente fijadas con formaldehído (Langlais *et al.*, 2011). La caracterización funcional de la T-BOX presente en el *enhancer* -7kb de *Pomc* realizada en ensayos de expresión en células AtT20 con distintas variantes mutadas demostró que ambas porciones de la T-BOX palindrómica resultan esenciales (**Figura 6**).

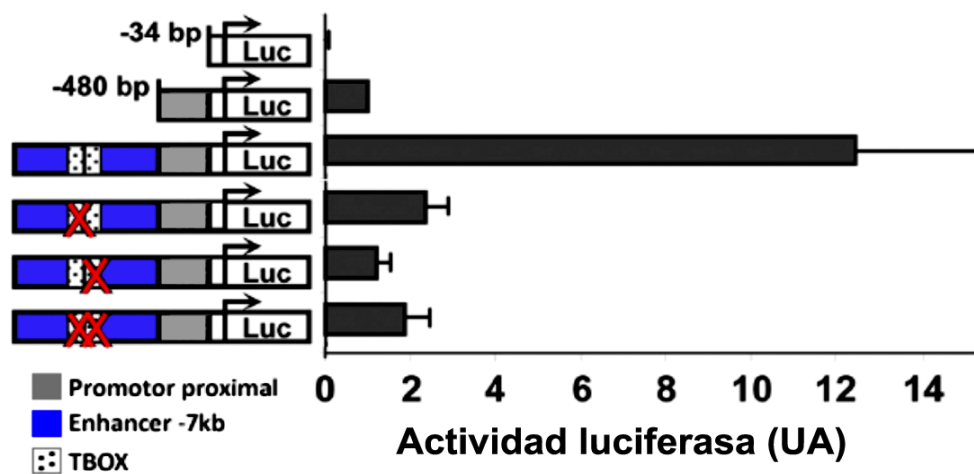


Figura 6. Importancia funcional de la T-BOX presente en el *enhancer* -7 kb del *locus* de *Pomc*. Actividad del reportero luciferasa estimulada por diferentes construcciones transfectadas en células AtT20. La X roja sobre los hemi-recuadros T-BOX indican mutaciones de uno o ambos hemi-sitios del palíndromo. Imagen adaptada de Langlais *et al.*, 2011.

En este mismo trabajo, el grupo de Drouin determinó que la región conservada -7kb también actúa como un *enhancer* transcripcional específico cuando es testado en ratones transgénicos, al dirigir selectivamente la expresión del gen reportero LacZ a corticotropos y melanotropos hipofisarios en embriones F0 analizados en el día E17.5 (**Figura 7**; Langlais *et al.*, 2011). Un análisis comparativo preliminar sugirió que la presencia del *enhancer* -7kb en el transgén aumenta la expresión relativa en corticotropos de embriones de E17.5 (Langlais *et al.*, 2011).

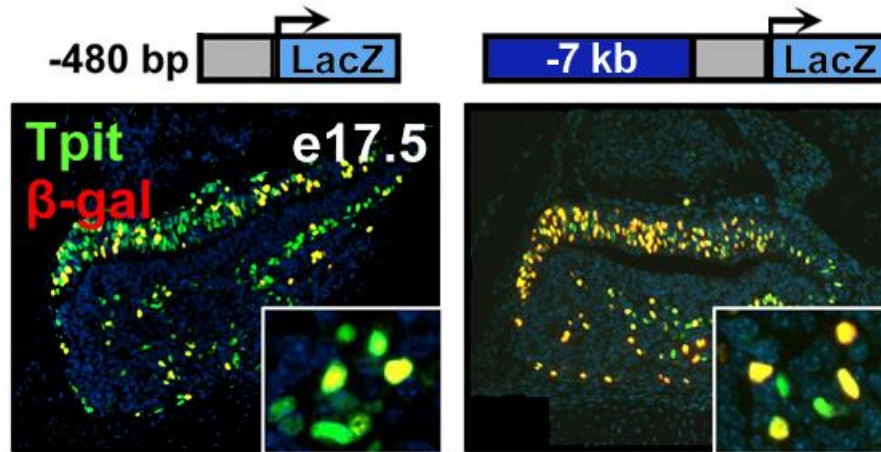


Figura 7. El *enhancer* -7 kb dirige expresión del reportero LacZ a corticotropos y melanotropos hipofisarios en embriones F0 transgénicos analizados en E17.5. Inmunofluorescencia doble para Tpit (verde) y β -gal (rojo), en amarillo se representa la colocalización de ambas señales. Imagen adaptada de Langlais *et al.*, 2011.

A pesar de la extensa caracterización de la región -7 kb de *Pomc* en células AtT20 (Langlais *et al.*, 2011), aún se desconoce la importancia funcional de este *enhancer in vivo* y su contribución relativa en la expresión de *Pomc* en corticotropos y melanotropos, aspectos que nos propusimos estudiar en esta Tesis Doctoral.

Regulación transcripcional de *Pomc* en el hipotálamo

En el laboratorio dirigido por el Dr. Marcelo Rubinstein se han identificado y caracterizado elementos fundamentales que participan en la regulación transcripcional de *Pomc* en neuronas hipotalámicas entre los que se destacan tres *enhancers* distales ubicados 10, 12 y 18 kb río arriba del TSS, y que fueron denominados nPE2, nPE1 y nPE3 respectivamente (de Souza *et al.*, 2005; Rojo *et al.*, 2024). Estos elementos regulatorios se encuentran altamente conservados en mamíferos placentarios (nPE2 incluso está presente en monotremados y marsupiales) pero ausentes en otras clases de vertebrados. Estos tres *enhancers* neuronal de *POMC* evolucionaron independientemente a partir de inserciones de retroposones de distintos tipos que, tras adquirir mutaciones adaptativas, se fijaron río arriba de la unidad transcripcional de *Pomc* entre 300 y 90 millones de años atrás (Franchini *et al.*, 2011; Rojo *et al.*, 2024). Estudios genéticos y funcionales realizados en ratones mutantes de nPE1 y/o nPE2 demostraron que ambos *enhancers* son parcialmente redundantes y que sólo su eliminación simultánea del genoma elimina casi totalmente la expresión hipotalámica de *Pomc*.

induciendo hiperfagia y obesidad extrema temprana (Lam *et al.*, 2015). Años más tarde, se descubrió que nPE3 también actúa como *enhancer* transcripcional de *Pomc* en el hipotálamo principalmente durante el desarrollo embrionario, y que la ausencia simultánea de los 3 *enhancers* del genoma del ratón produce una reducción prácticamente total en los niveles de mRNA de *Pomc* y sus productos peptídicos resultaron indetectables por inmunofluorescencia (Rojo *et al.*, 2024). Este mismo laboratorio también descubrió que los FT ISL1 (Nasif *et al.*, 2015), NKX2.1 (Orquera *et al.*, 2019) y PRDM12 (Hael *et al.*, 2020) resultan críticos para especificar la identidad de las neuronas de melanocortinas y mantener niveles de expresión fisiológicos de *Pomc* en ratones adultos, ya que la ausencia de cualquiera de estos FT en neuronas de POMC disminuye los niveles hipotalámicos del RNAm de *Pomc* generando un aumento en el peso corporal y la adiposidad (Nasif *et al.* 2015, Orquera *et al.* 2019, Hael *et al.* 2020) (Figura 8).

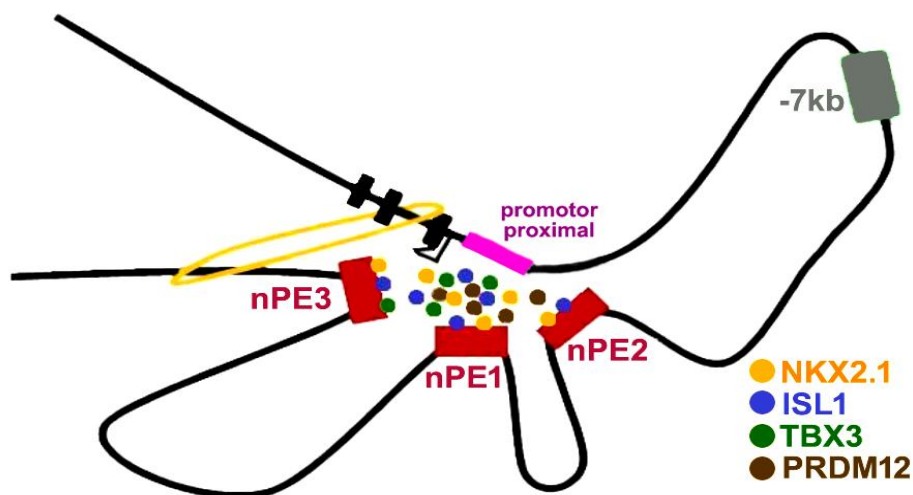


Figura 8. Esquema de organización del locus de *Pomc* de ratón activo en neuronas hipotalámicas. Un módulo regulatorio compuesto por 3 *enhancers* distales (nPE3, nPE1 y nPE2) actúa cooperativamente para inducir la transcripción hipotalámica de *Pomc* a través del reclutamiento de FTs específicos que interaccionan con el promotor proximal. En este modelo, el *enhancer* distal -7 kb actúa en el control de la expresión hipofisaria de *Pomc* reclutando FTs específicos.

En 2019 se reportó que el FT TBX3 también controla la expresión hipotalámica de *Pomc* y que ratones mutantes deficientes en *Tbx3* presentan bajos niveles de RNAm de *Pomc*, desarrollando hiperfagia y obesidad (Quarta *et al.*, 2019). Si bien se desconocen los sitios de unión de TBX3 en el locus de *Pomc* es muy probable que actúe reconociendo posibles motivos T-BOX presentes en los *enhancers* neuronales de *Pomc* o que utilice la T-BOX presente en el *enhancer* -7 kb.

Factores de transcripción de la familia T- BOX

Las proteínas T-box son FT caracterizados por tener un dominio de unión al ADN conocido como dominio T de 180 a 200 aminoácidos que se une de manera específica a secuencias T-BOX de motivo canónico **5'-TCACACCT-3'**. Esta secuencia se presenta de manera simple cuando un FT T-box forma heterodímeros o repetida invertida (palindrómica) al ser reconocida por un homodímero (Wilson y Conlon, 2002; Langlais *et al.*, 2011). Los FT de la familia T-box participan de la determinación de la identidad funcional de tipos celulares y órganos, y pueden funcionar como represores o activadores transcripcionales dependiendo de las interacciones que el dominio C-terminal tenga con el complejo transcripcional mayor de cada gen que regulan (Wilson y Conlon, 2002; Papaioannou, 2014). Hasta el momento se han descrito 18 FTs pertenecientes a esta familia siendo el miembro fundador y más paradigmático de la familia el factor T o TBXT, también conocido como Brachyury, cola corta en griego, debido a que mutantes de este gen presentan cola corta o simplemente ausencia de cola (Sebé-Pedrós *et al.*, 2013). TBX19 y TBX3 son miembros de esta familia que desempeñan papeles claves en la regulación transcripcional de *Pomc* en hipófisis e hipotálamo, respectivamente.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

La expresión selectiva de genes en tipos celulares específicos depende de la acción concertada de grupos distintivos de FTs capaces de reconocer regiones reguladoras presentes en la vecindad de cada gen. El gen *Pomc* se expresa selectivamente en altos niveles en tres tipos celulares distintos: corticotropos y melanotropos hipofisarios, y neuronas hipotalámicas melanocortinérgicas. Trabajos anteriores demostraron que una región ubicada 7 kb río arriba del sitio de inicio de la transcripción de *Pomc*, tiene la capacidad de dirigir la expresión de genes reporteros a corticotropos hipofisarios en ratones transgénicos. Sin embargo, aún se desconoce la importancia funcional de este *enhancer in vivo* y su contribución relativa en la expresión de *Pomc* en corticotropos y melanotropos. El *enhancer* -7kb contiene una secuencia palindrómica compuesta de dos T-BOX canónicas invertidas a la que se une de manera crítica el FT TBX19. Dado el reciente hallazgo de que las neuronas hipotalámicas de POMC expresan *Tbx3*, un gen parálogo de *Tbx19* que también se une a sitios TBOX, en esta Tesis Doctoral decidimos explorar la posibilidad de que el *enhancer* -7kb regule de manera pleiotrópica la expresión de *Pomc* en ambos tipos celulares.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la importancia funcional del *enhancer* -7 kb en la expresión espacio-temporal de *Pomc* en la hipófisis y el hipotálamo, así como sus implicancias fisiológicas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estudiar la importancia funcional del *enhancer* -7kb de *Pomc* en corticotropos hipofisarios y el eje HPA mediante la generación y análisis de ratones mutantes deficientes en esta región.
2. Desafiar la hipótesis de que la región -7kb funciona también como *enhancer* transcripcional de *Pomc* en neuronas hipotalámicas.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Historia evolutiva del *enhancer* -7 kb

Una región ubicada 7 kb río arriba (de -7.7 a -6.9 kb) del TSS de *Pomc* en ratones (de -6.4 a -5.8 kb en humanos) fue descrita en 2011 por el grupo de Jacques Drouin (Universidad de Montreal) como un *enhancer* transcripcional activo en células de la línea corticotrópica AtT20 y denominado “*enhancer* -7kb de *Pomc*” (Langlais *et al.*, 2011). Ese mismo trabajo, reportó que el *enhancer* -7 kb es capaz de dirigir la expresión del gen *lacZ* a células hipofisarias que normalmente expresan *Pomc* en embriones de ratones transgénicos (Langlais *et al.*, 2011). Mediante experimentos de ChIP, estos mismos autores demostraron que el *enhancer* -7kb recluta varios FTs presentes en células AtT20 y que participan de la regulación transcripcional hipofisaria de *Pomc* como TPIT (TBX19), STAT3, NURR1, NEUROD1 y GR (Langlais *et al.*, 2011). (Figuras 4-7). En esta Tesis Doctoral decidimos investigar la historia evolutiva de esta región. Para ello realizamos alineamientos de secuencias del *locus* de *POMC* utilizando regiones ortólogas de genomas representativos de distintos órdenes de mamíferos y clases de vertebrados mediante los algoritmos PHAST (Siepel *et al.*, 2005; Siepel, 2019) y Multiz Alignment (Blanchette *et al.*, 2004) implementados por el UCSC Genome Browser (Kent *et al.*, 2002). Encontramos que el *enhancer* -7kb es una región muy conservada en genomas de todos los órdenes de mamíferos placentarios pero ausente en genomas de marsupiales, monotremados y otras clases de vertebrados (Figura 9).

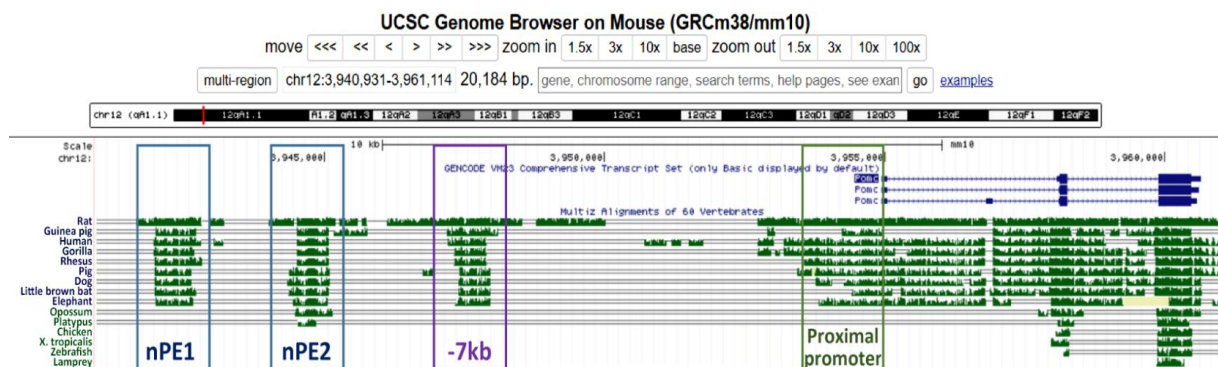


Figura 9. Conservación de secuencias en el *locus* de *POMC*. Alineamiento del *locus* de *Pomc* de ratón con ortólogos presentes en genomas de varios vertebrados revela que el enhacer -7kb es una secuencia altamente conservada originada en mamíferos placentarios.

Por lo tanto, estimamos que esta región se encuentra bajo selección purificadora en el *locus* de *POMC* desde antes de las radiación de mamíferos ocurrida hace ~100 millones de años (Bininda-Emonds *et al.*, 2007) y con posterioridad a la aparición de los marsupiales (~147 millones de años; **Figura 10**). Así, el origen evolutivo del *enhancer* -7kb coincide con los de los *enhancers* hipotalámicos de *Pomc* nPE1 y nPE3 (Franchini *et al.*, 2011; Rojo *et al.*, 2024) que también se fijaron en el linaje de los mamíferos placentarios, con posterioridad a nPE2 que se originó entre 300 y 167 millones de años atrás (Santangelo *et al.*, 2007; **Figura 10**).

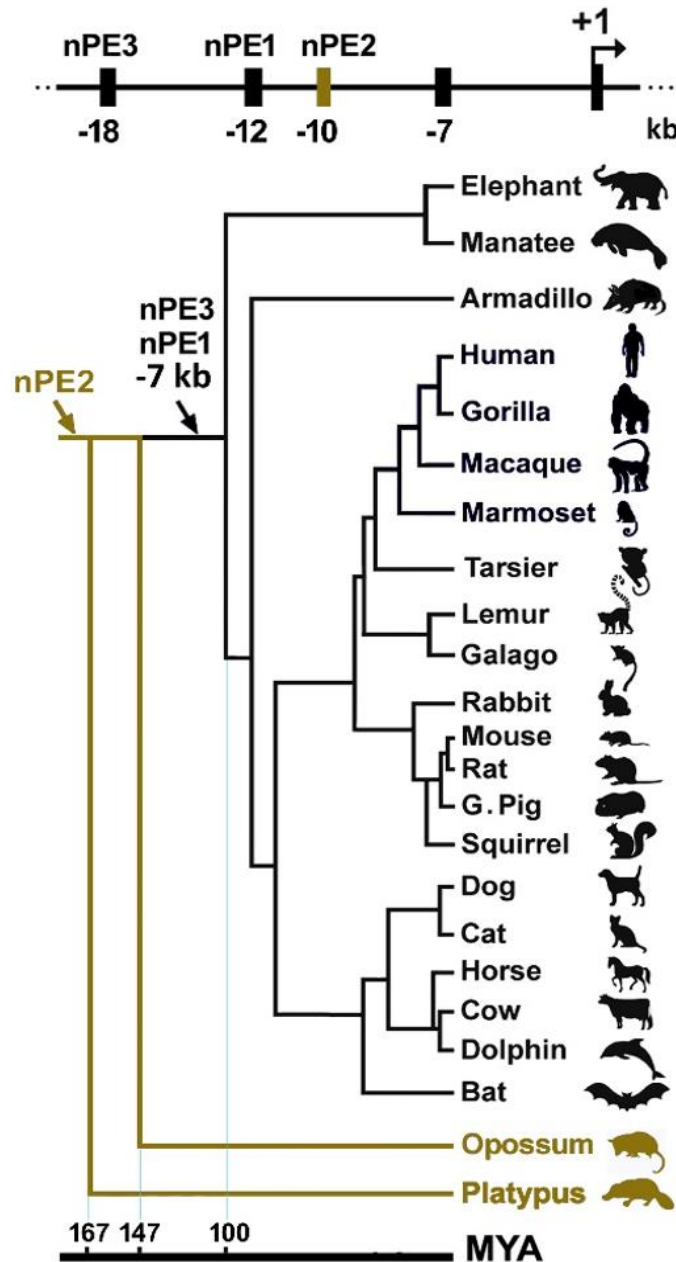


Figura 10. Origen evolutivo del *enhancer* -7kb. El esquema representa la filogenia de los distintos órdenes de mamíferos placentarios, marsupiales y monotremados. El *enhancer* -7Kb y los *enhancers* neuronales de *POMC* nPE1 y nPE3 se originaron luego de la aparición de los marsupiales y antes de la radiación de mamíferos mientras que nPE2 está bajo selección purificadora desde la aparición de los mamíferos basales. La escala temporal en MYA (million years ago) indica el origen de mamíferos monotremados, marsupiales y la radiación de mamíferos placentarios (Bininda-Emonds *et al.*, 2007).

Resulta interesante destacar que las regiones codificantes del precursor de POMC, presentes en los exones 2 y 3, se encuentran conservados en todas las clases de vertebrados mientras que los elementos regulatorios de la transcripción identificados en este análisis de alineamiento genético con secuencias del *locus* de *Pomc* de ratón son específicos de mamíferos (**Figura 9**).

Dado que los elementos funcionales del genoma tienden a estar bajo presión de selección, sus secuencias, por lo general, se encuentran conservadas al ser comparadas con secuencias de genomas filogenéticamente cercanos. El análisis de la conservación de secuencias de la región que contiene al *enhancer* -7kb nos permite estimar que su extensión es de ~ 500 a 800 pb (**Figura 11**). En el centro se destaca una región de 140 pb con niveles de conservación de secuencia muy altos en la que se destacan 4 elementos *PhastCons* (Siepel *et al.*, 2005) contiguos (**Figura 11**).

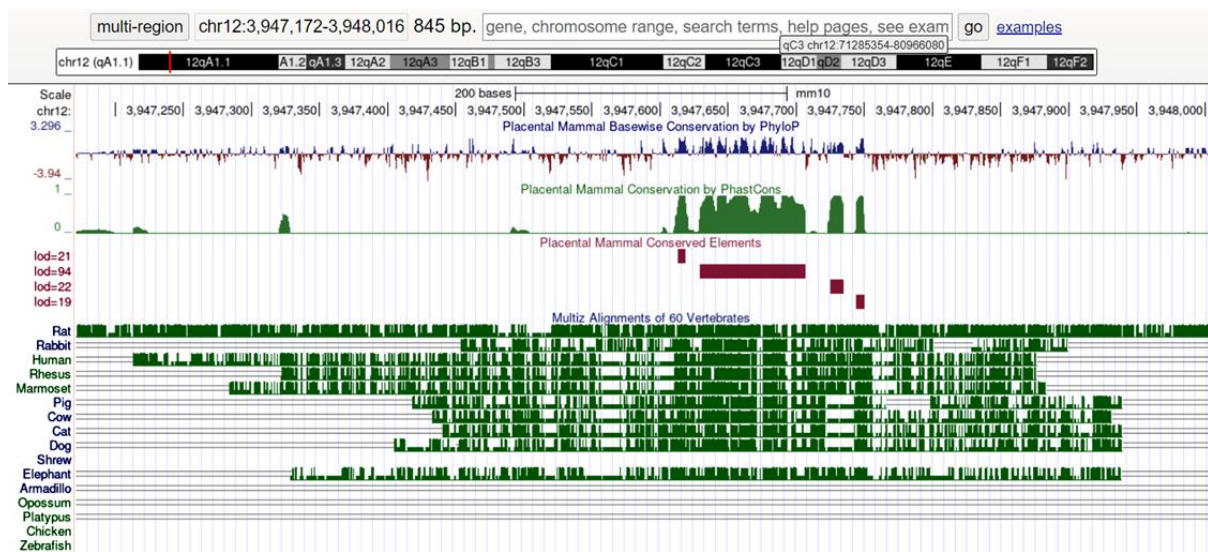


Figura 11. Conservación del *enhancer* -7kb. Esquema del alineamiento del *enhancer* -7 kb utilizando el algoritmo Multiz de 60 vertebrados a través del UCSC Genome Browser mostrando que la región conservada abarca ~ 500 a 800 pb. Una región central de 140 pb muestra niveles muy altos de conservación representados en rojo con 4 elementos *PhastCons* contiguos.

Uno de estos elementos tiene 78 pb y un *lod score* de 94, que indica un gran nivel de conservación en mamíferos placentarios, destacándose en su secuencia una TBOX palindrómica (recuadro naranja en **Figura 12**). Ensayos de ChIP en células AtT20 mostraron que este motivo TBOX es reconocido por TBX19 (TPIT) y que resulta fundamental para la actividad del *enhancer in vitro* promoviendo la expresión de genes reporteros (Langlais *et al.*, 2011).

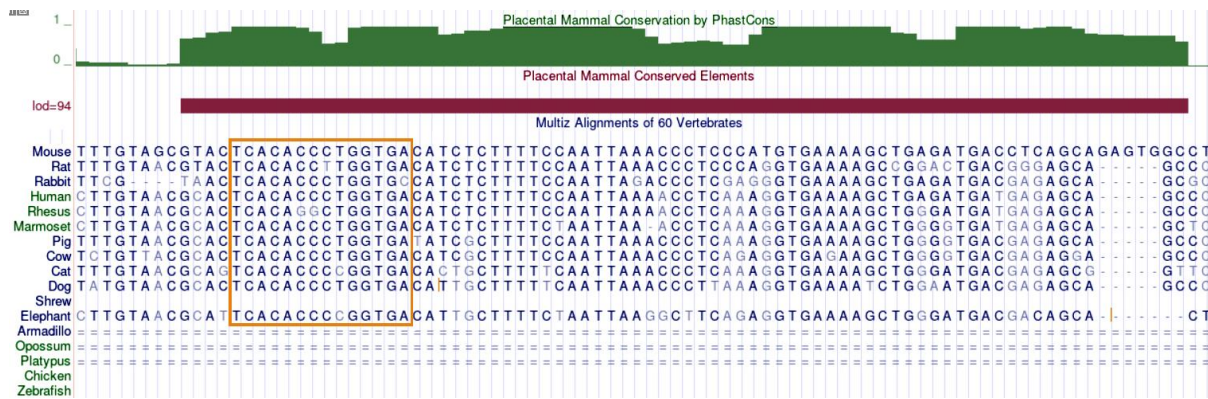


Figura 12. Conservación del *core* central del *enhancer* -7kb. Alineamiento de la secuencia central del *enhancer* -7 kb resaltando en naranja una TBOX palindrómica.

Generación de ratones mutantes deficientes en el *enhancer* -7 kb del gen

Pomc

Si bien experimentos anteriores realizados por el grupo de Jacques Drouin en transfecciones transientes de células AtT20 y embriones de ratones transgénicos habían demostrado que la región conservada ubicada ~7 kb río arriba del TSS de *Pomc* funciona como un *enhancer* transcripcional de *Pomc* en la hipófisis, aún se desconoce su importancia funcional *in vivo*, así como su contribución relativa en la expresión de *Pomc* en corticotropos y melanotropos. Con el objetivo de estudiar la relevancia funcional del *enhancer* -7 kb, generamos ratones deficientes en esta región conservada mediante un protocolo de edición génica basado en el sistema de CRISPR/Cas9. Esta tecnología permite realizar cortes simultáneos en ambas cadenas de ADN (DSBs, del inglés *double strand breaks*) en sitios específicos del genoma. El sistema está compuesto por la endonucleasa Cas9 de *Streptococcus pyogenes* que genera DSBs en un sitio seleccionado guiada por un ARN sintético (sgRNA, por sus siglas del inglés *single guide RNA*) de aproximadamente 100 nucleótidos (nt) en cuyo extremo 5' se encuentra una región variable de 18-21 nt complementaria al sitio de corte, seguida de una región de ARN constante que permite su unión a la enzima Cas9 (**Figura 13C**). La secuencia de 18-21 nt complementaria al sitio blanco debe estar localizada inmediatamente 5' de una secuencia 5'-NGG-3' denominada PAM (del inglés *protospacer adjacent motif*) que es fundamental para el direccionamiento y corte eficiente de la Cas9 de *S. pyogenes* (**Figura 13 A y B**). La ruptura de la doble cadena del ADN es mayormente reparada por el mecanismo de unión de extremos

no homólogos (NHEJ, *non-homologous end joining*), pudiendo generar pequeñas inserciones y/o deleciones (*indels*) o cambios de bases. El uso simultáneo de dos sgRNAs colineales permite escindir el segmento ubicado entre ambos sitios de corte eliminándolo del genoma (Fujii *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2013). Teniendo en cuenta este mecanismo, diseñamos 2 sgRNAs capaces de reconocer secuencias inmediatamente río arriba y río abajo de la región - 7 kb, cuya extensión definimos en base a la conservación del *enhancer* (Figura 11 y 13A). Estas sgRNAs fueron microinyectadas junto a mRNA de *cas9* en el citoplasma y el pronúcleo de cigotas de ratones de la cepa FVB/NJ, con el objetivo de generar alelos deficientes en el *enhancer* -7 kb (Figura 13C).

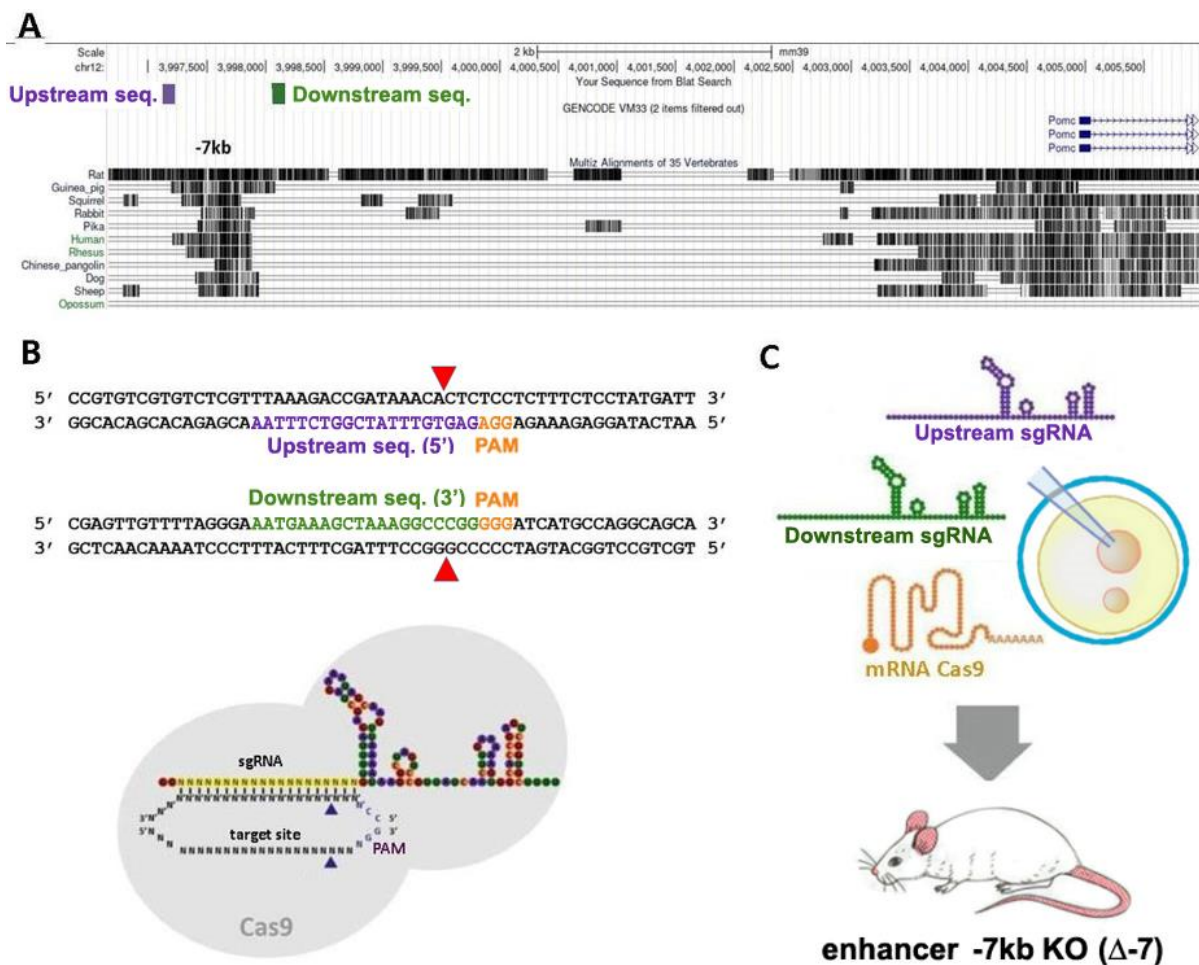


Figura 13. Generación de ratones mutantes deficientes en la región -7 kb de *Pomc* empleando la tecnología de edición génica CRISPR/Cas9. (A) Imagen extraída del UCSC genome browser que muestra las secuencias del extremo 5' (violeta) y 3' (verde) de la región -7 kb de *Pomc* donde dirigimos los cortes. **(B)** Secuencia del extremo 5' (violeta) y 3' (verde) del *enhancer* -7kb adonde están dirigidas las dos sgRNAs. En naranja se indican los sitios PAM reconocidos por la endonucleasa Cas9 las puntas de flecha rojas señalan los sitios del corte más probables. Debajo se representa un esquema del complejo sgRNA, con su porción variable en amarillo, su porción constante en colores, y la endonucleasa Cas9 en gris. **(C)** Esquema de la *mix* microinyectada en cigotas de ratones de la línea FVB/NJ. En violeta y verde las dos guías de ARN (sgRNA Upstream y sgRNA Downstream), y en amarillo el mRNA de *cas9*.

El análisis genotípico de los ratones F0 nacidos luego de este procedimiento - explicado en detalle en la sección de Métodos - fue realizado por PCR (**Figura 14**) y confirmado por secuenciación de Sanger. Utilizando esta estrategia identificamos un ratón portador de una delección de 939 pb que incluye la totalidad de la región conservada *Pomc* -7 kb (**Figura 11**). Denominamos a este alelo mutado *Pomc*^{Δ-7 kb}, *Pomc*^{Δ-7}, Δ-7 o, más simplemente, Δ7. Para establecer una colonia de ratones *Pomc*^{Δ-7} apareamos el ratón F0 fundador con una hembra FVB/NJ, pareja que logró transmitir la mutación a la descendencia F1. Se debe tener en cuenta que la técnica de edición genética por CRISPR/Cas9 generalmente produce ratones F0 mosaicos portadores de múltiples alelos modificados, muchos de los cuales no son transmitidos a la línea germinal, lo que impide su establecimiento definitivo (Yang *et al.*, 2013, Yen *et al.*, 2014). El posterior apareo de ratones F1 *Pomc*^{+ / Δ-7} nos permitió obtener simultáneamente ratones homocigotas *Pomc*^{Δ-7 / Δ-7} (*knock out*; KO) y sus herman.s *Pomc*^{+ / +} (*wild-type*; WT) en la misma camada.

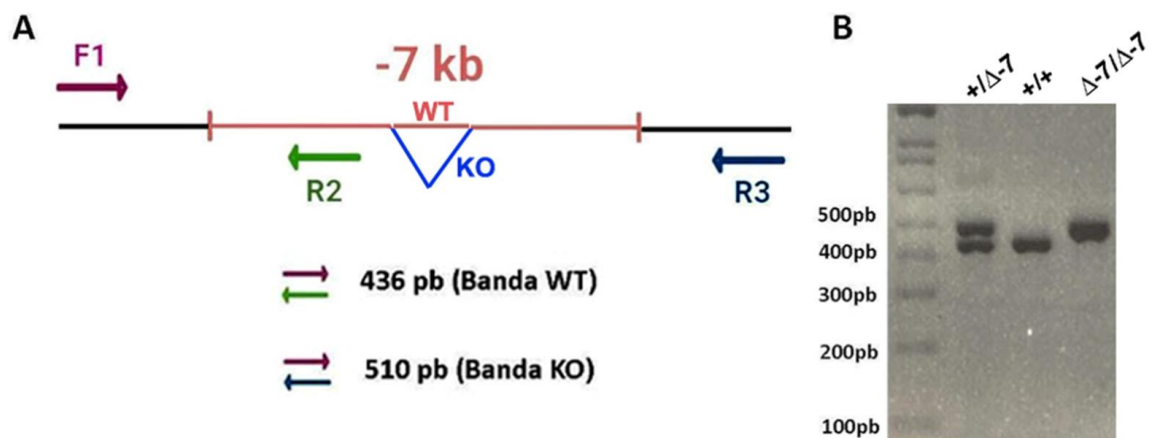


Figura 14: Genotipación de ratones mutantes deficientes en la región -7kb. (A) Esquema de *primers* utilizados para genotipar ratones de la línea *Pomc*^{Δ-7} (B) Imagen de un gel de agarosa donde se observan productos de PCR obtenidos de ratones heterocigota, WT y KO de izquierda a derecha respectivamente.

La ausencia del *enhancer* -7 kb reduce los niveles de expresión de *Pomc* en corticotropos hipofisarios

Para investigar la relevancia funcional de la región -7 kb en la regulación de la expresión de *Pomc* medimos los niveles de mRNA en corticotropos hipofisarios y en neuronas hipotalámicas de ratones *Pomc*^{Δ-7 / Δ-7} hembras y machos adultos (90 días de edad postnatal, P90) mediante RT-qPCR y los comparamos con sus herman.s controles *Pomc*^{+ / +}. Los valores

obtenidos fueron normalizados con los valores del mRNA de β -actina. Para determinar específicamente la cantidad de *Pomc* en corticotropos aislamos el lóbulo anterior de cada hipófisis separándolo del intermedio, evitando así la presencia de melanotropos en las muestras. Los resultados muestran una disminución drástica en los niveles de mRNA de *Pomc* en el lóbulo anterior hipofisario de ratones P90 KO, tanto en hembras como en machos, en comparación a sus hermanos WT (**Figura 15**).

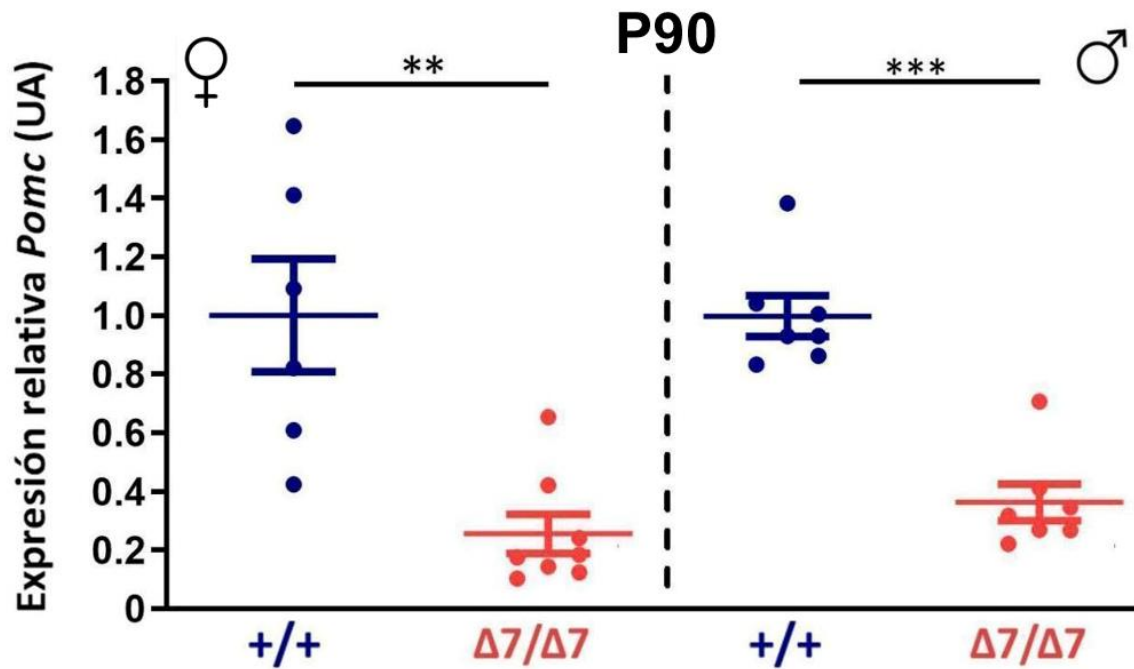


Figura 15. La ausencia del *enhancer* -7 kb disminuye la expresión de *Pomc* en corticotropos de ratones P90. (A-B) mRNA de *Pomc* relativizado al de β -Actina en el lóbulo anterior hipofisario de ratones hembras y machos P90 *Pomc* ^{$\Delta 7/\Delta 7$} y *Pomc*^{+/+}, evaluados por RT-qPCR y expresados en unidades arbitrarias (UA). Los valores indican el promedio $\pm$ SEM, test *t* de Student de una cola. **P < 0.01 (P=0.0007), t=4.093, df =12 para hembras. ***P < 0.0001, t=6.803 y df =12 en machos.

Las hembras *Pomc* ^{$\Delta 7/\Delta 7$} (n = 8) mostraron $25,52 \pm 6,7$ % de *Pomc* en corticotropos en comparación con sus hermanas WT (n=6). Algo similar se observó en machos en donde los ratones *Pomc* ^{$\Delta 7/\Delta 7$} (n=6) mostraron $36,5 \pm 6,2$ % del mRNA de *Pomc* corticotrópico respecto a sus hermanos controles (n=7; **Figura 15**). Estos resultados demuestran que la región -7 kb actúa como un importante *enhancer* transcripcional corticotrópico de *Pomc* *in vivo*.

A diferencia de lo observado en corticotropos, los niveles hipotalámicos de mRNA de *Pomc* fueron similares en ratones *Pomc*^{+/+} y *Pomc* ^{$\Delta 7/\Delta 7$} P90, tanto en hembras (n=9, WT y KO) como en machos (n=8, WT; n=7, KO; **Figura 16**).

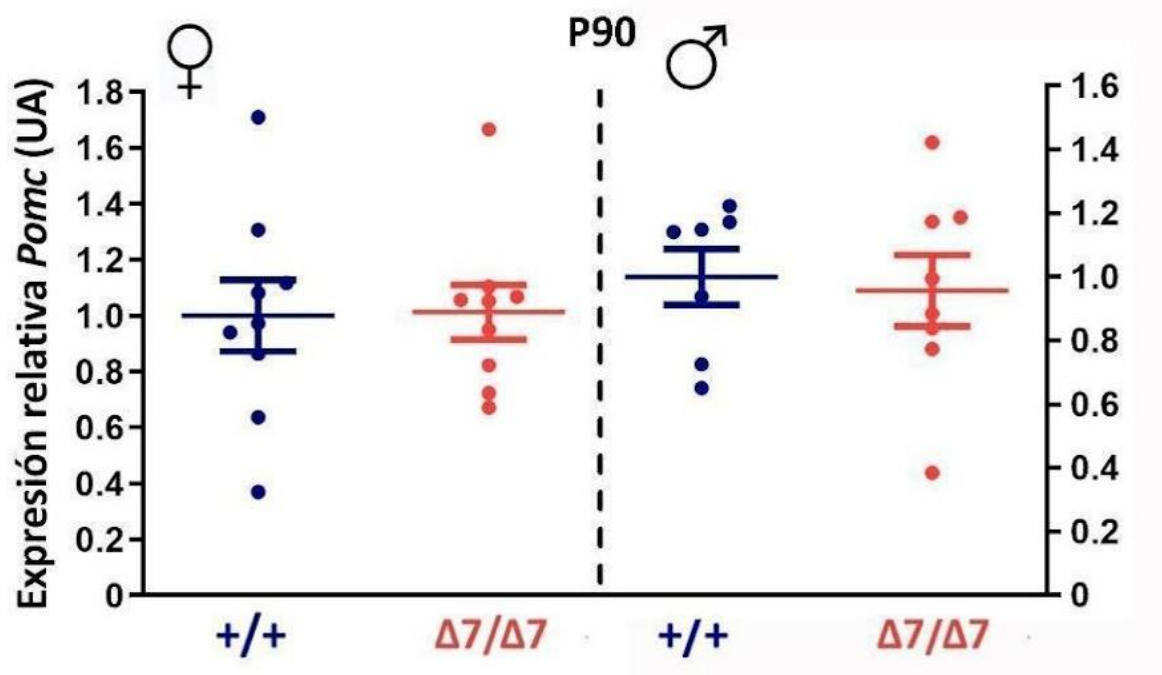


Figura 16. La ausencia del *enhancer* -7 kb no produce cambios significativos en la expresión de *Pomc* en neuronas hipotalámicas. mRNA de *Pomc* hipotalámico relativizado al de β -actina en ratones hembras y machos *Pomc*^{+/+} y *Pomc* ^{Δ -7/ Δ -7} de 12 semanas evaluados por RT-qPCR y expresados en unidades arbitrarias (UA). Los valores indican el promedio $\pm$ SEM, test *t* de Student de una cola: $P=0.4684$, $t=0.08048$, $df=16$ para hembras y $P=0.3865$, $t=0.2944$, $df=13$ para machos P90.

Los niveles de expresión de *Pomc* en el primordio hipotalámico determinados en embriones de ratón obtenidos 10.5 días *post coitum* (E10.5) no mostraron diferencias entre *Pomc*^{+/+} ($n=8$) y *Pomc* ^{Δ -7/ Δ -7} ($n=7$). (Figura 17).

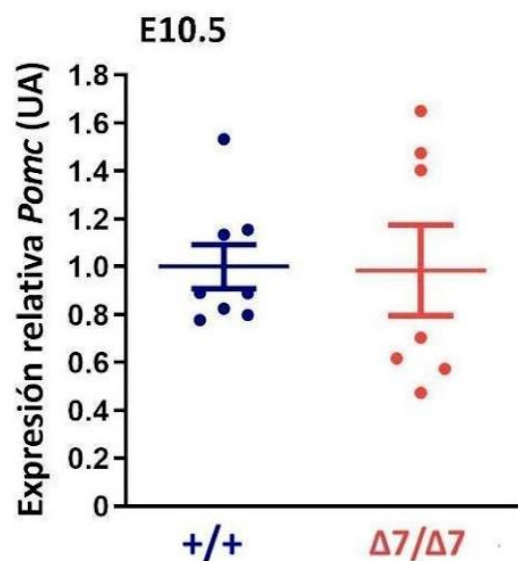


Figura 17. La ausencia del *enhancer* -7 kb no produce cambios significativos en la expresión hipotalámica de *Pomc* en embriones de E10.5 de ratón. mRNA de *Pomc* relativizado al de β -actina en el hipotálamo de embriones E10.5 *Pomc*^{+/+} y *Pomc* ^{Δ -7/ Δ -7} evaluados por RT-qPCR y expresados en unidades arbitrarias (UA). Los valores indican el promedio $\pm$ SEM, test *t* de Student de una cola: $P=0.4699$, $t=0.07708$, $df=13$.

Es importante mencionar que *Pomc* comienza su expresión en el hipotálamo en el día embrionario E10.5 mientras que *Pomc* se observa en corticotropos y melanotropos recién en embriones de E12.5 y E15.5, respectivamente.

La ausencia del *enhancer* -7 kb reduce la cantidad de células POMC+ en el lóbulo anterior de la hipófisis en desarrollo

Con el objetivo de analizar la importancia funcional del *enhancer* -7kb en distintas etapas del desarrollo embrionario del ratón realizamos ensayos de inmunofluorescencia en cortes sagitales de embriones E15.5 que abarcaron toda la extensión hipofisaria e hipotalámica utilizando un anticuerpo primario policlonal anti-ACTH, seguido de un anticuerpo secundario anti-Fc de conejo marcado con Alexa 488 y obtuvimos imágenes con microscopía confocal (Figura 18).

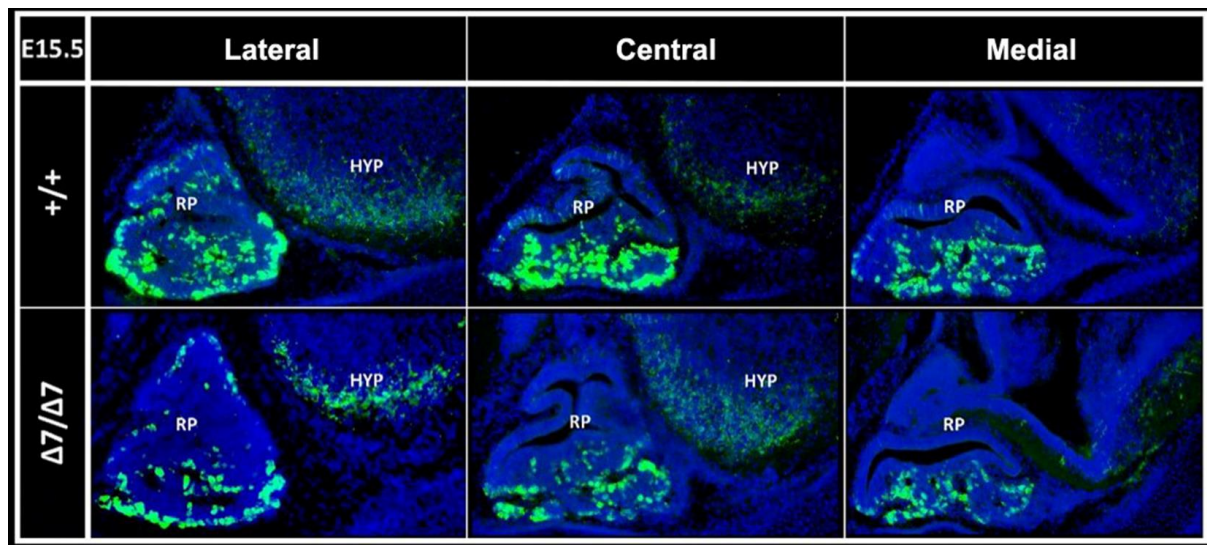


Figura 18. Inmunomarcación de células hipofisarias e hipotalámicas de embriones E15.5. Un anticuerpo primario anti-ACTH y 2^{do} acoplado a Alexa 488 (verde) y DAPI (azul) como marcador nuclear en secciones sagitales de embriones de ratón E15.5 *Pomc*^{+/+} (n=3) y *Pomc*^{Δ-7/Δ-7} (n=3) representativas de las regiones lateral, central y medial. Imágenes 20X, obtenidas en microscopio óptico de fluorescencia HYP: hipotálamo. RP. Bolsa de Rathke, primordio de hipófisis.

Debido a la mayor intensidad de fluorescencia observada en células hipofisarias respecto de las hipotalámicas (Figura 18), decidimos realizar los análisis cuantitativos entre ambos genotipos en los dos tipos celulares por separado (Figuras 19 y 20).

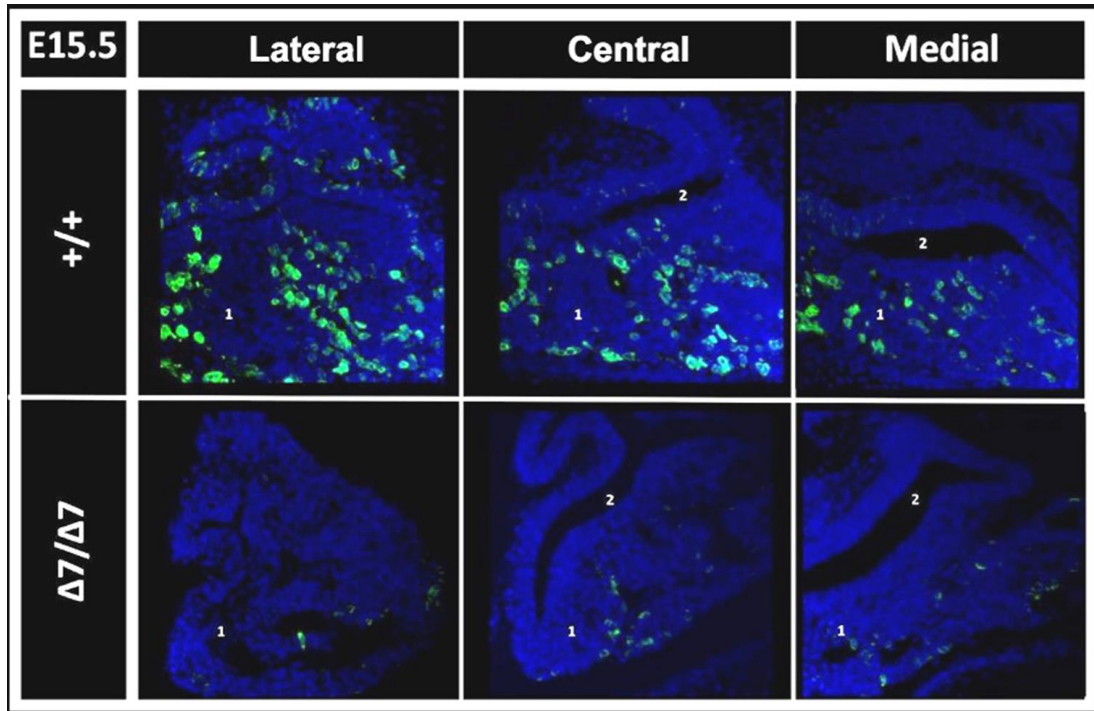


Figura 19. Detección de células POMC+ en la hipófisis de embriones E15.5. Ensayo de inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo anti-ACTH, uno 2rio con Alexa 488 (verde) y DAPI como marcador nuclear (azul), en secciones sagitales de embriones de ratón E15.5 *Pomc*^{+/+} y *Pomc* ^{$\Delta 7/\Delta 7$} . Imágenes obtenidas con un microscopio confocal, con objetivo 40X, que muestran la hipófisis con corticotropos y melanotropos inmunomarcados. **1:** Sitio de activa proliferación celular y vascular en la pared anterior de la bolsa de Rathke (futuro lóbulo anterior de la hipófisis). **2:** Lumen residual de la bolsa de Rathke en el interior del primordio hipofisario.

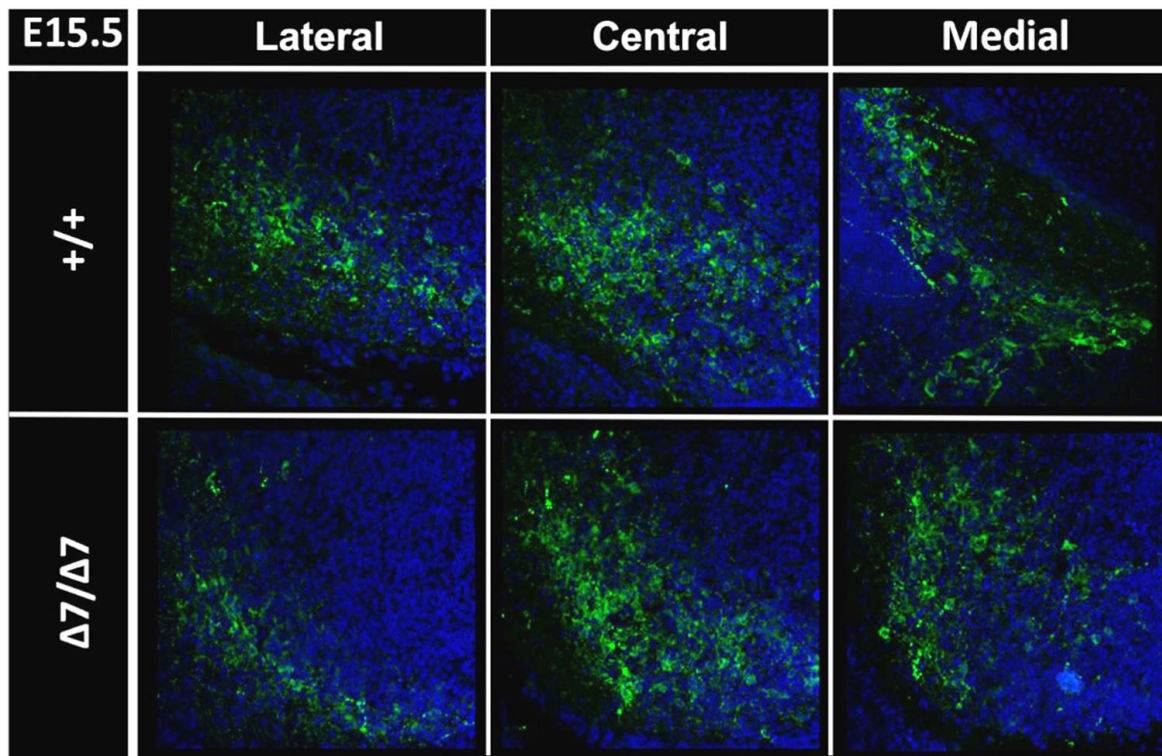


Figura 20. Detección de células POMC+ en el hipotálamo de embriones E15.5. Ensayo de inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo anti-ACTH, un 2rio conjugado con Alexa 488 (verde) y DAPI como marcador nuclear (azul), en secciones sagitales de embriones de ratón E15.5 *Pomc*^{+/+} y *Pomc* ^{$\Delta 7/\Delta 7$} . Imágenes obtenidas en microscopio confocal, con objetivo 40X, que muestra neuronas del ARC inmunomarcadas.

A partir de las imágenes obtenidas determinamos el número de corticotropos hipofisarios y neuronas hipotalámicas POMC+ (**Figura 21**) y cuantificamos la intensidad de fluorescencia (**Figura 22**). Para ello, seleccionamos tres cortes de cada embrión (n=3 por genotipo): lateral, central y medial. Cada corte fue observado en varios planos del eje Z y el plano del medio fue utilizado para cuantificar el número de células/neuronas ACTH+.

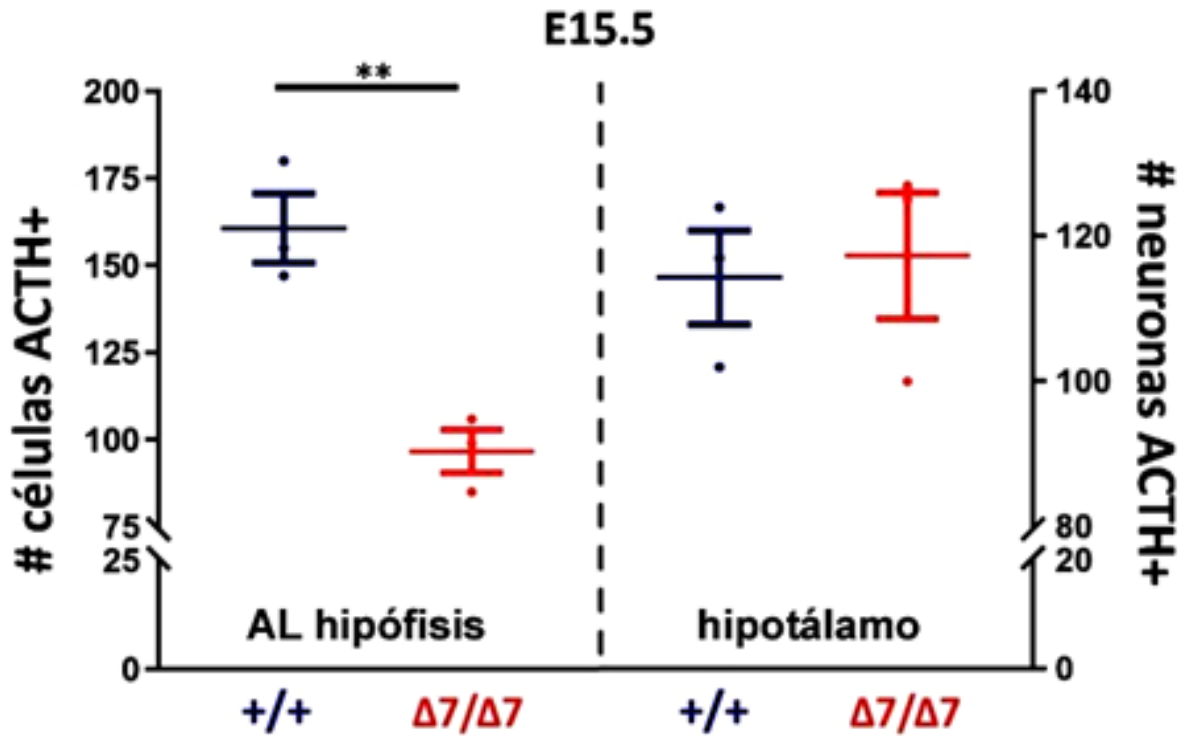


Figura 21. Número de células de POMC+ inmunomarcadas con un anticuerpo anti-ACTH en el lóbulo anterior (AL) de la hipófisis y el hipotálamo en embriones E15.5 de ratones *Pomc*^{+/+} y *Pomc*^{Δ-7/Δ-7}. Número de células fluorescentes detectadas en el AL de la hipófisis (izq.) y en el ARC (der.), a partir de imágenes confocales 40X. Cada punto representa la suma de células POMC+ en tres cortes seriados de cada ratón *Pomc*^{+/+} (n=3) y *Pomc*^{Δ-7/Δ-7} (n=3). Los valores indican el promedio ± SEM, test t de Student de una cola. **P < 0.01 (P=0.0027), t=5.470, df=4 para corticotropos y P=0.3979, t=0.2767 y df=4 para neuronas del ARC.

Los resultados mostraron que los embriones *Pomc*^{Δ-7/Δ-7} presentan un menor número de células POMC+ en la hipófisis anterior respecto a sus herman.s *Pomc*^{+/+} (**Figura 21, izq.**). A diferencia de lo observado en corticotropos, el número de neuronas POMC+ detectadas en el ARC fue similar en ambos genotipos (**Figura 21, der.**). La intensidad de fluorescencia de las células POMC+ fue determinada calculando la densidad integrada (IntDen), definida como el producto del área por la intensidad promedio de los píxeles dentro del área medida. Los resultados indican que los embriones *Pomc*^{Δ-7/Δ-7} presentan una intensidad de fluorescencia menor que sus herman.s *Pomc*^{+/+}, tanto en células POMC+ del AL hipofisario como en neuronas del ARC (**Figura 22**).

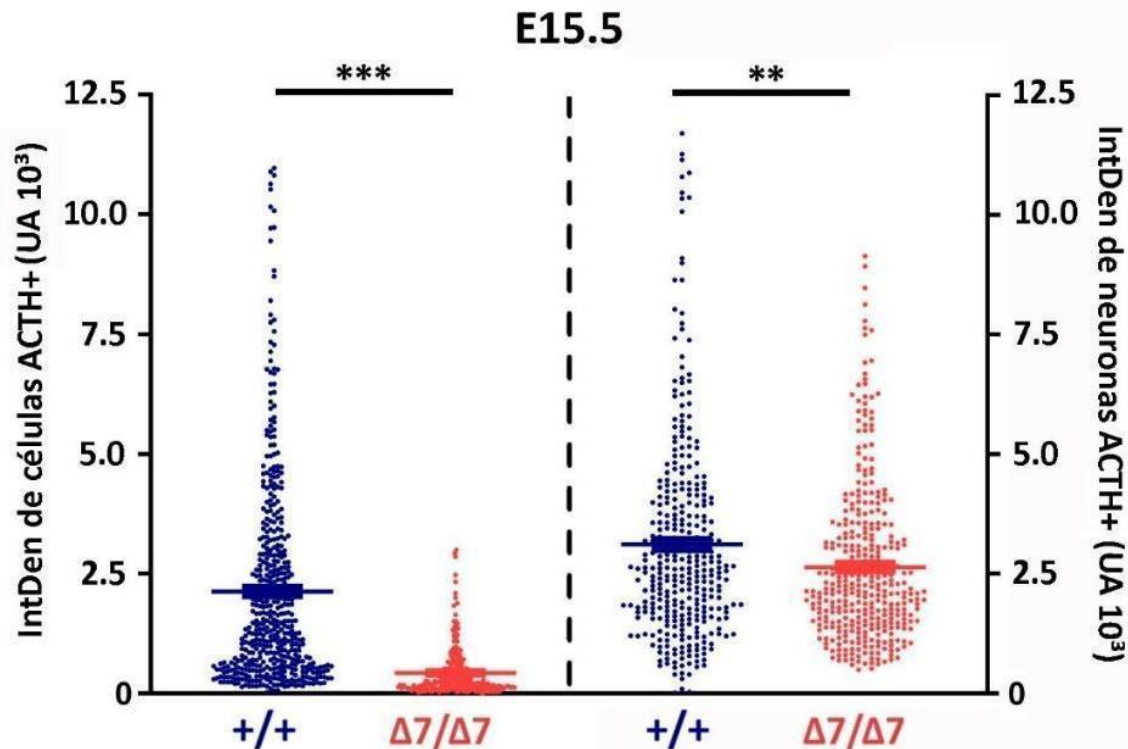


Figura 22. Intensidad de fluorescencia en células de POMC inmunomarcadas con un anticuerpo anti-ACTH en el lóbulo anterior (AL) de la hipófisis (izq,) y el hipotálamo (der,) en embriones E15.5 *Pomc*^{+/+} y *Pomc*^{Δ7/Δ7}. Los puntos representan la fluorescencia de cada célula medida en tres cortes seriados de cada ratón *Pomc*^{+/+} y *Pomc*^{Δ7/Δ7}. Los valores indican el promedio $\pm$ SEM, test de Mann-Whitney de una cola. *** $P \leq 0.001$ para hipófisis y ** $P \leq 0.01$ ($P = 0.0019$) para hipotálamo., Número de células POMC+ cuantificados: 482 en ratones *Pomc*^{+/+} y 290 en ratones *Pomc*^{Δ7/Δ7}. Número de neuronas POMC+ cuantificadas: 344 en ratones *Pomc*^{+/+} y 362 en ratones *Pomc*^{Δ7/Δ7}.

Los resultados presentados hasta aquí indican que el *enhancer* -7kb cumple un rol fundamental en la regulación de la expresión de *Pomc* en corticotropos hipofisarios durante las primeras etapas del desarrollo del ratón.

Efecto de la ausencia del *enhancer* -7 kb en células hipofisarias y neuronas hipotalámicas POMC+ en ratones adultos

Para evaluar la importancia funcional del *enhancer* -7 kb en ratones adultos, realizamos ensayos de inmunofluorescencia en cortes coronales de hipófisis (Figura 23) e hipotálamos (Figura 24 y 25) de ratones P90 de ambos sexos (n=3 por genotipo).

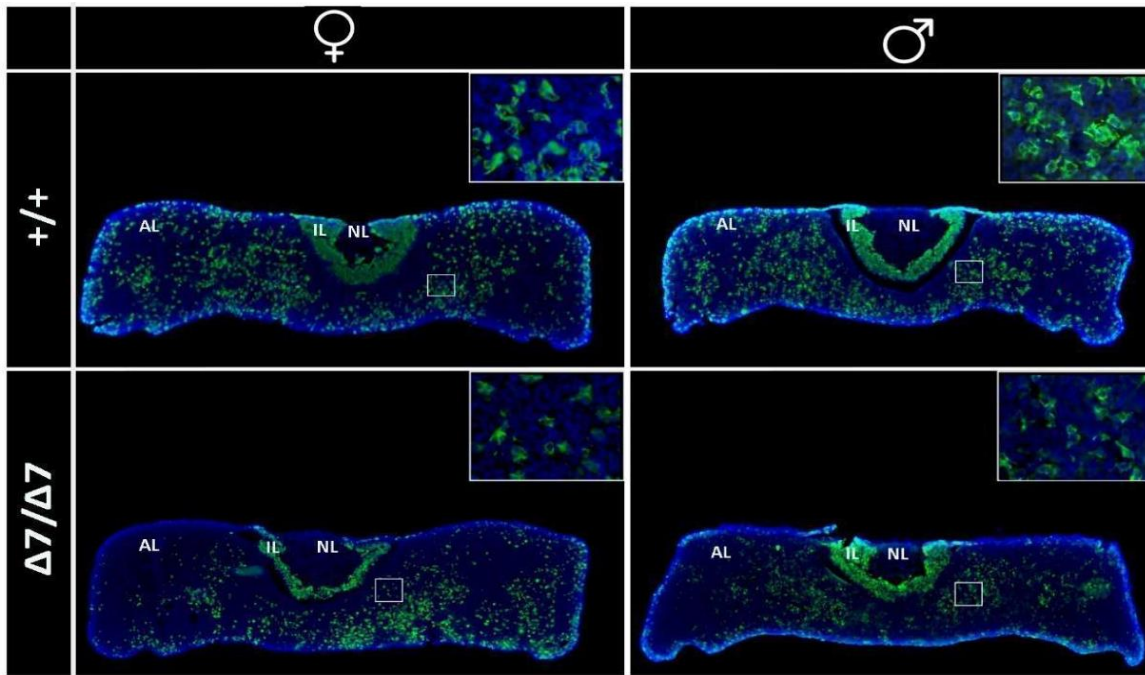


Figura 23. Detección de células POMC+ en la hipófisis de ratones adultos P90. Ensayo de inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo primario anti-ACTH, 2rio acoplado a Alexa 488 (verde) y DAPI como marcador nuclear (azul) en secciones coronales de hipófisis de ratones P90 *Pomc*^{+/+} y *Pomc*^{Δ-7/Δ-7}. Imágenes obtenidas en microscopio óptico de fluorescencia, con objetivo 4X, que muestran corticotropos y melanotropos fluorescentes marcados por el anticuerpo. Arriba a la derecha, imágenes 40x obtenidas con un microscopio confocal, de una región aleatoria del lóbulo anterior. **AL**= Lóbulo anterior; **IL** = Lóbulo intermedio; **NL** = Lóbulo neural.

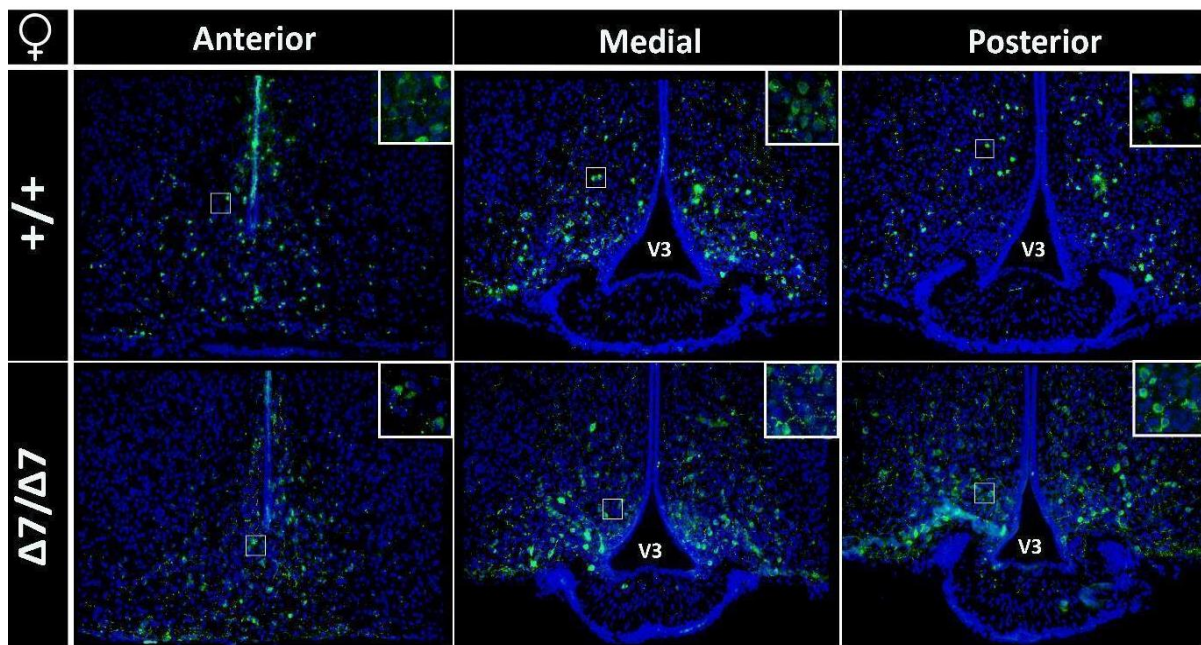


Figura 24. Detección de neuronas POMC+ en el hipotálamo de ratones hembras P90. Ensayo de inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo primario anti-ACTH, 2rio acoplado a Alexa 488 (verde) y DAPI como marcador nuclear (azul) en secciones coronales de hembras P90 de ratones *Pomc*^{+/+} y *Pomc*^{Δ-7/Δ-7}. Imágenes obtenidas en microscopio óptico de fluorescencia, con objetivo 20X. Arriba a la derecha, imágenes 40x obtenidas con un microscopio confocal, de regiones aleatorias del ARC. **V3**= Tercer ventrículo.

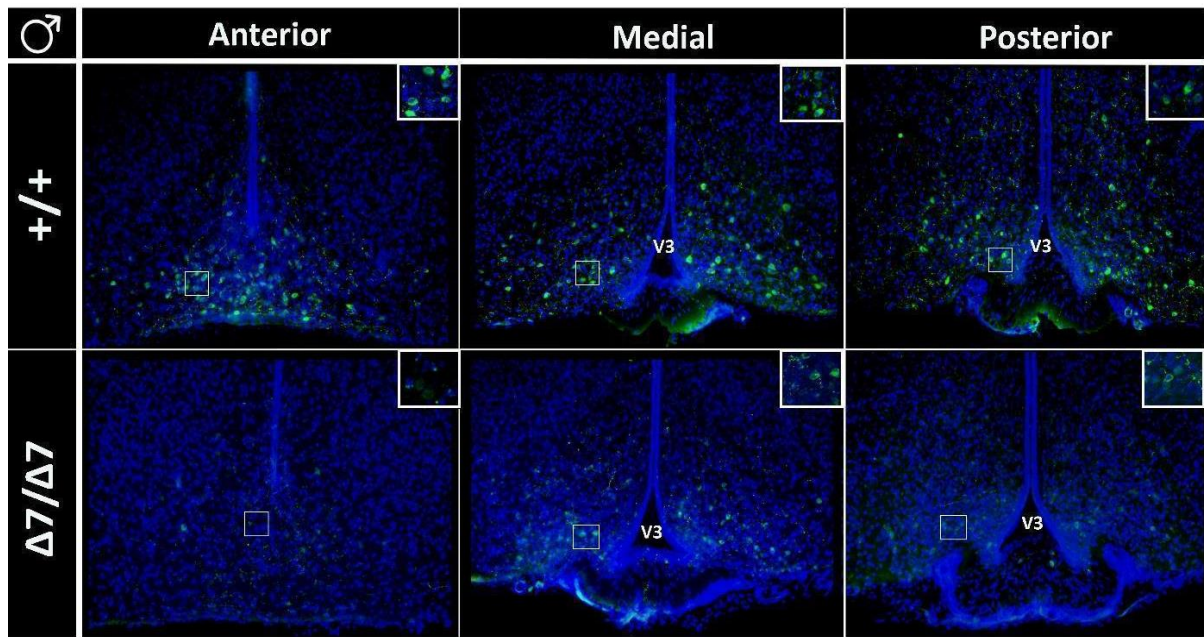


Figura 25. Detección de neuronas POMC+ en el hipotálamo de ratones machos P90. Ensayo de inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo primario anti-ACTH, 2^{do} acoplado a Alexa 488 (verde) y DAPI como marcador nuclear (azul) en secciones coronales de machos P90 de ratones *Pomc*^{+/+} y *Pomc*^{Δ7/Δ7}. Imágenes obtenidas en microscopio óptico de fluorescencia, con objetivo 20X. Arriba a la derecha, imágenes 40x obtenidas con un microscopio confocal de regiones aleatorias. V3= Tercer ventrículo.

Utilizando la misma metodología que en embriones, cuantificamos el número de células inmunomarcadas (**Figura 26**) a partir de las imágenes obtenidas en el microscopio confocal. Los resultados muestran un menor número de células POMC+ detectadas en ratones portadores de la delección respecto a sus hermanos controles en ambos sexos (**Figura 26**).

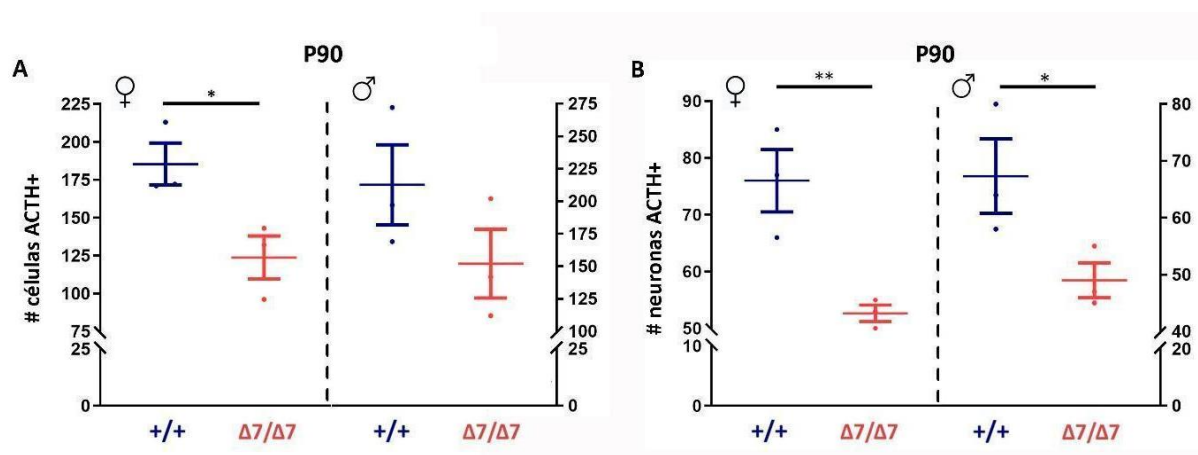


Figura 26. Número de células de POMC+ inmunomarcadas con un anticuerpo anti-ACTH en el lóbulo anterior (AL) de la hipófisis y el hipotálamo en ratones P90 macho y hembras *Pomc*^{+/+} y *Pomc*^{Δ7/Δ7}. (A) Número de células fluorescentes en el AL de la hipófisis. Los valores indican el promedio $\pm$ SEM, test de Mann-Whitney de una cola * $P \leq 0.05$ para hembras y test t de Student de una cola, con un valor de $P=0.1045$, $t=1.496$, $df=4$ para machos. (B) Número de neuronas fluorescentes cuantificadas en el ARC. Los valores indican el promedio $\pm$ SEM, test t de Student de una cola para ambos sexos, con un valor de ** $P \leq 0.01$ ($P=0.0074$), $t=4.096$, $df=4$ para hembras y * $P \leq 0.05$ ($P=0.0323$), $t=2.532$, $df=4$ para machos. (A-B) Cuantificación realizada a partir de una imagen confocal 40X. Cada punto representa la suma de células/neuronas cuantificadas en tres cortes seriados en cada ratón *Pomc*^{+/+} ($n=3$) y *Pomc*^{Δ7/Δ7} ($n=3$).

No obstante, esta reducción observada en el número de neuronas POMC+ no produjo cambios significativos en el peso de los ratones *Pomc*^{Δ-7/Δ-7} (**Figura 27**), en acuerdo con datos previos del laboratorio en donde sólo reducciones superiores al 70% en los niveles de *Pomc* determinan aumento de la ingesta, de adiposidad y de peso corporal (Lam *et al.*, 2015).

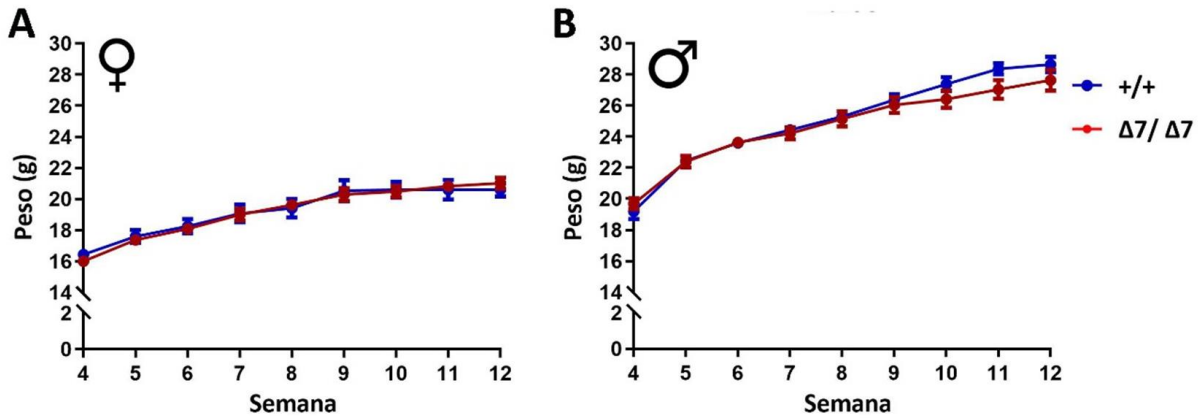


Figura 27. Curva de peso corporal de ratones hembras y machos *Pomc*^{+/+} y *Pomc*^{Δ-7/Δ-7}. Peso corporal determinado semanalmente en hembras (n=6) y machos (n=11) *Pomc*^{+/+} (azul) y hembras (n=7) y machos (n=11) *Pomc*^{Δ-7/Δ-7} (rojo), desde P28 hasta P84. Las barras de error corresponden al SEM, test *t* de Student de una cola con *P*=0.3862, *t*=0.2942, *df*=16 en hembras y *P*=0.3855, *t*=0.2959, *df*=16 en machos.

Estos resultados indican que la región -7 kb actúa como un *enhancer* corticotrópico de *Pomc*, no sólo durante etapas tempranas del desarrollo de la hipófisis del ratón, sino también en la adultez. La ausencia del *enhancer* -7 kb produce una disminución de los niveles de mRNA de *Pomc* en el lóbulo anterior, del número de células inmunomarcadas (POMC+) y de su intensidad de fluorescencia en todas las edades evaluadas. Es probable que la expresión corticotrópica remanente de *Pomc* en los ratones mutantes *Pomc*^{Δ-7/Δ-7} (~30% de mRNA) se deba a la participación de la región proximal al promotor (-480 pb del TTS de *Pomc*), mientras que sólo se alcanzarían niveles máximos fisiológicos cuando el *enhancer* -7 kb es también parte integral del *locus*.

En el hipotálamo, en cambio, la región -7 kb no parece comportarse como un *enhancer* transcripcional de relevancia. La disminución en el número de neuronas detectadas tanto en hembras como en machos *Pomc*^{Δ-7/Δ-7} P90 respecto de sus hermanas WT podría indicar, sin embargo, una participación más débil de este *enhancer* en la expresión hipotalámica de *Pomc* en comparación con los roles ejercidos por nPE1, nPE2 y nPE3 (de Souza *et al.*, 2005; Lam *et al.*, 2015; Rojo *et al.*, 2024). Teniendo en cuenta la proximidad del *enhancer* -7 kb con los *enhancers* hipotalámicos nPE3, nPE1 y nPE2 (-11 kb, -5 kb y -3 kb, respectivamente) y su

posición intermedia respecto del promotor, es posible especular con la idea de que la región -7kb actúe como un *enhancer* fuerte en corticotropos y débil en el hipotálamo.

Recientemente, el grupo de Mira Kassouf y Doug Higgs de la Universidad de Oxford propuso el término *facilitador* (*facilitator*) para definir elementos regulatorios presentes en el clúster de *enhancers* que controla la expresión del gen α - globina (Blayney *et al.*, 2023; Kassouf *et al.*, 2023). Los *facilitadores* no tienen la capacidad intrínseca de dirigir la expresión célula-específica de genes reporteros en ratones transgénicos ni de iniciar por sí solos la transcripción, pero sí resultan claves en garantizar niveles altos de expresión del gen endógeno actuando de manera cooperativa con los “*enhancers* clásicos” presentes en el mismo clúster (Blayney *et al.*, 2023; Kassouf *et al.* 2023). Considerando que nuestro grupo acaba de demostrar que la regulación transcripcional hipotalámica de *Pomc* en mamíferos está controlada por un clúster tripartito integrado por los *enhancers* nPE3, nPE1 y nPE2 (Rojo *et al.*, 2024), la participación del *enhancer* -7 como *facilitador* en este clúster es una hipótesis atractiva, especialmente al tener en cuenta otros dos hallazgos relacionados. Por un lado, el grupo de Nadav Ahituv de la Universidad de California en San Francisco subió al sitio bioRxiv un trabajo con experimentos de scATAC-seq/scRNA-seq realizados en núcleos aislados de células hipotalámicas obtenidas de ratones adultos (Nguyen *et al.*, 2022). Este estudio demostró que en núcleos de neuronas que expresan *Pomc* en altos niveles la cromatina se encuentra accesible a la transposasa Tn5 en regiones coincidentes con la localización genómica de los *enhancers* hipotalámicos nPE3, nPE1 y nPE2, y también del *enhancer* -7kb (**Figura 28**). Es interesante destacar que la magnitud del pico del *enhancer* -7kb es considerablemente menor a la observada en los picos coincidentes con los *enhancers* hipotalámicos nPE3, nPE1 y nPE2, sugiriendo un menor grado de apertura de la cromatina (**Figura 28**). Esta observación refuerza la hipótesis de que -7kb podría actuar como *facilitador* en la regulación de la expresión hipotalámica de *Pomc*, en coincidencia con resultados de scATAC-seq realizados en el clúster de *enhancers* de α - globina en donde los elementos facilitadores R3, Rm y R4 forman picos menores a los de los “*enhancers* clásicos” R1 y R2 (Blayney *et al.*, 2023).

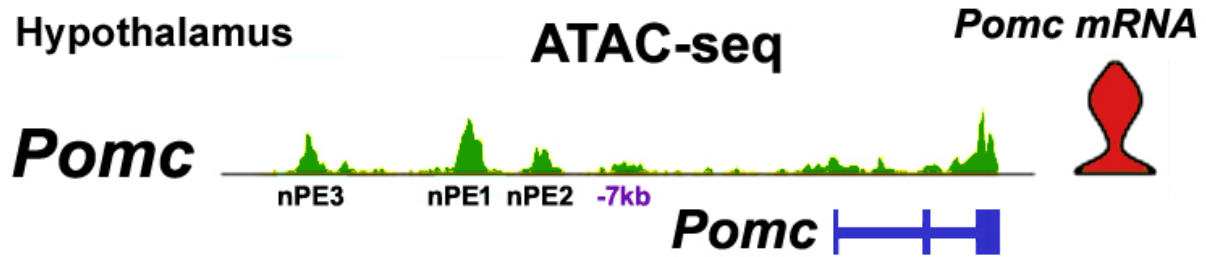


Figura 28. Mapeo de regiones libres de nucleosomas detectadas por scATAC-seq en el *locus* de *Pomc* en núcleos aislados de células hipotalámicas de ratones adultos que expresan altos niveles de mRNA de *Pomc* medidos por scRNA-seq. Los picos verdes representan regiones de la cromatina accesibles a Tn5 (scATAC-seq) coincidentes con nPE3, nPE1, nPE2 y -7kb del *locus Pomc*. El diagrama de violín (rojo) representa niveles de transcritos de *Pomc*. El gen *Pomc* y sus 3 exones están indicados en azul. Figura adaptada de Nguyen *et al.*, 2022.

En un estudio preliminar realizado en núcleos aislados de células del lóbulo anterior de la hipófisis de ratones adultos se observan resultados marcadamente contrapuestos (**Figura 29**), en donde los picos principales corresponden al *enhancer* -7kb y al promotor proximal de *Pomc*, con muy pocas lecturas en las regiones de nPE1 y nPE2 (Yu, Rubinstein & Low, resultados no publicados).

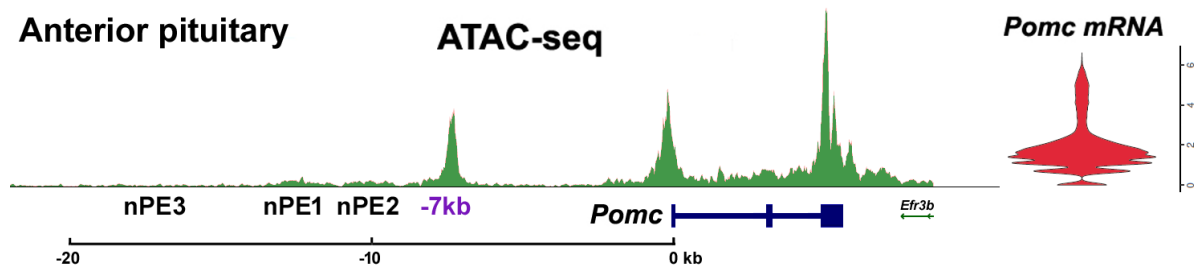


Figura 29. Mapeo de regiones libres de nucleosomas detectadas por scATAC-seq en el *locus* de *Pomc* en núcleos aislados de células hipofisarias de ratones adultos que expresan altos niveles de mRNA de *Pomc* medidos por scRNA-seq. Los picos verdes representan regiones de la cromatina accesibles a Tn5 (scATAC-seq) coincidentes con el *enhancer* -7kb, nPE1 y nPE2 del *locus Pomc*. El diagrama de violín (rojo) representa niveles de transcritos de *Pomc*. El gen *Pomc* y sus 3 exones están indicados en azul.

Por otro lado, sabemos que la región -7kb tiene la capacidad de reclutar a TPIT(TBX19), un FT de la familia T-BOX presente en corticotropos y melanotropos hipofisarios (Lamolet *et al.*, 2001; **Figura 4B**). Las neuronas hipotalámicas de POMC no expresan *Tbx19* pero sí *Tbx3* (Yu *et al.*, 2022), otro miembro de la familia de FT T-BOX cuya presencia es crítica para la expresión hipotalámica de *Pomc* (Quarta *et al.*, 2019). Dada la similitud de secuencia entre los sitios de unión al ADN de los distintos miembros de la familia T-BOX (Sebé-Pedrós y Ruiz-Trillo, 2017), es posible que TBX3 se una a la *Tbox* presente en el *enhancer* -7kb utilizada en la hipófisis por TBX19. Otro FT presente tanto en células hipofisarias como en neuronas

hipotalámicas de POMC es STAT3. De hecho, experimentos recientes de nuestro laboratorio demostraron que STAT3 se une a nPE1 a través de sitios canónicos que resultan fundamentales para garantizar máximos niveles de expresión de *Pomc* (Hael *et al.*, manuscrito en preparación). Es posible, entonces, que TBX3 y STAT3 sean reclutados por el *facilitador* -7kb en el ARC y contribuir así a la optimización de la expresión hipotalámica de *Pomc* liderada por los “*enhancers* clásicos” nPE3, nPE1 y nPE2.

El *enhancer* -7 kb resulta clave para el desarrollo de la glándula adrenal

Dado que los ratones deficientes en *Tbx19* presentan una expresión reducida de *Pomc* en corticotropos, bajos niveles plasmáticos de ACTH y, consecuentemente, hipoplasia cortical en la glándula adrenal (Pulichino *et al.*, 2003), decidimos investigar los efectos inducidos por la ausencia del *enhancer* -7 kb en el desarrollo de la glándula adrenal, particularmente del área fasciculada de la corteza la cual es la responsable de la producción y liberación de glucocorticoides. Para ello, extrajimos las glándulas adrenales derecha e izquierda de 3 ratones adultos *Pomc*^{+/+} y *Pomc*^{Δ-7/Δ-7}, de cada sexo, y evaluamos su peso e histología.

El tamaño y peso de las glándulas adrenales presentan normalmente un dimorfismo sexual muy marcado en ratones siendo mayores en hembras que en machos (Levasseur *et al.*, 2019). El efecto inducido por la ausencia del *enhancer* -7kb en el desarrollo de estas glándulas también presenta un inesperado dimorfismo sexual. El peso promedio de la glándula adrenal resultó ser similar en ratones hembras P90 de ambos genotipos, registrándose 40,33 ± 2,4 mg en *Pomc*^{+/+} y 40,00 ± 2,0 mg en *Pomc*^{Δ-7/Δ-7} (test *t* de Student: P=0.4601, t= 0.1066 y df=4). En machos, en cambio, las glándulas adrenales de los ratones *Pomc*^{Δ-7/Δ-7} son marcadamente más livianas que la de sus hermanos *Pomc*^{+/+}: 9,00 ± 0,58 mg y 12,00 ± 1,15 mg, respectivamente (test *t* de Student: P ≤ 0.05 (P=0.0404), t= 2.324 y df=4).

Por otra parte, la eliminación del *enhancer* -7kb alteró el desarrollo de la zona fascicular de la corteza adrenal (área cortical central y más ancha donde residen las células productoras de glucocorticoides que expresan receptores de ACTH, MC2Rs) tanto en hembras (**Figura 30**) como en machos (**Figura 31**). Esto podría explicarse por la disminución en los niveles de expresión de *Pomc* en corticotropos y la consecuente reducción en los niveles plasmáticos de ACTH, que por debajo de los niveles fisiológicos podría disminuir el crecimiento trófico que esta hormona ejerce sobre la zona fascicular de la corteza adrenal durante su desarrollo.

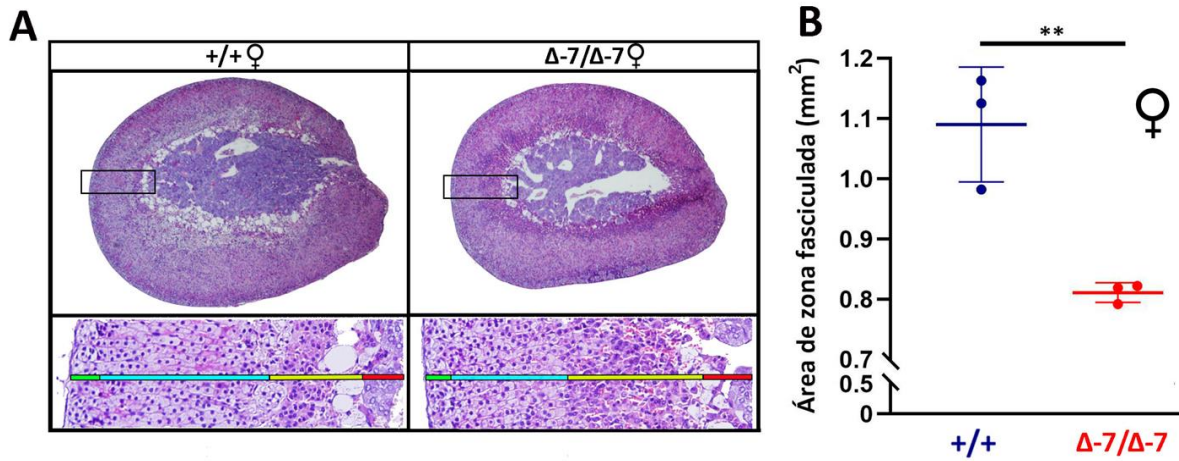


Figura 30. La zona fasciculada de la corteza adrenal se encuentra reducida en hembras P90 *Pomc*^{Δ-7/Δ-7}. **A**, Cortes en parafina de la glándula adrenal derecha de ratones hembras P90 *Pomc*^{+/+} (n=3) y *Pomc*^{Δ-7/Δ-7} (n=3) teñidas con hematoxilina (violeta) y eosina (rosa). Sobre la línea media se indica la extensión de la Zona Glomerular (ZG, línea verde), la Zona Fasciculada (ZF; línea celeste) y la Zona Reticular (ZR; línea amarilla). Médula (M; línea roja). **B**, Área de la zona fasciculada de la corteza adrenal derecha, medida a partir de cortes histológicos mediante una herramienta del programa ImageJ. Los valores corresponden al promedio ± SEM seguidos de un test *t* de Student de una cola. **P ≤ 0.01 (P=0.0038) t= 4.989 y df=4.

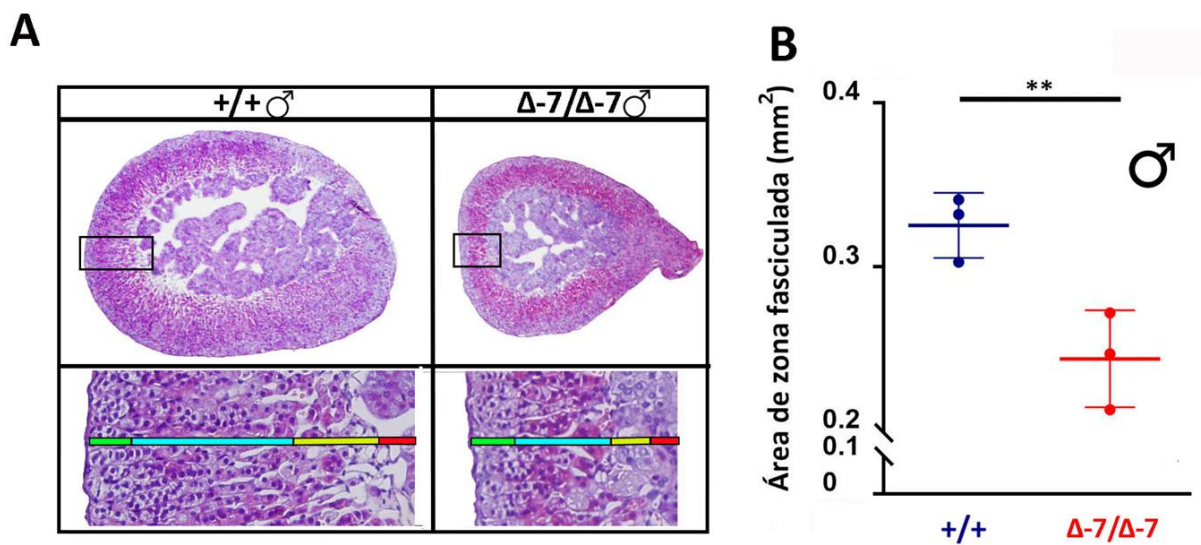


Figura 31. La zona fasciculada de la corteza adrenal se encuentra reducida en ratones machos P90 *Pomc*^{Δ-7/Δ-7}. Cortes en parafina de la glándula adrenal derecha de ratones machos P90 *Pomc*^{+/+} (n=3) y *Pomc*^{Δ-7/Δ-7} (n=3) teñidas con hematoxilina (violeta) y eosina (rosa). Sobre la línea media se indica la extensión de la Zona Glomerular (ZG, línea verde), la Zona Fasciculada (ZF; línea celeste) y la Zona Reticular (ZR; línea amarilla). Médula (M; línea roja). **B**, Área de la zona fasciculada de la corteza adrenal derecha, medida a partir de cortes histológicos mediante una herramienta del programa ImageJ. Los valores corresponden al promedio ± SEM seguidos de un test *t* de Student de una cola. **P ≤ 0.01 (P=0.0084), t= 3.951 y df=4.

Respuestas conductuales a estresores en ratones deficientes en el *enhancer* -7kb

Dada la importancia de la expresión corticotrópica de *Pomc* y el tamaño de la zona fascicular de la glándula adrenal en la fisiología del eje HPA, nos propusimos investigar las posibles consecuencias de la ablación del *enhancer* -7kb en respuestas conductuales inducidas por la liberación de glucocorticoides ante la presentación de estresores ambientales en ratones mutantes para este *enhancer* y sus hermanos control. Basándonos en el modelo de *Single Prolonged Stress* (SPS) que combina diferentes estresores físicos y emocionales de manera consecutiva en un mismo día (Atrooz *et al.*, 2021), diseñamos una batería continua de tests conductuales incorporando tanto estímulos estresores agudos (una única exposición y de breve duración) como crónicos (aplicaciones repetidas y por períodos extendidos), y tanto físicos (test de natación forzada) como emocionales (prueba de campo abierto o el test de inmovilización) (**Figura 32**) de la que participaron ratones machos y hembras P90 *Pomc*^{+/+} y *Pomc*^{Δ-7/Δ-7} (n=6 de cada genotipo y sexo).

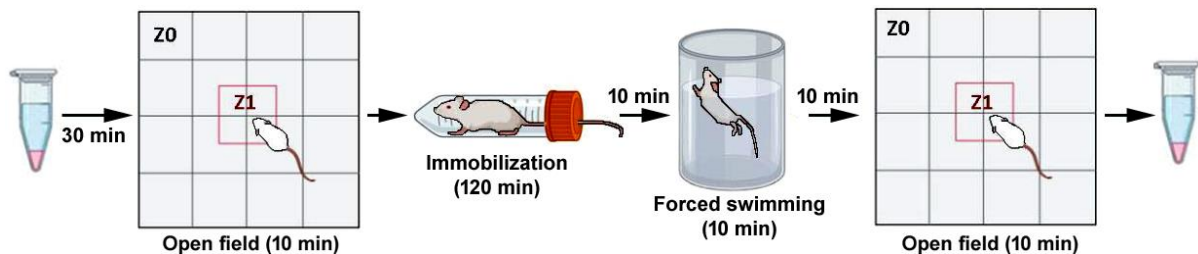


Figura 32. Batería de test conductuales utilizados en ratones P90 *Pomc*^{+/+} y *Pomc*^{Δ-7/Δ-7}, machos y hembras. Los microtubos de 1.5 ml representan la muestra de sangre recolectada, el cuadrículado la prueba de campo abierto, el tubo de 50 ml la prueba de inmovilización y el vaso de precipitados la prueba de natación forzada. **Z0**: Zona periférica, **Z1**: Zona central.

El experimento comenzó a las 8:30 AM, un momento de pleno silencio en el bioterio y donde los niveles basales de glucocorticoides son bajos por tratarse del comienzo del ciclo diurno (luces encendidas de 7 AM a 7 PM), con la toma de ~0.2 ml de sangre del plexo submandibular de cada ratón. El plasma fue separado por centrifugación y congelado para la posterior determinación de la concentración de corticosterona. Luego de 30 min de reposo en sus jaulas, los ratones iniciaron su pasaje por la serie de tests conductuales en el orden, tiempo y tiempos de descanso indicados en la **Figura 32**. Al finalizar la batería de tests conductuales

tomamos una segunda muestra de sangre para comparar los niveles de corticosterona plasmática con los basales recolectados al inicio del experimento.

La primera prueba realizada fue el “campo abierto” (*Open Field*, OF), un test que permite evaluar la conducta locomotora de ratones de manera individual (1) en un entorno ambiental novedoso (2), iluminado (3) y que presenta un espacio central alejado considerablemente de las paredes perimetrales (4), cuatro características que funcionan como estresores (Bailey *et al.*, 2009). El test del campo abierto permite evaluar también la conducta de los ratones en una situación de conflicto aproximación vs. evitación determinada por la tendencia espontánea de los roedores a recorrer fuentes potenciales de alimentos y al mismo tiempo evitar lugares potencialmente peligrosos. El resultado de estos conflictos puede medirse como la relación entre la distancia recorrida por los ratones en la periferia del campo abierto (zona Z0) y el área central más iluminada y desprotegida del tablero (zona Z1), o registrando el número de entradas a Z1 (**Figura 32**). Registramos los siguientes parámetros: 1) distancia ambulatoria recorrida total, 2) número de entradas a Z1 y 3) número de movimientos verticales (*rearing*), un tipo de conducta exploratoria de estímulos ambientales olfatorios que también se ve afectada en situaciones de estrés (Zimprich *et al.*, 2014). Con el objetivo de evaluar los efectos de la inmovilización por 2 h seguida del test de natación forzada, repetimos el test del OF y comparamos la conducta de los ratones respecto del test de OF inicial. En los dos OF, las distancias recorridas totales entre genotipos fueron similares en ambos sexos (**Figura 33**). También observamos que la distancia recorrida total en el segundo OF fue menor a la del primero en ratones de ambos genotipos y sexos, pero sin diferencias entre genotipos, ni en machos ni en hembras (**Figura 33**). Respecto al número de ingresos a la Z1, observamos una reducción considerable en el OF final respecto al inicial en ratones de ambos sexos y genotipos (**Figura 34**). Es notorio el dimorfismo sexual en esta conducta evidenciado por un mayor número de visitas a la zona Z1 en hembras de ambos genotipos (**Figura 34**).

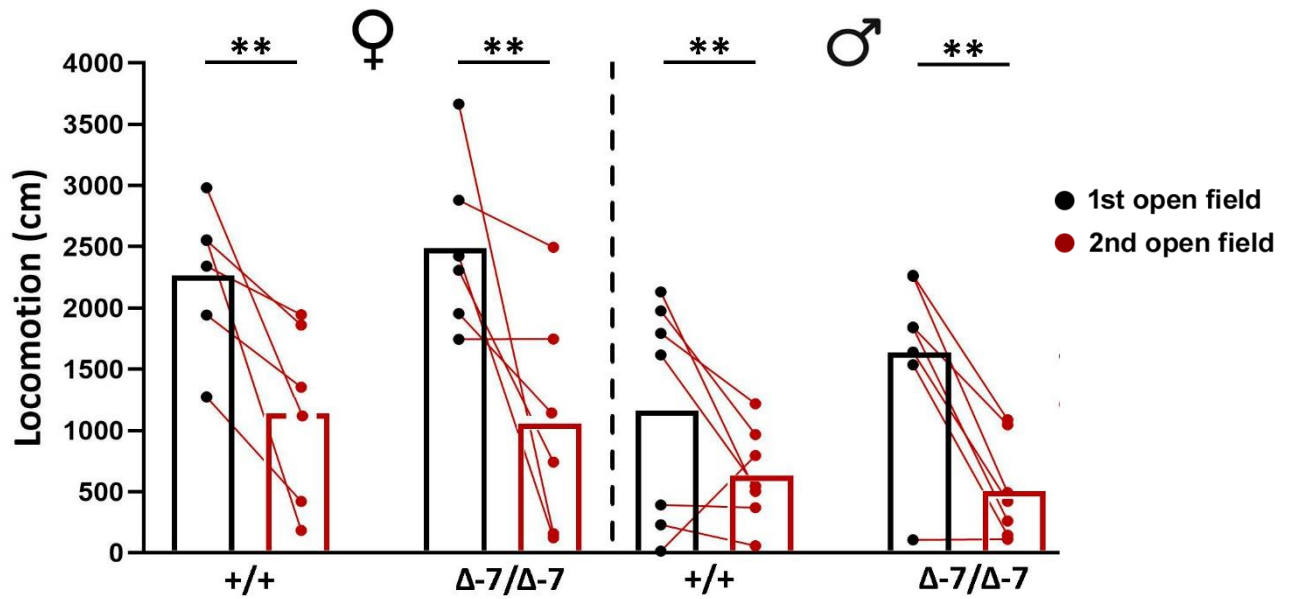


Figura 33. Distancia ambulatoria recorrida por hembras (izq.) *Pomc*^{+/+} (n=6) y *Pomc*^{Δ-7/Δ-7} (n=6) y machos (der.) *Pomc*^{+/+} (n=7) y *Pomc*^{Δ-7/Δ-7} (n=7) P90 evaluada antes y después de la batería de tests. Los círculos negros representan la distancia registrada en la primera prueba de OF y los rojos en la segunda. Las barras de error corresponden al SEM, la prueba estadística realizada en hembras fue two-way ANOVA: P=0.8209 comparando genotipos en cada test, **P ≤ 0.01 (P=0.0022) comparando el 1er OF vs 2do OF y, P=0.6373 para la interacción genotipo x test. El two-way ANOVA en machos: P=0.5604 comparando genotipos en cada test, **P ≤ 0.01 (P=0.0008) comparando el 1er OF vs 2do OF y, P=0.1335 para la interacción genotipo x test.

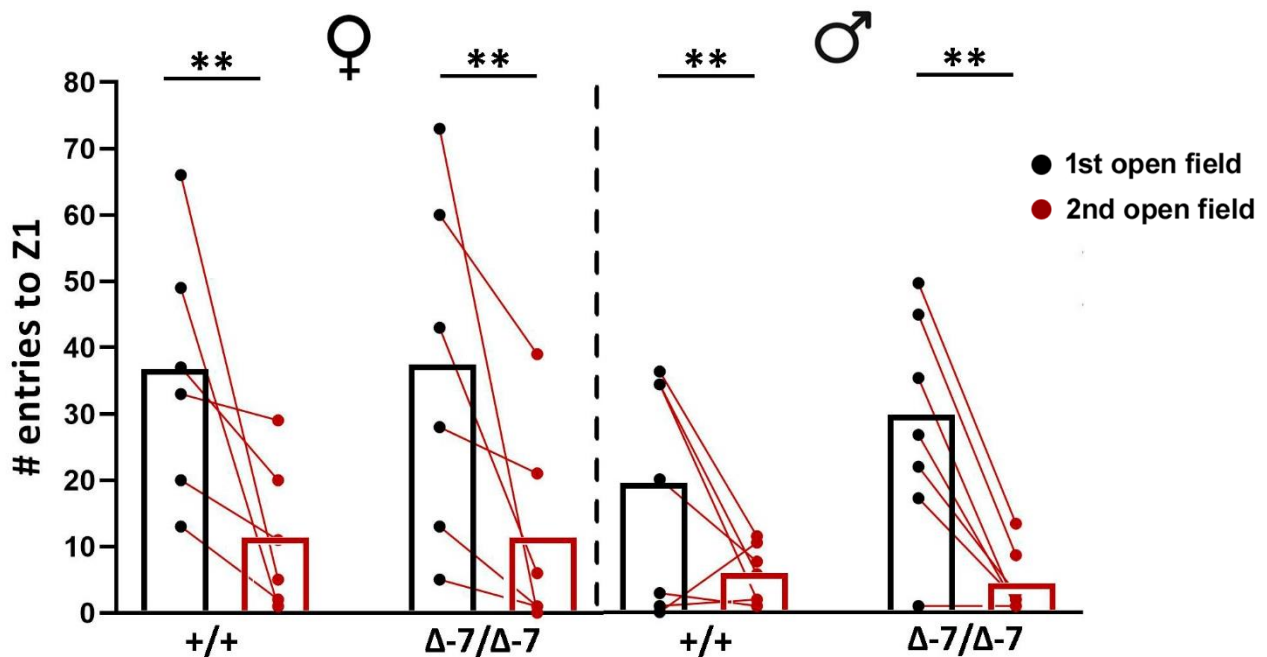


Figura 34. Número de entradas a la Z1 del tablero del campo abierto de hembras (izq.) P90 *Pomc*^{+/+} (n=6) y *Pomc*^{Δ-7/Δ-7} (n=6) y machos (der.) *Pomc*^{+/+} (n=7) y *Pomc*^{Δ-7/Δ-7} (n=7) registrado antes y después de la batería de tests. Los círculos negros representan los valores obtenidos en la primera prueba de OF y los rojos los obtenidos en la segunda prueba de OF. Las barras de error corresponden al SEM, la prueba estadística realizada en hembras fue Two-way ANOVA: P=0.9689 comparando genotipos en cada test, **P ≤ 0.01 (P=0.0054) comparando el 1er OF vs 2do OF y, P=0.9639 para la interacción genotipo x test. El two-way ANOVA en machos: P=0.4496 comparando genotipos en cada test, **P ≤ 0.01 (P=0.0007) comparando el 1er OF vs 2do OF y P=0.1899 para la interacción genotipo x test.

La exploración vertical (*rearing*) es una conducta instintiva y habitual de los roedores en la cual, al sentarse sobre sus patas traseras, pueden elevar su tronco, cuello y cabeza y así detectar posibles estímulos olfativos volátiles imperceptibles o enmascarados durante la locomoción tetrápoda, especialmente en roedores de patas cortas como los ratones. Esta conducta es dependiente del contexto y por lo general disminuye en animales estresados (Sturman *et al.*, 2018; Seibenhener y Wooten., 2015). Con el objetivo de evaluar el efecto de estresores en la conducta de *rearing* en ratones $Pomc^{+/+}$ y $Pomc^{\Delta-7/\Delta-7}$, registramos estos eventos en ratones de ambos genotipos y sexos durante el 1er OF y en el 2do, realizado luego de las pruebas con estresores. Observamos que la cantidad de movimientos de *rearing* en hembras de ambos genotipos no resultó diferente en el 1er OF ni en el 2do. Tampoco resultó diferente la comparación de hembras $Pomc^{+/+}$ y $Pomc^{\Delta-7/\Delta-7}$ entre ambos tests (Figura 35, izq.). En machos, en cambio, registramos una marcada disminución en el número de eventos de *rearing* realizados por ratones $Pomc^{\Delta-7/\Delta-7}$ respecto a sus hermanos $Pomc^{+/+}$ (Figura 35, der.).

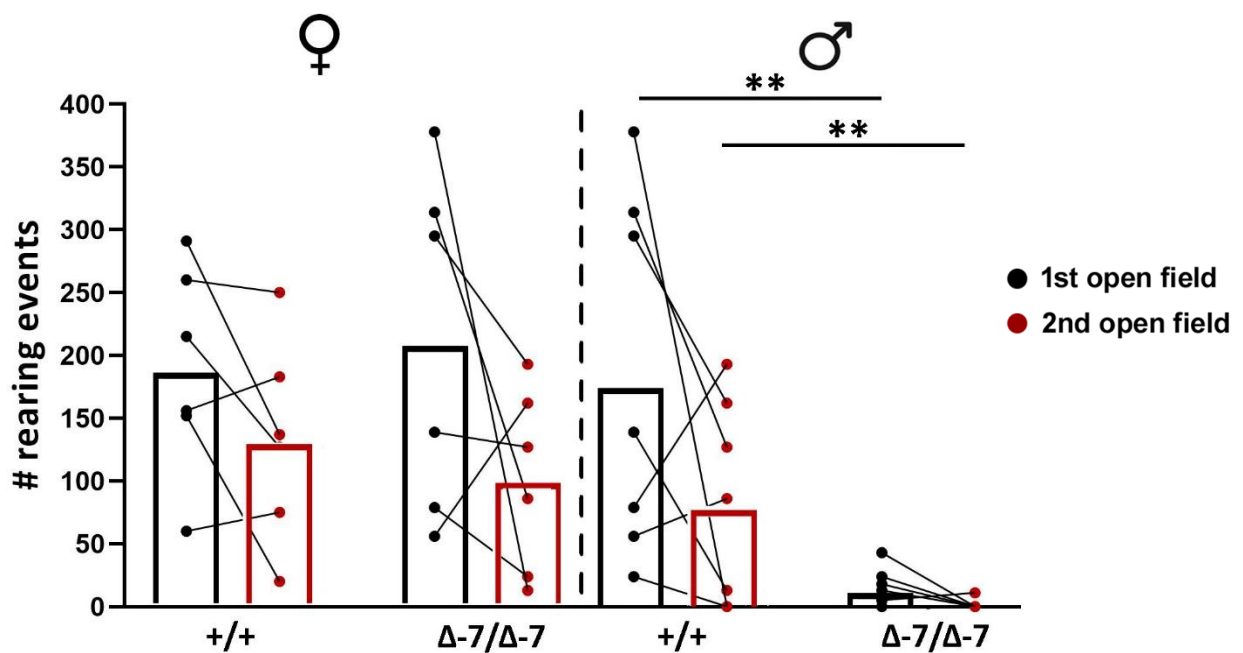


Figura 35. Los ratones realizaron menos *rearing* luego de ser sometidos a una batería de test conductuales. Número de movimientos verticales realizados por hembras P90 $Pomc^{+/+}$ (n=6) y $Pomc^{\Delta-7/\Delta-7}$ (n=6) y machos $Pomc^{+/+}$ (n=7) y $Pomc^{\Delta-7/\Delta-7}$ (n=7), de izquierda a derecha respectivamente, expresado en valor absoluto y evaluados antes y después de la batería de tests. Con puntos negros se representan los valores obtenidos en la primera prueba de OF y con triángulos verdes los cuantificados en la última prueba de OF. Las barras de error corresponden al SEM, la prueba estadística realizada fue 2 way ANOVA con un valor de $P=0.5012$ para la interacción, $P=0.9060$ para el genotipo, $P=0.0509$ para el OF inicial vs final y $P=0.384$ para cada animal, en hembras. $P=0.1780$ para la interacción, $**P \leq 0.01$ ($P=0.0019$) para el genotipo, $P=0.0874$ para el OF inicial vs final y $P=0.4538$ para cada animal, en machos.

Debido a la diferencia detectada en el número de *rearings* realizados por ratones machos P90 de diferentes genotipos, decidimos evaluar la variación (delta) de esta conducta en cada individuo. Para ello, calculamos la diferencia entre el número de movimientos verticales realizados en el 2do OF vs. el número de movimientos verticales realizados en el 1ro (**Figura 35 bis**).

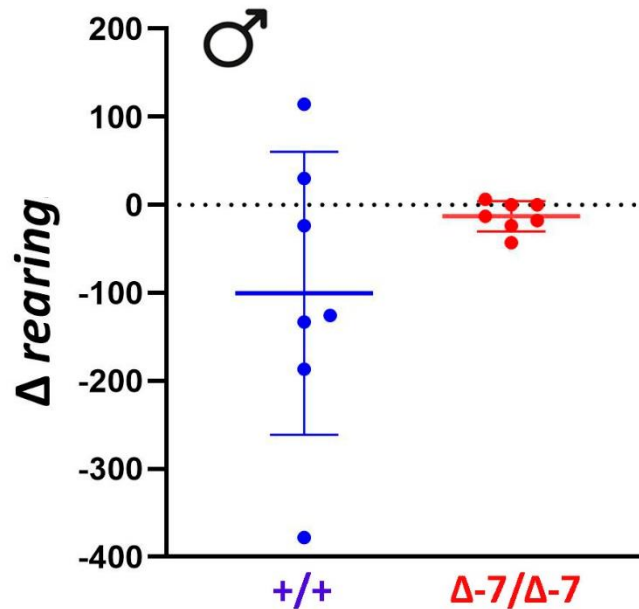


Figura 35 bis: Ratones machos P90 tuvieron la misma variación de *rearing* en el test del Open Field. Delta de movimientos verticales realizados en machos P90 *Pomc*^{+/+} (n=7) y *Pomc*^{Δ7/Δ7} (n=7), expresado en valor absoluto y calculado como la diferencia entre el número de movimientos verticales realizados en el 2do OF respecto al 1ro en cada ejemplar. Con puntos azules se indica el delta de movimientos calculado para los ratones WT y con rojo para los KO. Los valores indican el promedio $\pm$ SEM, test *t* de *Student* de una cola. $P=0.0890$, $t=1.431$, $df=12$.

A partir de estos resultados podemos notar que no se registraron diferencias en el delta de *rearings* realizados por ratones machos P90 de ambos genotipos. Como consecuencia, podemos concluir que los ratones machos tienen la misma capacidad de responder a un evento de estrés sostenido independientemente del genotipo.

La discrepancia obtenida entre los dos resultados de la misma variable (*rearing*) se debe a que, en el primer análisis, se realiza una comparación grupal (genotipo) por el contrario en el segundo análisis, el delta se calcula a nivel individuo.

Al concluir los experimentos conductuales medimos los niveles basales y post estrés de corticosterona plasmática en hembras *Pomc*^{+/+} y *Pomc*^{Δ-7/Δ-7} mediante un kit de ELISA. Los resultados demuestran que los tests estresores elevaron varias veces la concentración de

corticosterona plasmática en ambos grupos sin detectarse diferencias significativas entre genotipos, ni en los valores basales ni en los posts estrés (**Figura 36**). Estos últimos valores mostraron una gran dispersión probablemente debido a la alta variabilidad con que cada ratón responde a idénticos estresores ambientales.

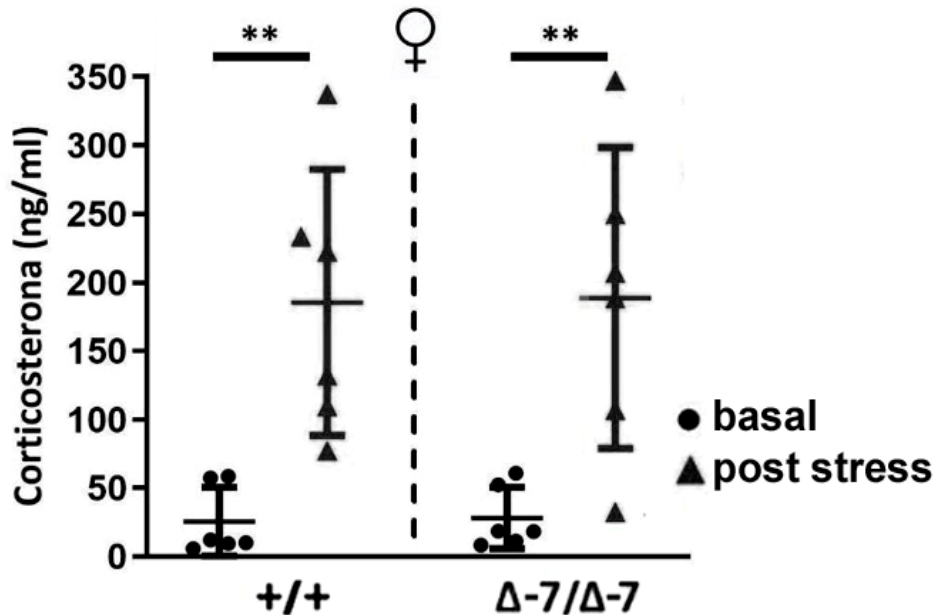


Figura 36. Corticosterona plasmática en hembras *Pomc*^{+/+} y *Pomc*^{Δ7/Δ7}. Concentración plasmática de corticosterona en hembras *Pomc*^{+/+} (n=6) y *Pomc*^{Δ7/Δ7} (n=6), antes y después de ser sometidas a la batería de pruebas conductuales de la **Figura 32**. Las barras de error corresponden al SEM, ANOVA de 2 vías: P=0.9187 para la comparación entre genotipos, **P ≤ 0.01 para la comparación entre basal y post estrés (P=0.0006) y P=0.9931 para la interacción entre genotipo y pre/post.

El conjunto de los resultados de esta sección indica que, a pesar de tener un subdesarrollo muy marcado en la zona fascicular de la corteza adrenal (**Figuras 30 y 31**), los ratones *Pomc*^{Δ7/Δ7} de ambos sexos reaccionan de manera similar a sus herman.s *Pomc*^{+/+} luego de participar de pruebas altamente estresantes, tanto en los cambios conductuales como en la elevación de los niveles plasmáticos de corticosterona. Esta aparente contradicción probablemente se deba a que la corteza suprarrenal cuenta con una gran reserva funcional de glucocorticoides. Por ejemplo, estudios clínicos en pacientes con la enfermedad de Addison que cursan con atrofia adrenal progresiva muestran que hasta un 10% del tejido remanente tiene la capacidad de responder a estresores liberando glucocorticoides en concentraciones normales (Narváez-Casillas *et al.*, 2012).

Análisis espacio-temporal de la expresión de un gen reportero dirigido por el *enhancer* -7 kb en un modelo de ratón transgénico

Si bien el grupo de Drouin intentó determinar el territorio de expresión de un gen reportero (*lacZ*) dirigido por el *enhancer* -7 kb en ratones transgénicos, los estudios realizados fueron muy preliminares e incompletos (Langlais *et al.*, 2011) debido a que sólo fueron analizados en hipófisis de ratones fundadores F0 al día embrionario E17.5 (**Figura 7**). Con el objetivo de estudiar en mayor profundidad el patrón espacio-temporal de expresión controlado por este *enhancer* generamos ratones transgénicos portadores de una construcción que contiene al *enhancer* -7 kb fusionado al promotor mínimo de *Sonic hedgehog homolog* de ratón (*Shh*) dirigiendo la expresión del gen reportero *lacZ*. Para este estudio seguimos la metodología enSERT desarrollada por el grupo de Len Pennacchio de la Universidad de California en Berkeley (Kvon *et al.*, 2020). EnSERT utiliza la tecnología de CRISPR/Cas9 para integrar cualquier tipo de transgén en un sitio específico del genoma mediante recombinación homóloga, evitando así los efectos posicionales típicamente presentes en los ratones transgénicos clásicos generados por inserción aleatoria de los transgenes en sitios diferentes del genoma y en distinto número de copias en cada ratón. Uno de los sitios propuestos por enSERT para dirigir transgenes es el *locus Hipp11* (H11) presente en el cromosoma 11 de ratón, definido como una región “inerte” o “segura” del genoma en virtud de que es capaz de incorporar transgenes foráneos sin alterar el desarrollo embrionario ni la fisiología de los ratones transgénicos, ni poseer *enhancers* vecinos que modifiquen la expresión de los transgenes (Tasic *et al.*, 2011). El promotor mínimo de *Shh* fue seleccionado por el proyecto enSERT al mostrar expresión basal mínima de *lacZ* en embriones transgénicos incluso menor al del promotor mínimo clásico del gen *Hsp68* (Kvon *et al.*, 2020).

Para construir el transgén -7kb*Pomc-lacZ*, amplificamos por PCR un fragmento de 1044 pb del genoma de un ratón FVB/NJ que incluye la región conservada -7 kb del *locus* de *Pomc* y lo subclonamos en el vector pGEM-T Easy, que tiene en ambos brazos del *polylinker* sendos sitios de corte para la enzima de restricción NotI. Utilizando esta enzima aislamos y purificamos una gran cantidad del fragmento -7kb*Pomc* con extremos cohesivos NotI que luego ligamos al plásmido PCR4-*Shh::lacZ*-H11 (mapa completo en addgene.org/139098) linearizado en el único sitio NotI, previamente desfosforilado para evitar su religación. En el plásmido PCR4-*Shh::lacZ*-H11 (12kb), el único sitio NotI está ubicado inmediatamente río

arriba del promotor mínimo de *Shh* (*Shh* mp) seguido de secuencias codificantes del gen β -galactosidasa de *E. coli* (*lacZ*). Estas secuencias se encuentran flanqueadas en los extremos 5' y 3' por fragmentos de 2333 y 2290 pb del *locus H11*, respectivamente (**Figuras 37 y 38**). Inicialmente obtuvimos un plásmido con dos copias en tándem en orientación 5' $\rightarrow$ 3' del fragmento del *enhancer -7kbPomc*. La presencia de un único sitio de corte para la enzima de restricción *Xma*I en la secuencia del *enhancer -7kbPomc* dentro del plásmido PCR4-7kb*Pomc*(x2)-*Shh::lacZ*-H11 (**Figura 37A**) nos permitió construir el plásmido PCR4-7kb*Pomc*-*Shh::lacZ*-H11 con una sola copia del *enhancer* (**Figura 37B**).

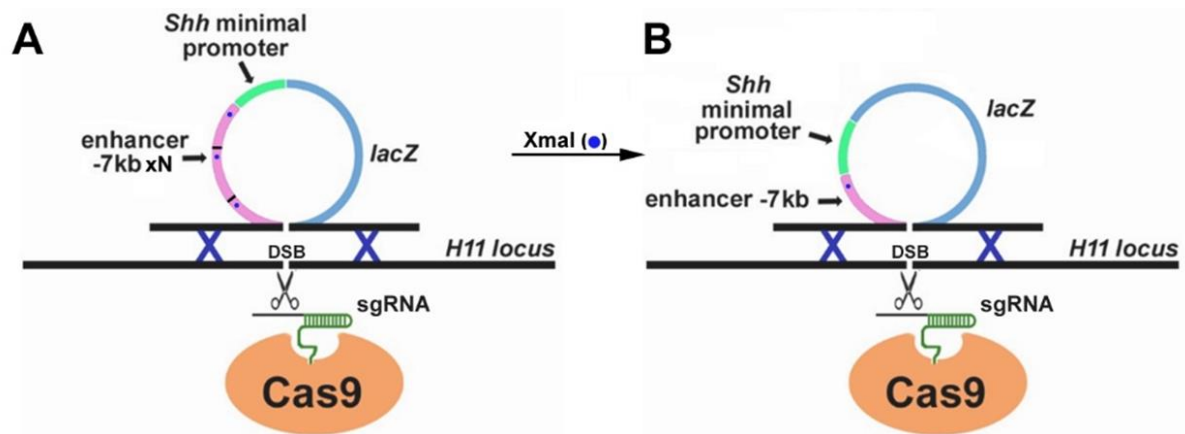


Figura 37. Esquemas de inserción de los transgenes -7kb*Pomc*(x2)-*lacZ* (A) y -7kb*Pomc*-*lacZ* (B) en el *locus H11* del genoma del ratón mediante recombinação homóloga guiada por el sistema CRISPR/Cas9. En la parte superior se representan los transgenes con los brazos de homología (negro) y en la parte inferior el *locus H11*. El círculo azul representa sitios *Xma*I. La tijera indica el sitio de corte doble cadena (DSB) y las cruces azules posibles eventos dobles de recombinação homóloga a ambos extremos del sitio de corte confirmados por PCR (**Figura 39**).

Como control negativo de la expresión de *lacZ* en ausencia del *enhancer -7kb* generamos también ratones transgénicos con el plásmido PCR4-*Shh::lacZ*-H11 (**Figura 38**).

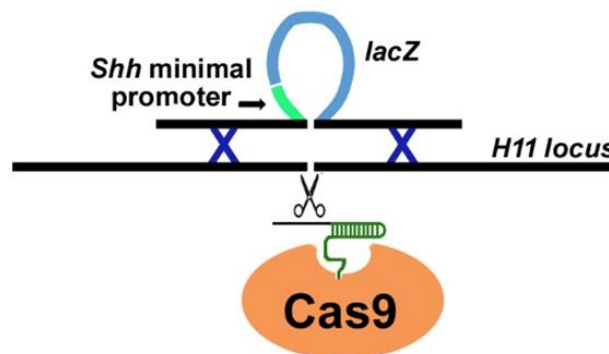


Figura 38. Esquema del transgén *Shhmp-lacZ* a insertarse en el *locus H11* de ratones a ser utilizados como controles negativos. Los brazos de homología del transgén se indican en negro. La tijera indica el sitio de corte doble cadena (DSB) y las cruces azules posibles eventos dobles de recombinação homóloga a ambos extremos del sitio de corte confirmados por PCR (**Figura 39**).

Para determinar el número de copias clonadas en la primera construcción, digerimos el plásmido con la enzima de restricción BamHI la cual corta al plásmido H11 en dos sitios dando lugar a un fragmento de 7456 pb y otro variable de 5151, 6195 y 7239pb cuando el fragmento no está, cuando hay una copia o cuando hay dos copias del enhancer clonadas respectivamente (Figura 38 bis).

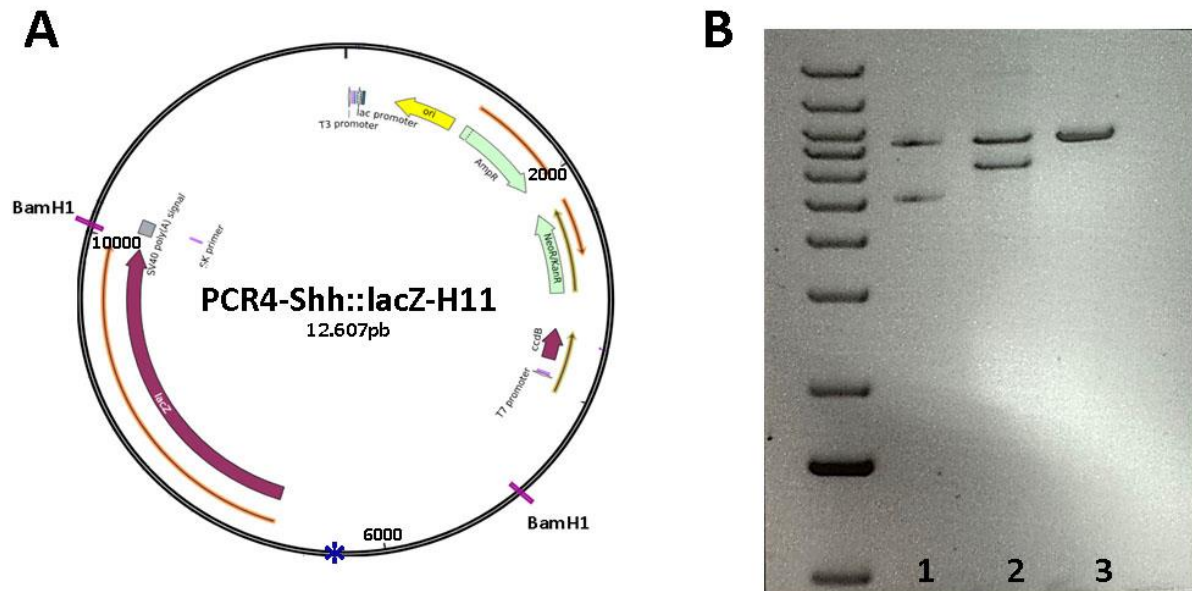


Figura 38 bis. Esquema del plásmido PCR4 Shh:: lacZ – H11 digerido con BamHi. (A) Esquema del plásmido PCR4 Shh:: lacZ – H11, con violeta se indica los dos sitios de cortes de la enzima de restricción BamHI y con asterisco azul el sitio donde se inserta el enhancer -7kb. (B) Gel de agarosa donde se muestra los dos fragmentos al digerir las distintas construcciones plasmídicas con la enzima de restricción BamHI. 1- Digestión del plásmido sin inserto, 2- digestión del plásmido con una única copia del enhancer -7kb de *Pomc*, 3- Digestión del plásmido con dos copias del enhancer -7 kb de *Pomc*.

Los plásmidos PCR4-7kb*Pomc*(x2)-Shh::lacZ-H11, PCR4-7kb*Pomc*-Shh::lacZ-H11 y PCR4-Shh::lacZ-H11 fueron independientemente microinyectados en cigotas de ratones FVB/NJ junto a mRNA de *cas9* de *S. pyogenes* y una guía de RNA (sgRNA) para dirigir Cas9 a un sitio específico del *locus H11* localizado entre los dos brazos de homología presentes en el vector e inducir un doble corte de ADN en ambas cadenas enriqueciendo así la probabilidad de eventos de recombinación homóloga (**Figuras 37 y 38**). Los ratones nacidos de cigotas microinyectadas fueron genotipados por PCR con un par de primers específicos común para los 3 transgenes que permitieron la identificación de un F0 positivo para cada transgén (**Figura 39A y C**). Análisis por PCR en los extremos 5' y 3' demostraron que el transgén fue incorporado por recombinación homóloga en el *locus H11* en los 3F0s generados (**Figura 39A y B**). Al llegar a la madurez sexual, estos ratones transgénicos fundadores fueron apareados con ratones

FVB/NJ *wild-type* para establecer colonias de ratones F1 con los que evaluamos la expresión de *lacZ*, en todos los casos en ratones transgénicos (*knockin*) heterocigotas (**Figura 39C**).

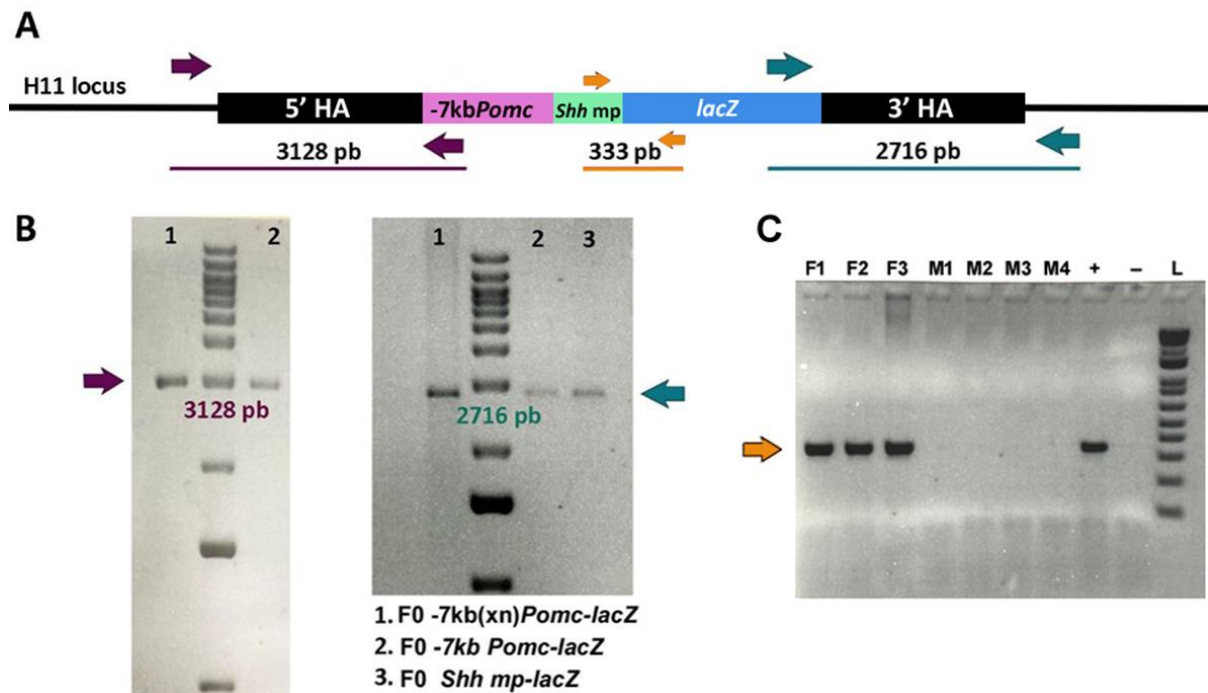


Figura 39. Inserción del transgén -7kbPomc-lacZ en el locus *H11* del genoma del ratón mediante recombinación homóloga guiada por el sistema CRISPR/Cas9. Verificación por PCR de eventos de inserción por recombinación homóloga en *H11*. Para ambos extremos el primer externo hibrida por fuera de los brazos de homología presentes en el plásmido microinyectado. Los primers indicados en violeta confirman eventos de recombinación homóloga en el extremo 5' de *H11* y los verdes en el 3' (**A,B**). Los primers indicados en naranja se utilizaron para genotipar la presencia de los transgenes en ADN genómico de los ratones generados (**A,C**). Genotipación de una camada de hembras (F) y machos (M) F1 -7kbPomc-lacZ. La presencia del transgén en ADN genómica se identifica con la presencia de la banda de 333 pb (**C**).

Cabe destacar que la expresión del reportero en estos animales transgénicos será diferente a la expresión de LacZ observada en los E17.5 FO transgénicos generados por el laboratorio de J. Drouin, ya que ellos utilizan como promotor mínimo al promotor endógeno del gen de *Pomc*, mientras que nosotros en estas construcciones utilizamos el promotor mínimo de Sonic hedgehog homolog de ratón (*Shh*).

Análisis de expresión de *lacZ* en ratones transgénicos -7kbPomc(x2)-lacZ

Evaluamos el patrón espacio-temporal de expresión del gen reportero *lacZ* dirigido por múltiples copias en tándem del *enhancer* -7kb de *Pomc* primero en embriones E13.5, edad en la cual ya es evidente la expresión de *Pomc* en el manto del hipotálamo medio basal y en la capa ventral del primordio del lóbulo anterior hipofisario (**Figura 40A**), sin detectarse aún

expresión de *Pomc* en el lóbulo intermedio. La **Figura 40B** muestra la expresión de *lacZ* en un corte sagital de embrión E13.5 -7kb*Pomc*(x2)-*lacZ* comparable al de la **Fig. 40A**. La marca azul detectada en la zona ventral del *Rathke's pouch* es compatible con expresión reportera en corticotropos, sin observarse expresión transgénica ni en melanotropos ni en el hipotálamo (**Figura 40B**).

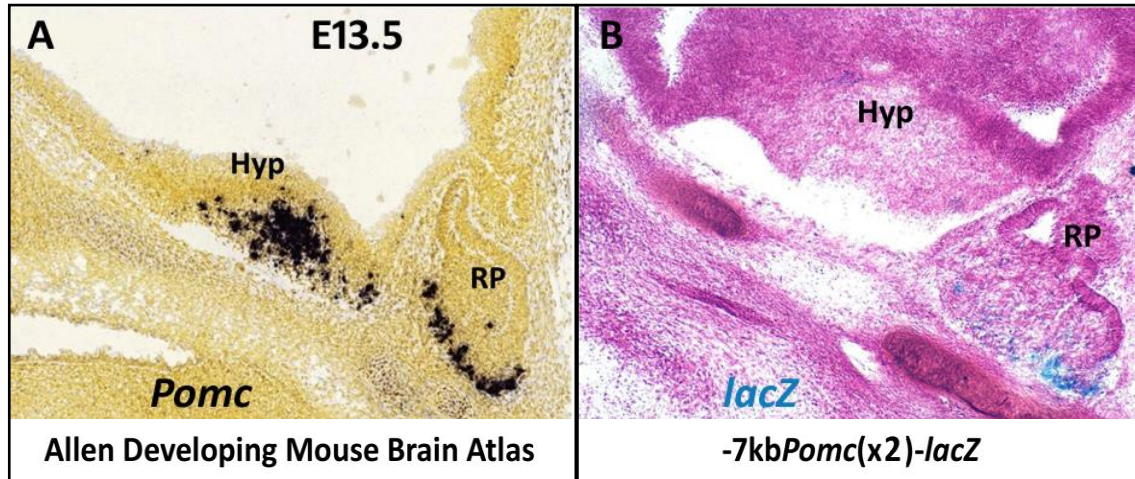


Figura 40. **A**, imagen del Allen Developing Mouse Brain Atlas mostrando la localización de la expresión de *Pomc* en un corte sagital de ratón E13.5. **B**, corte sagital de un embrión -7kb*Pomc*(x2)-*lacZ* E13.5 incubado con X-gal y contrateñido con Neutral red. Hyp: hipotálamo; RP: Rathke's pouch.

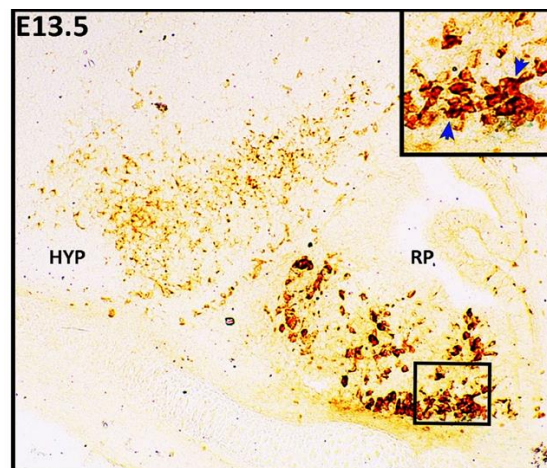


Figura 41. Corte sagital de un embrión -7kb*Pomc*(x2)-*lacZ* de E13.5 incubado con X-gal (azul) seguido de un anticuerpo anti-ACTH revelado con DAB (marrón). La imagen del recuadro muestra a mayor aumento colocolización de ambas marcas (puntas de flechas azules). HYP: hipotálamo; RP: Rathke's pouch.

En la **Figura 41** se observan los resultados de un experimento de doble marcación en donde cortes coronales de embriones -7kb*Pomc*(x2)-*lacZ* de E13.5 fueron incubados con X-gal y luego con un anticuerpo anti-ACTH revelado con DAB para visualizar la expresión transgénica de *lacZ* y la endógena de *Pomc*, respectivamente.

Evalúamos también la expresión de *lacZ* en ratones adultos (P90) *-7kbPomc(x2)-lacZ*. Tinciones con X-gal de hipófisis completas (*whole mount*) mostraron una marcada señal azul en células de los lóbulos intermedios y anterior, presumiblemente correspondientes a melanotropos y corticotropos (**Figura 42**).

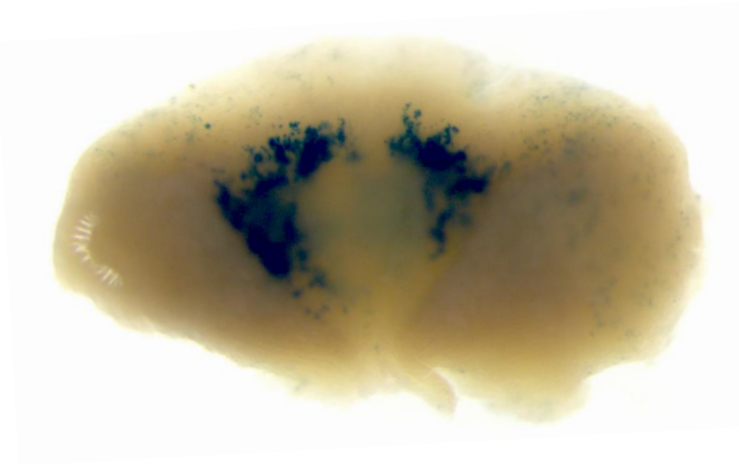


Figura 42. Expresión de *lacZ* en una hipófisis completa de un ratón adulto *-7kbPomc(x2)-lacZ* incubada con X-gal mostrando marca azul en células de los lóbulos intermedios y anterior.

Cortes coronales de hipófisis de ratones adultos *-7kbPomc(x2)-lacZ* fueron incubados con X-gal y luego con un anticuerpo anti-ACTH, seguido de un anticuerpo 2^{do} anti-conejo acoplado a peroxidasa de rabanito y revelado con DAB para visualizar la expresión transgénica de *lacZ* y la endógena de *Pomc*, respectivamente (**Figura 43**). Los resultados muestran que el transgén se expresa tanto en melanotropos del lóbulo intermedio como en corticotropos del lóbulo anterior, en hembras (**Fig. 43, izq.**) y en machos (**Fig. 43, der.**).

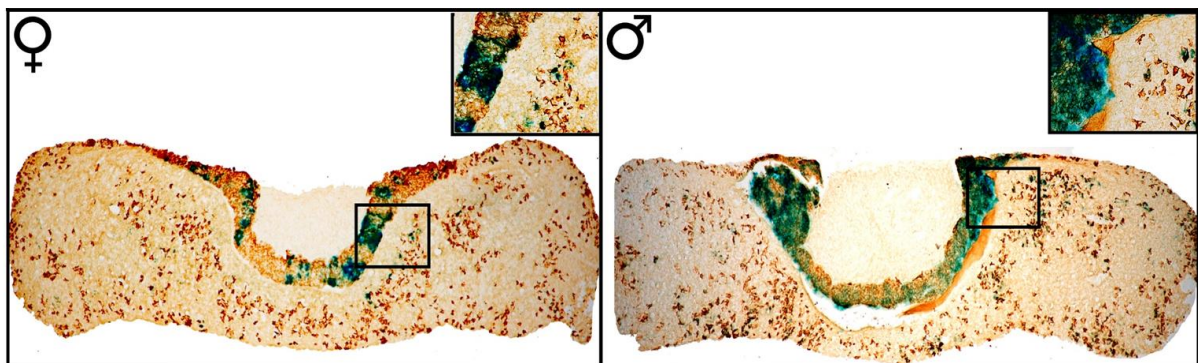


Figura 43. Cortes coronales de hipófisis de ratones P90 hembra (izq.) y macho (der.) *-7kbPomc(x2)-lacZ* incubados con X-gal (azul) seguido de un anticuerpo anti-ACTH revelado con DAB (marrón). Los recuadros muestran a mayor aumento la colocalización de ambas marcas tanto en melanotropos como en corticotropos.

El análisis de expresión de *lacZ* en el núcleo arcuato del hipotálamo lo realizamos de manera similar a los cortes hipofisarios. Cortes coronales de cerebro de ratones adultos -7kb*Pomc*(x2)-*lacZ* fueron incubados con X-gal y luego con un anticuerpo anti-ACTH, seguido de un anticuerpo 2rio anti-conejo acoplado a peroxidasa de rabanito y revelado con DAB para visualizar la expresión transgénica de *lacZ* y la endógena de *Pomc*, respectivamente (**Figura 44**). Si bien numerosas neuronas hipotalámicas de POMC (ACTH+) contienen marca de X-gal (**Fig. 44, izq.**) también observamos abundante expresión ectópica del transgén distribuida en todo el hipotálamo y en otras regiones del cerebro, así como muchas neuronas de POMC sin expresión de *lacZ*. También observamos que la expresión de *lacZ* en los distintos cerebros analizados es variable (comparar Fig. 44 izq. vs. der.), heterogeneidad observada tanto en hembras como en machos. Con el objetivo de disminuir los niveles variables de expresión ectópica del transgén -7kb*Pomc*(x2)-*lacZ* decidimos analizar ratones -7kb*Pomc*-*lacZ*, portadores de una única copia del *enhancer*.

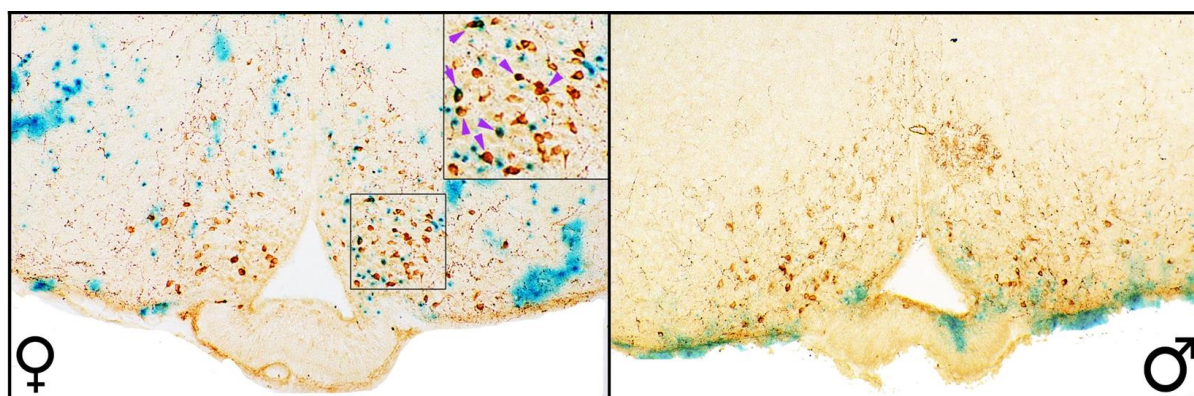


Figura 44. Cortes coronales del hipotálamo de ratones P90 hembra (izq.) y macho (der.) -7kb*Pomc*(x2)-*lacZ* a la altura de la eminencia media incubados con X-gal (azul) seguido de un anticuerpo anti-ACTH revelado con DAB (marrón). El recuadro muestra a mayor aumento la colocalización de ambas marcas en neuronas del núcleo arcuato (puntas de flecha violetas).

Análisis de la expresión de *lacZ* en ratones transgénicos -7kb*Pomc*-*lacZ*

Evaluamos el patrón de expresión del gen reportero *lacZ* dirigido por una única copia del *enhancer* -7kb de *Pomc* en embriones E15.5, edad en la cual *Pomc* se expresa tanto en el hipotálamo medio basal como en el lóbulo anterior e intermedio de la hipófisis (**Figura 45 izq.**). La expresión de *lacZ* en cortes sagitales comparables de embriones -7kb*Pomc*-*lacZ* de E15.5 resulta evidente con una copiosa marca azul en los lóbulos anterior e intermedio de la hipófisis en desarrollo, compatible con expresión reportera en corticotropos y melanotropos (**Figura 45 medio**). En esos mismos cortes no se observa expresión de *lacZ* en el hipotálamo.

Los embriones E15.5 portadores del transgén *Shhmp-lacZ* utilizados como control negativo no muestran expresión de *lacZ* en el cerebro ni en la hipófisis (**Figura 45 der.**), indicando que la marca azul observada se debe a la actividad del *enhancer* -7 kb en el transgén.

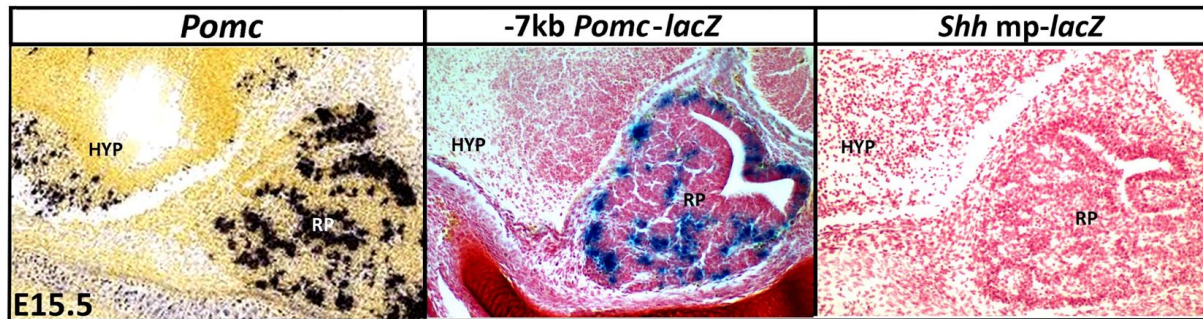


Figura 45. Análisis de expresión del gen reportero en ratones -7kb*Pomc-lacZ* y *Shhmp-lacZ* en cortes sagitales de embriones E15.5. Izq., Expresión de *Pomc* en el hipotálamo y la hipófisis tomada del Allen Developing Mouse Brain Atlas. Centro, tinción con X-gal de un embrión E15.5 -7kb*Pomc-lacZ*. Der. tinción con X-gal de un embrión de E15.5 *Shhmp-lacZ*. HYP: hipotálamo; RP: Rathke's pouch.

Evaluamos también la expresión de *lacZ* en ratones adultos (P90) -7kb*Pomc-lacZ*. Tinciones con X-gal de hipófisis completas (*whole mount*) mostraron una marcada señal azul en células del lóbulo intermedio, presumiblemente correspondientes a melanotropos.

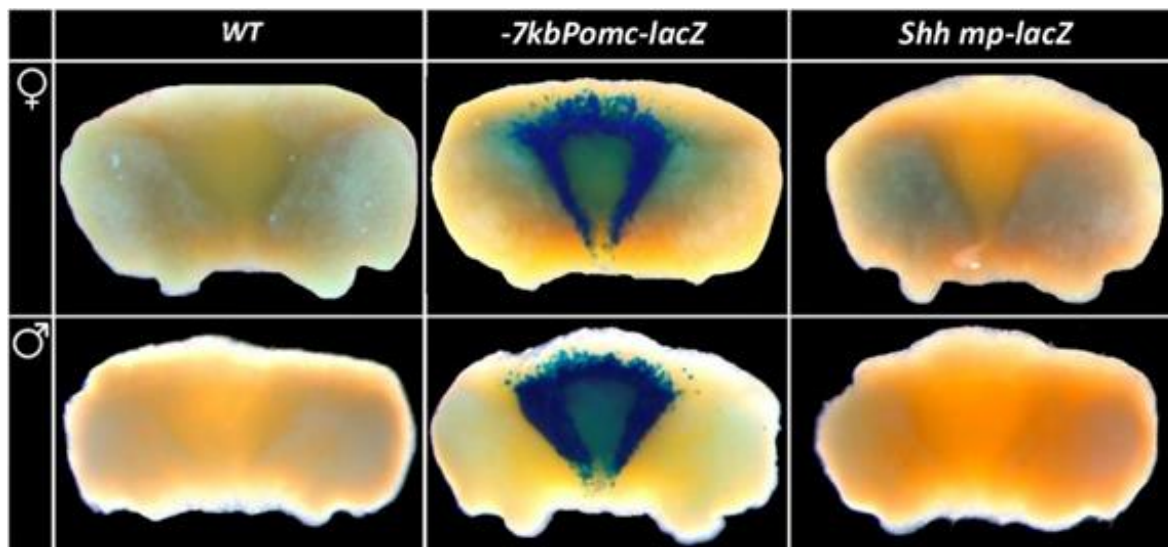


Figura 46. El *enhancer* -7 kb tiene la capacidad de dirigir la expresión de *lacZ* en melanotropos. Patrón de expresión de *lacZ* en la hipófisis de ratones P90 FVB/NJ *wild-type* (izq.), -7kb*Pomc-lacZ* (medio) y *Shh mp-lacZ* (der.), hembras (arriba) y machos (abajo). Imágenes tomadas con microscopio estereoscópico Leica, aumento 4X.

Cortes coronales de hipófisis de ratones P90 *-7kbPomc-lacZ* fueron incubados con X-gal para visualizar la expresión transgénica de *lacZ* (**Figura 47**). Los resultados muestran que el transgén se expresa copiosamente en los melanotropos del lóbulo intermedio tanto en hembras (**Fig. 47, arriba izq.**) como en machos (**Fig. 47, abajo izq.**). Los ratones *Shhmp-lacZ* no muestran marca del gen reportero en el lóbulo intermedio (**Fig. 47, der.**), indicando que la marca azul observada en melanotropos se debe a la actividad del *enhancer* -7 kb en el transgén. En el lóbulo anterior no llega a apreciarse un nivel de marca concluyente como la detectada en la línea -7kb *Pomc* (x2) *LacZ* indicando que una sola copia del *enhancer* resulta insuficiente en este modelo experimental.

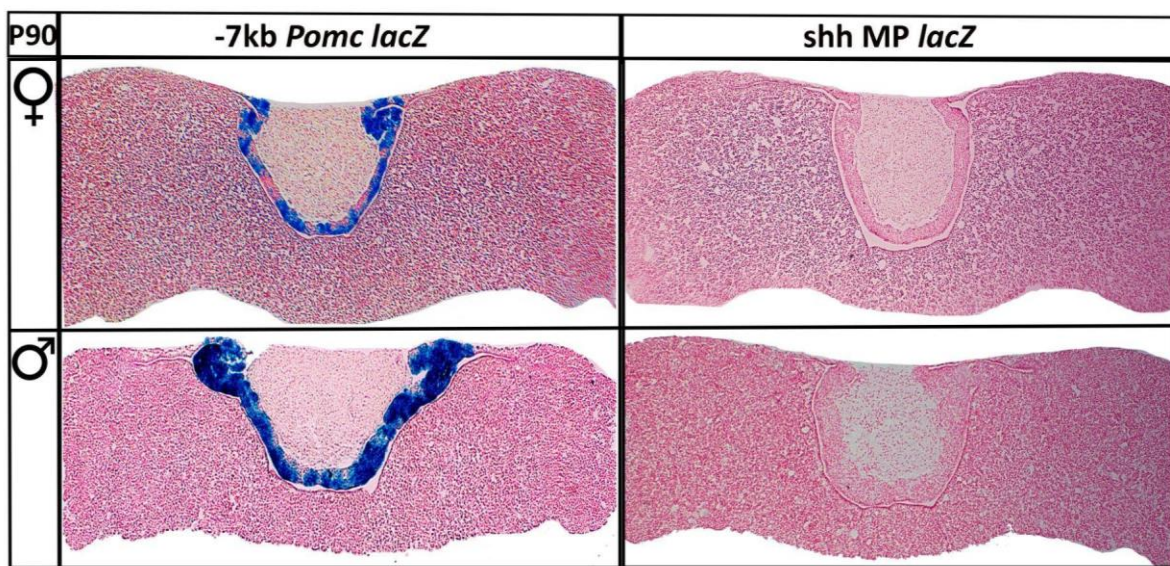


Figura 47. Cortes coronales de hipófisis de ratones P90 hembra (arriba) y machos (abajo) *-7kbPomc-lacZ* (izq.) y *Shhmp-lacZ* (der.) incubados con X-gal (azul) y contrateñidos con Neutral red. Los recuadros muestran a mayor aumento la marca en melanotropos y corticotropos.

Contrario a lo que ocurre en E15.5 *-7kb Pomc LacZ* donde es la expresión del reportero es muy marcada en el lóbulo anterior, en adultos es indetectable. La incapacidad del *enhancer* para dirigir la expresión del reportero *LacZ* en ratones adultos podría explicarse por el papel inhibitorio que desempeñan los GR en la expresión de *Pomc* en corticotropos. Para que los GR puedan comportarse como un FT necesitan tener unido a ellos los GC. Ocurre que en adultos la síntesis y liberación de GC depende exclusivamente de la glándula suprarrenal. Por el contrario, en embriones, esta hormona es parcialmente sintetizada por el embrión ya que una parte proviene de la madre (Bursada y Cidlowski, 2017). Esta diferencia en la capacidad de síntesis de GC en distintas etapas de la vida del animal, podría estar influyendo en la regulación transcripcional del gen.

En un mismo experimento, analizamos la expresión del reportero *LacZ* en secciones del ARC. Para ello, realizamos cortes coronales del cerebro de ratones P90 *-7kbPomc-lacZ* y *Shh mp-lacZ*, los incubamos con X-gal (**Figura 48**) y contrateñimos con Neutral red.

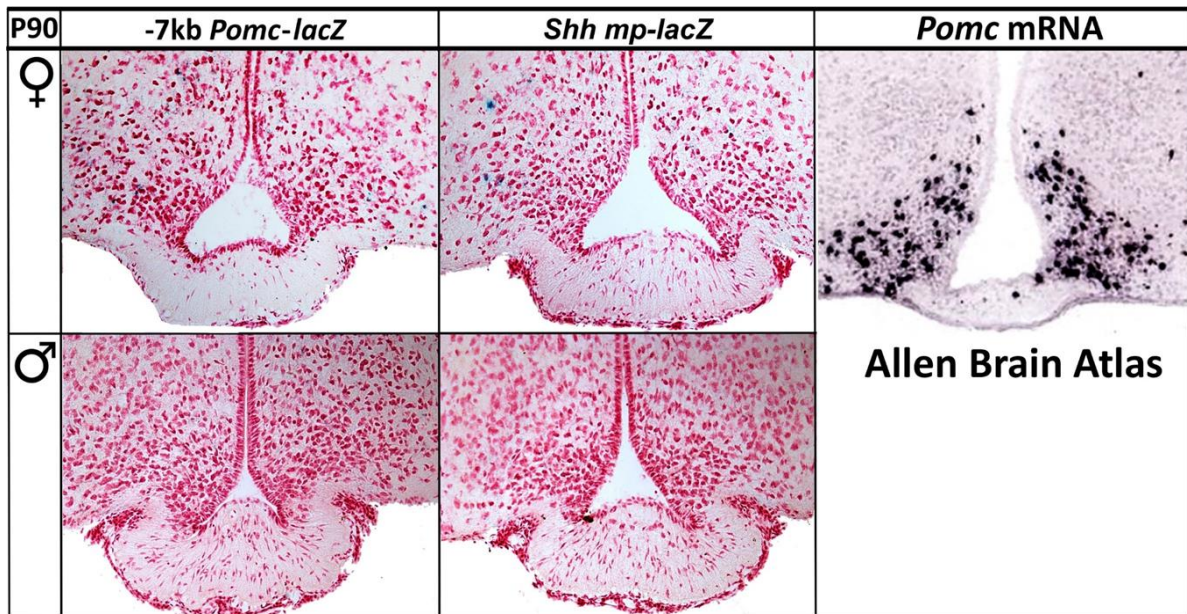


Figura 48. Cortes coronales del hipotálamo de ratones P90 hembra (arriba) y macho (abajo) *-7kbPomc-lacZ* (izq.) y *Shhmp-lacZ* (medio.) a la altura de la eminencia media incubados con X-gal (azul) y contrateñidos con Neutral red. Corte comparable mostrando la expresión de *Pomc* tomada del Allen Mouse Brain Atlas (der.).

Los resultados muestran ausencia de marca azul en los hipotálamos de todos los ratones analizados con la excepción de unas pocas células aisladas en algunos cortes. El conjunto de estos resultados indica que el *enhancer -7kb* tiene la capacidad de dirigir fuertes niveles de expresión de *lacZ* a melanotrofos del lóbulo intermedio, escasa capacidad sobre los corticotrofos e indetectable en neuronas del núcleo arcuato del hipotálamo.

CONCLUSIONES

- El *enhancer* -7kb es una región muy conservada en los genomas de todos los órdenes de mamíferos placentarios, pero está ausente en marsupiales, monotremados y otras clases de vertebrados. Su origen evolutivo coincide con el de los *enhancers* hipotalámicos de *Pomc* nPE1 y nPE3 que también se fijaron en el *locus* de *Pomc* luego de la aparición de los marsupiales (147 MYA) y antes de la radiación de mamíferos (100 MYA), mientras que nPE2 está bajo selección purificadora desde la aparición de los mamíferos basales (300 MYA).
- Estudios en ratones mutantes deficientes en la región -7 kb, generados en esta Tesis Doctoral, demuestran que esta secuencia conservada actúa como un *enhancer* transcripcional corticotrópico de *Pomc* *in vivo*, y que su presencia en el *locus* de *Pomc* es crítica para asegurar niveles fisiológicos de expresión en el lóbulo anterior desde el desarrollo embrionario hasta la adultez.
- El *enhancer* -7 kb de *Pomc* es fundamental para el desarrollo normal de las glándulas suprarrenales ya que los ratones mutantes deficientes en esta región tienen reducida la zona fasciculada de la corteza, tanto en hembras como en machos. Sin embargo, la concentración plasmática de glucocorticoides se mantiene normal en ausencia del *enhancer* -7kb tanto en condiciones basales como luego de estrés sostenido.
- Estudios en ratones transgénicos, generados en esta Tesis Doctoral, demuestran que la región -7kb tiene la capacidad de dirigir fuertemente la expresión de un gen reportero a melanotrofos hipofisarios y, en menor medida, a corticotrofos.
- En el hipotálamo, en cambio, la región -7 kb no parece comportarse como un *enhancer* transcripcional de relevancia, aunque es posible especular con la idea de que actúe como un *facilitador* o un *inhibidor* facultativo en determinadas condiciones ambientales o fisiológicas (Figura 49).

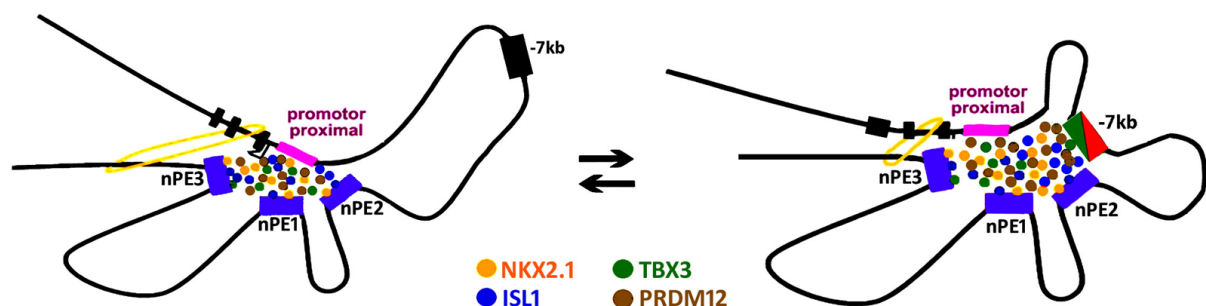


Figura 49. Organización del *locus* de *Pomc* de ratón en neuronas hipotalámicas. Un módulo regulador compuesto por 3 *enhancers* distales (nPE3, nPE1 y nPE2) actúa cooperativamente para inducir la transcripción hipotalámica de *Pomc* a través del reclutamiento de FTs específicos que interaccionan con el promotor proximal. En este modelo, el *enhancer* distal -7 kb podría ser reclutado para potenciar o inhibir la expresión hipotalámica de *Pomc* dependiendo de diferentes contextos ambientales como baja disponibilidad de alimento, preparación migratoria o hibernación y fisiológicos como la reproducción, la preñez y la lactancia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Ratones en el bioterio

Los ratones (*Mus musculus*) fueron criados en el Bioterio del Complejo Obligado (IBYME-INGEBI, CONICET) en una sala que cuenta con un sistema de jaulas independientes con ventilación permanente de aire HEPA filtrado (Thoren Caging Systems, Inc. Hazleton, PA-USA). La sala está mantenida a una temperatura ambiente de 20°C a 22°C, con un fotoperiodo de 12 h (luces encendidas de 7:00 am a 7:00 pm.). Los ratones fueron alimentados *ad libitum* con alimento comercial de mantenimiento el cual contiene 28,8% de proteínas, 5,33% de grasas y 65,87% de carbohidratos, y se les administró agua filtrada. Todos los ratones fueron criados respetando los principios de la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio publicada por el Servicio Público de Salud de los Estados Unidos. Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del INGBI-CONICET.

Producción de ratones mutantes deficientes en la región -7 kb utilizando la tecnología CRISPR/CAS9

1. Diseño de los ARN guía

Utilizamos la tecnología de edición génica CRISPR/Cas9 para generar ratones *knock-out* con una delección en la secuencia del *enhancer* -7 kb. Para ello, identificamos en UCS Genome Browser el sitio conservado ubicado a 7 kb río arriba del promotor de *Pomc* y obtuvimos su secuencia. Para llevar a cabo el diseño de las guías utilizamos la herramienta online desarrollada por la Universidad de Bergen (UiB) llamada CHOPCHOP (<https://chopchop.cbu.uib.no/>). De las posibles opciones de guías seleccionamos dos de ellas según la proximidad a la que estas se encontraban de los extremos del sitio de interés y en base a un valor de alto puntaje basado en la menor probabilidad de producir cortes en secuencias fuera del blanco (*off-targets*). Las secuencias variables de cada guía fueron generadas hibridando dos oligonucleótidos comerciales para cada guía especificados más

adelante, comprados a la empresa GBT (Genbiotech S.R.L Buenos Aires, Arg) y clonando los productos de la hibridación en el plásmido DR274 (Addgene #42250), que contiene el promotor de T7 que va a ser utilizado como plantilla para la transcripción *in vitro* y la secuencia constante de la guía.

A cada guía se le agregan secuencias que son complementarias a los extremos cohesivos que quedan al linealizar el plásmido DR274 con la enzima de restricción Bsa I. A su vez, la secuencia agregada al oligonucleótido *forward* es adyacente al sitio de reconocimiento de la T7 RNAPol.

TAATACGACTCACTATAGGG: La secuencia subrayada corresponde al promotor mínimo de T7.

El nucleótido Guanina destacado en negrita es la primera base incorporada al ARN durante la transcripción. Las dos Guaninas subsiguientes a la destacada en negrita se recomiendan para una transcripción eficiente.

Oligo forward: 5' TAGGG - Secuencia ARN guía 3'

Oligo reverse: 5' AAAC-Secuencia inversa y complementaria al ARN guía-C 3'

Las guías seleccionadas para la delección de cada uno de los extremos del sitio fueron:

Región blanco	Secuencia (5' - 3')	Cadena
-7 kbUP	(CCT)CTCACAAATAGCCAGAAATT	-
-7 kbDWN	AATGAAAGCTAAAGGCCCGG(GGG)	+

Los oligonucleótidos empleados para clonar la región variable de las guías de ARN en el vector DR274 fueron:

Oligonucleótidos seleccionados como guías para cortar el extremo 5' de la región -7 kb		
Región blanco	Oligonucleótido	Secuencia
-7 kb – UP	Forward	TAGGGA ATTCTGGCTATTTGTGAG
-7 kb – UP	Reverse	AAACCTC ACAAATAGCCAGAAATTC
Oligonucleótidos seleccionados para cortar el extremo 3' de la región -7 kb		
Región blanco	Oligonucleótido	Secuencia
-7 kb – DW – F	Forward	TAGGGA ATGAAAGCTAAAGGCCCG G
-7 kb – DW – R	Reverse	AAACCCG GGCCTTTAGCTTTCATTC

2. Clonado de guías

Los oligonucleótidos, fueron resuspendidos en Buffer de Annealing (10 mM Tris pH 7,5; 1 mM EDTA, 50 mM NaCl) a una concentración de 100 μ M (100 pM/ μ l). Se preparó una solución con cada par de oligonucleótidos a una concentración final de 10 μ M (10 pM/ μ l), en Buffer de Annealing. Se incubó a 95 °C por 15 min, y se dejó enfriar a temperatura ambiente por 20-30 minutos, para producir la desnaturalización y posterior hibridación entre los pares de oligonucleótidos. El plásmido DR274 (plásmido de Addgene N° 42250) fue linealizado con la enzima de restricción Bsa I (*New England Biolabs*), y purificado a partir de un gel de agarosa 2% p/v, empleado el kit comercial QIAquick Gel Extraction Kit (*QIAGEN*).

Para la ligación de los oligonucleótidos y el plásmido, se empleó una relación molar vector:inserto de 1:3 (0.076 pmol de DR274 : 0.228 pmol de inserto) y se utilizó el kit comercial Fast-Link DNA Ligation Kit (*Epicentre*) cada reacción con un volumen final de 7.5 μ l. Las reacciones de ligación se incubaron O/N a 4 °C. Se transformaron bacterias electrocompetentes *E. coli* cepa DH10- β (*Thermo Fisher Scientific*), mediante un shock eléctrico utilizando 2 μ l de la ligación. Se recuperaron las bacterias en 1 ml de LB por 1 h a 37°C con agitación a 400 rpm. Se centrifugó a 3.000 rpm por 3 min, se descartó el sobrenadante por volcado y cada cultivo fue sembrado en placas de LB-kanamicina, y se incubaron en una estufa a 37 °C O/N. Se seleccionaron 10 colonias de cada placa y fueron resuspendidas en 10 μ l de LB estéril, de los cuales 2 μ l fueron utilizados para chequear la presencia del inserto de interés mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, se detallan las condiciones más adelante), con los 8 μ l restantes se largó un cultivo líquido solo de los clones positivos para el inserto de interés. Como medio se utilizó 7 ml de LB + 7 μ l de kanamicina 100 mg/ml por tubo y se dejó O/N a 37°C en una estufa en agitación a 160 rpm. Para la identificación de los clones positivos se utilizó el primer M13F y los oligonucleótidos conteniendo la secuencia del ARN guía. El ciclo empleado fue:

1. Desnaturalización inicial: 95 °C, 6 min.
2. Desnaturalización: 95 °C, 30 seg.
3. Annealing: 52 °C, 30 seg.
4. Extensión: 72 °C, 40 seg.
5. 24 ciclos más desde el punto 2 al 4.
6. Extensión final: 72 °C, 8 min.

Los productos de la reacción fueron analizados por electroforesis en un gel de agarosa 2% p/v.

Se extrajo el ADN plasmídico empleando el kit comercial Wizard(R) Plus SV Minipreps DNA Purification System siguiendo las indicaciones del fabricante. Los plásmidos fueron secuenciados por la empresa MacroGen Corea con el primer M13F.

3. Síntesis de los ARNs guía (sgRNA)

Los plásmidos conteniendo la secuencia para la síntesis de los ARN guía fueron linealizados con la enzima de restricción DraI (*New England Biolabs*), a 37 °C, ON. A fin de eliminar una posible contaminación con endonucleasas de ARN, se incubó al producto de digestión con proteinasa K 200 µg/ml y SDS 0,5% durante 1 hora a 50°C. A continuación, se llevó la mezcla a un volumen final de 500 µl con agua y se realizó una extracción con fenol/cloroformo. Finalmente, se precipitó el ADN plasmídico con 1/10 volúmenes de acetato de amonio 5 M y 2 volúmenes de etanol absoluto, dejamos a -20°C por 1 hora y centrifugamos a 14000 rpm durante 15 minutos. Se descartó el sobrenadante y se lavó el ADN con 250 µl de etanol 70% v/v, se centrifugó por 5 minutos a 14000 rpm. Se repitió el lavado, se dejó secar el pellet y se resuspendió en 10 µl de agua libre de nucleasas (*UltraPure DNase/RNase-Free Distilled Water, Ambion, Thermo Fisher Scientific*). Las concentraciones se determinaron en un espectrofotómetro NanoDrop (*Thermo Scientific*) y mediante electroforesis en un gel de agarosa 2% p/v.

Los ARN guía fueron sintetizados empleando el kit comercial MEGAShortscript T7 Kit (*Ambion, Thermo Fisher Scientific*), siguiendo el protocolo detallado por el proveedor, y se purificaron por precipitación con etanol y acetato de amonio 5M, siguiendo el protocolo descrito en el párrafo anterior, realizando las centrifugaciones a 4°C. Los ARN guía se resuspendieron en 20 µl agua destilada libre de nucleasas (*UltraPure DNase/RNase-Free Distilled Water, Ambion, Thermo Fisher Scientific*) y fueron almacenados en alícuotas de 5µl a -80 °C hasta su utilización. Las concentraciones se determinaron en un espectrofotómetro NanoDrop (*Thermo Scientific*) y mediante electroforesis en un gel de agarosa 2% p/v.

4. Síntesis de ARN de Cas9

El plásmido MLM3613 (plásmido Addgene N° 42251), conteniendo la secuencia codificante de la Cas9 de *Streptococcus pyogenes*, fue linealizado con la enzima de digestión Pme I (*New England Biolabs*). Se verificó que la linealización haya sido completa en gel de agarosa y el plásmido fue purificado con una columna para limpieza de reacciones enzimáticas (*EZ Micropure, Millipore*). Para la síntesis del ARN se empleó el kit comercial *mMESSAGE mMACHINE T7 kit* (*Ambion, Thermo Fisher Scientific*), de acuerdo con el protocolo detallado por el fabricante. Esta reacción fue empleada directamente para el agregado de la cola de poliA al transcripto, para lo cual fue utilizado el kit comercial *Poly(A) Tailing Kit* (*Ambion, Thermo Fisher Scientific*), siguiendo las indicaciones del fabricante, pero empleando un tiempo de incubación de 15 min. El ARN fue purificado empleando el kit comercial *MEGAClear Transcription Clean-Up Kit* (*Ambion, Thermo Fisher Scientific*), se eluyó en 50 µl de agua destilada libre de nucleasas (*UltraPure DNase/RNase-Free Distilled Water, Thermo Fisher Scientific*), y la muestra fue alícuotada y almacenada a -80 °C hasta su uso. Se estimó la concentración con un espectrofotómetro NanoDrop (*Thermo Scientific*) y mediante electroforesis en un gel de agarosa 1% p/v.

5. Preparación de ARNs guías y de mRNA de Cas9 para microinyección

Para la delección de la región -7 kb se preparó una solución en agua destilada libre de nucleasas (*UltraPure DNase/RNase-Free Distilled Water, Thermo Fisher Scientific*) que contenía aproximadamente 50 ng/µl de cada uno de los ARN guía y 50 ng/µl del ARN de Cas9 con un análogo del 5' capping y cola de poliadeninas. Las soluciones fueron centrifugadas a 16400 rpm por 15 min a 4 °C a fin de eliminar impurezas que perjudican la microinyección, alícuotadas y almacenadas a -80 °C hasta su utilización.

Producción de ratones *knock-in* para la región -7 kb dirigidos al sitio H11, utilizando la tecnología enSERT mediada por CRISPR/CAS9

Los ratones fueron generados según las estrategias utilizadas por Kvon *et al.*, 2020, utilizando la tecnología enSERT.

1. Síntesis de sgRNA

Se crearon ratones transgénicos portadores de la integración sitio específica del enhancer -7 kb utilizando un protocolo de CRISPR/Cas9 modificado. Las guías de ARN se generaron a partir de un molde mediante PCR con el vector px330 (Addgene) como andamio y *primers* adecuados. El *primer forward* es específico de la guía y contiene la secuencia del promotor de la ARN Polimerasa T7 río arriba de la secuencia de la guía específica (N₂₀) y una secuencia complementaria al vector px330. El *primer reverse* corresponde a una secuencia complementaria al vector px330. La secuencia de ambos primers y de la guía se detallará a continuación. La síntesis de los sgRNA se realizó con el kit de transcripción *MEGAShortScript* T7 (Invitrogen) utilizando como molde el producto de PCR resultante del primer paso.

Oligonucleótido	Secuencia 5' – 3'
H11 sgRNAs	GCTGATGGAACAGGTAACAA

Blanco	Oligo	Secuencia
px330 F	<i>Forward</i>	TTAATACGACTCACTATAGGCTGATGGAACAGGTAACAAGTTTTAGAGC TAGAAATAGC
px330 R	<i>Reverse</i>	AAAAGCACCGACTCGGTGCC

2. Generación de transgenes para el estudio de elementos conservados

- Plásmido pGEMT

Se clonó el enhancer -7 kb de *Pomc* en el plásmido pGEMT utilizando el kit de clonado pGEMT Easy vector (Promega). Para esto amplificamos por PCR la región -7 kb de 1044 pb con los primers 5' TTATGCTAAGGCGAAGGCAGG 3' y 5' ATGCAGGAGTCCAGTCAGAG 3' (mm9_chr12:3,997,133-3,998,176).

Los ciclos empleados fueron:

Etapas	Temperatura (°C) PCR -7 kb	Tiempo(min) -7 kb
Desnaturalización inicial	95	5.30
Desnaturalización	95	0.30
Annealing	65	0.30
Extensión	72	1.25
35 ciclos más (Etapas 2-4)	X 34	
Extensión final	72	5.00
Enfriado	12	2.00

Se purificaron los productos de amplificación por precipitación con Acetato de Amonio 0.5M y se lo incubó junto al vector tal y como lo sugiere el fabricante en una relación 5:1 y se propagaron los plásmidos resultantes en bacterias competentes E.coli DH10-β. Se seleccionaron 10 colonias de la placa con ampicilina y fueron resuspendidas en 10 µl de LB estéril, de los cuales 2 µl fueron utilizados para chequear la presencia del inserto de interés mediante la reacción en cadena de la polimerasa (ColonyPCR, cuyas condiciones se detallan las condiciones más adelante). Con los 8 µl restantes se largó un cultivo líquido solo de los clones positivos para el inserto de interés. Como medio se utilizó 7 ml de LB + 7 µl de ampicilina 100 mg/ml por tubo y se dejó O/N a 37°C en una estufa en agitación a 160 rpm. Para la identificación de los clones positivos se utilizó los primers SP6 y T7. El ciclo empleado fue:

Desnaturalización inicial: 95 °C, 6 min.
Desnaturalización: 95 °C, 30 seg.
Annealing: 55 °C, 30 seg.
Extensión: 72 °C, 120 seg.
35 ciclos más desde el punto 2 al 4.
Extensión final: 72 °C, 5 min
Enfriado: 12°C, 2 min.

Los productos de la reacción fueron analizados por electroforesis en un gel de agarosa 2% p/v.

Se extrajo el ADN plasmídico empleando el kit comercial Wizard(R) Plus SV Minipreps DNA Purification System (*Promega*) siguiendo las indicaciones del fabricante. Se digirió este ADN con la enzima de restricción Not I HF (*New England Biolabs*) a 37°C durante 1 hora. Se corrió la digestión en un gel de agarosa al 2% y a partir de este se extrajo el fragmento de interés utilizando el kit QIAEX II Gel Extraction Kit (*Qiagen*- Cat.No.28706).

3. Plásmido PCR4-Shh::lacZ-H11

Se linealizó el plásmido PCR4-Shh::lacZ-H11 (Addgene #139098) con la enzima de restricción Not I HF (*New England Biolabs*) a 37°C durante 1 hora y se verificó que la linealización haya sido completa en un gel de agarosa 1%. Con el fin de evitar la recircularización del plásmido se desfosforilaron los extremos cohesivos del ADN linealizado por medio de una reacción de hidrólisis. Para ello se utilizó la enzima fosfatasa TSAP (*Promega* - M9910) que se incubó a 37°C durante 15 minutos y se inactivó 74°C por 15 minutos. Con el objetivo de maximizar la eficiencia de ligación subsecuente se procedió a purificar la digestión.

4. Reacciones de ligación

Para la ligación de los fragmentos de interés aislados a partir del pGEMT y el plásmido, se empleó una relación molar vector:inserto de 1:5 y se utilizó el kit comercial *Fast-Link DNA Ligation Kit* (*Epicentre*). Las reacciones de ligación se incubaron ON a 4°C, luego de lo cual se inactivó la ligasa a 70°C por 15 minutos. Se transformaron las bacterias One Shot TOP10 Chemically Competent E. coli (*Thermo Fisher Scientific*) mediante un shock térmico utilizando 2µl de la ligación. Se recuperaron las bacterias en 250 µl de SOC, se sembraron en placas de

LB – Kanamicina, y se incubaron en una estufa a 37°C ON. Se seleccionaron 10 colonias de cada placa y se resuspendieron en 10 µl de LB estéril, de los cuales 2 µl se utilizaron para chequear la presencia del inserto de interés mediante la reacción en cadena de la polimerasa (Colony Pcr, cuyas especificaciones se detallan más adelante) con los 8 µl restantes se largó un cultivo líquido. Como medio se utilizó 7 ml de LB + 7 µl de kanamicina 100 mg/ml por tubo y se dejó ON a 37°C en una estufa en agitación a 160 rpm. Para corroborar los clones positivos se utilizó los mismos *primers* y ciclos respectivos con lo que se levantaron los fragmentos. Para corroborar el número de insertos que se incorporaron al plásmido, se realizó una PCR con los *primers* 5' AGTAAGGTAAGGGCAGGATGTG 3' (localizado en el brazo de homología H11 5') y 5' TCTGATGTTAACCCTGAGAAAGAC 3' (localizado en el promotor mínimo *Shh*) diseñados en *CHOPCHOP*. En el caso del animal KI -7 kb, numerosos insertos fueron detectados y con el fin de clonar solo uno, se digirió dicho ADN plasmídico con una enzima de restricción con sitio de corte único XmaI (*New England Biolabs*). Se corrió la digestión en un gel de agarosa 2% p/v y se extrajo sólo el segmento de interés purificándolo con el kit comercial QIAquick Gel Extraction Kit (*QIAGEN*), dicho plásmido purificado fue re circularizado utilizando el kit de ligación Fast-Link DNA Ligation Kit (Epicentre) en una relación vector: inserto - 1:3 y la posterior clonación y extracción de ADN plasmídico se llevó a cabo de la misma manera en que se detalló anteriormente utilizando bacterias electrocompetentes *E. coli* cepa DH10-β (*Thermo Fisher Scientific*), y el kit comercial Wizard(R) Plus SV Minipreps DNA Purification System. Para todos los casos las concentraciones se determinaron en un espectrofotómetro NanoDrop (*Thermo Scientific*)

5. Preparación de ARNs guías y de mRNA de Cas9 para microinyección

Para cada construcción se generó una solución en agua destilada libre de nucleasas (*UltraPure DNase/RNase-Free Distilled Water, Thermo Fisher Scientific*) que contenía aproximadamente 50 ng/µl de ARN guía, 50 ng/µl del ARN de Cas9 con un análogo del 5' capping y cola de poliadeninas y 25 ng de plásmido donante H11 – con su respectivo inserto (-7 kb única copia, -7 kb numerosas copias). Las soluciones fueron centrifugadas a 16400 rpm por 15 min a 4 °C a fin de eliminar impurezas que perjudican la microinyección, alicuotadas y almacenadas a -80 °C hasta su utilización.

6. Obtención de cigotas

Se indujo la superovulación en hembras jóvenes FVB/NJ (de entre 4 y 5 semanas) mediante tratamiento hormonal, consistente en la inyección intraperitoneal de 5 UI de PMS (*pregnant mare serum*), a las 15 hs, 3 días antes de la obtención de los embriones, seguida dos días después de la inyección i.p. de 5 UI de hCG (*human chorionic gonadotrophin*) a las 13 hs. Luego de la segunda inyección, las hembras fueron colocadas en jaulas individuales con machos FVB/NJ. Por la mañana, se verificó en cada hembra la presencia de un tapón vaginal y luego fueron sacrificadas mediante dislocación cervical. Mediante una incisión abdominal se expusieron los tractos reproductivos, y los oviductos fueron aislados y colocados en una placa plástica de cultivo de 35 mm con medio M2 (Sigma Aldrich, NaCl 88 mM; KCl 4,7 mM; CaCl₂·H₂O 1,7 mM; KH₂PO₄ 1,2 mM; MgSO₄·7H₂O 1,2 mM; glucosa 5,5 mM, piruvato de sodio 0,33 mM; lactato de sodio (DL) 9,8 mM; EDTA 0,1 mM; BSA (fracción V) 0,3 %, penicilina 120 UI/ml; sulfato de estreptomicina 50 µg, rojo fenol 0,001%; HEPES 25 mM; pH7,4). Mediante el uso de un microscopio de disección, fórceps y agujas de 25G, se disociaron los oviductos y se liberaron los ovocitos fertilizados, rodeados de células del *cumulus*. Los ovocitos fueron aspirados con una pipeta Pasteur previamente estirada sobre una llama, y se colocaron en una gota de medio M2 con 1% de hialuronidasa durante 5 minutos, a fin de separarlos de las células del cumulus. Las cigotas fueron lavadas a través de 4 o 5 gotas de medio M2, y se preservaron hasta el momento de la microinyección en grupos de 20, en gotas de M16 (Sigma Aldrich, NaCl 88 mM; KCl 4,7 mM; KH₂PO₄ 1,2 mM; NaHCO₃ 23 mM; glucosa 5,5 mM; MgSO₄·7H₂O 1,2 mM; ácido láctico 4,8 mM; piruvato de sodio 0,2 mM; lactato de sodio (DL) 9,8 mM; EDTA 0,1 mM; BSA (fracción V) 0,3 %; penicilina 120 UI/ml; sulfato de estreptomicina 50 µg, rojo fenol 0,001%), en una estufa para cultivo a 37°C y CO₂ 5%. La cantidad de ovocitos fertilizados obtenidos para ser microinyectados es de aproximadamente 20 por hembra superovulada.

7. Microinyección pronuclear y citoplasmática

Los ratones mutantes fueron generados por microinyección citoplasmática y pronuclear de cigotas FVB/NJ. Para la microinyección se utilizaron micropipetas sujetadoras e inyectoras preparadas a partir de capilares de borosilicato y estiradas con un estirador vertical de micropipetas (Vertical Pipette Puller, Model 720, KOPF, David Kopf Instruments, Tujunga,

California, USA). Las cigotas se colocaron en una gota de medio M2 equilibrado con HEPES ubicada en el centro de una depresión semi esférica cóncava de un portaobjetos, se observaron bajo un microscopio invertido a través de un objetivo 40X de larga distancia de trabajo, con óptica de contraste de interferencia diferencial (FS Labovet, Leica) y se seleccionaron aquellos que tuvieran ambos pronúcleos bien visibles. Con la ayuda de la pipeta sujetadora adosada a un micromanipulador manual (Leica, Alemania) se introdujo la pipeta microinyectora dentro del pronúcleo más visible y se descargó aproximadamente 1 pl de una solución conteniendo el mRNA de la Cas9 y las sgRNAs. Luego se descargó igual cantidad en el citoplasma de forma similar. Los embriones microinyectados fueron colocados en el incubador (37 °C, 5 % CO₂) hasta el momento de la transferencia. Alrededor del 80% de los embriones sobreviven a la microinyección.

8. Transferencia embrionaria a hembras pseudopreñadas

La noche previa a la recolección de cigotas, hembras jóvenes (de 6 a 9 semanas de edad) fueron colocadas en jaulas individuales junto a un macho vasectomizado, para generar una pseudopreñez. Por la mañana, se seleccionaron aquellas hembras con presencia de tapones vaginales, evidencia de la copulación. Las hembras pseudopreñadas fueron anestesiadas con avertina (300 mg/kg i.p.), se les realizó una incisión lateral de aproximadamente 1 cm, y con la ayuda de un microscopio estereoscópico se expuso el oviducto a transferir. Se disgregó la membrana que recubre el oviducto y el ovario, y se insertó una pipeta Pasteur fina cargada con los embriones microinyectados en el infundíbulo oviductal. Se descargaron en total entre 10 y 20 embriones por oviducto, y luego se cerró la incisión con sutura.

Genotipificación de los ratones producidos por CRISPR/Cas9

Los ratones fundadores fueron analizados mediante PCR utilizando los oligonucleótidos especificados. Los productos de PCR fueron clonados en el plásmido pGEM-T Easy Vector (Promega, A1360), y para propagar los clones se utilizaron bacterias *E. coli* DH10-β. Las bacterias transformadas con los plásmidos derivados del vector pGEM-T se seleccionaron en LB-agar con ampicilina (50 µg/ml) y fueron analizados mediante secuenciación de Sanger para determinar los diferentes genotipos de los ratones F0. Se seleccionó un animal de cada línea

con las mutaciones generadas y se aparearon con ratones WT. Los ratones F1 fueron confirmados utilizando secuenciación de productos de PCR.

1. Obtención y extracción de ADN

Para la genotipificación de animales adultos, se colectaron fragmentos de tejido de las orejas realizando muescas con un sacabocados, las cuales sirven también como código numérico para la identificación de cada animal. Las biopsias fueron realizadas al día del destete (21 días luego del nacimiento, P21), y procesadas posteriormente para extraer ADN genómico. La genotipificación de los embriones se realizó tomando una biopsia del cuerpo del embrión antes de ser procesado para su congelamiento. En ambos casos, el tejido obtenido se incubó durante 12 a 16 hs en 150 µl de *buffer* de digestión (Tris-HCl 50mM pH 8; EDTA 100 mM; SDS 0,5%; 0,4 mg/ml proteinasa K) a 60°C con agitación. Una vez digeridas, las muestras fueron centrifugadas a máxima velocidad durante 10 min para eliminar impurezas como pelo y fragmentos de cartílago no digeridos. Se tomó el sobrenadante en un tubo nuevo y se agregó un volumen de isopropanol para precipitar el DNA. Luego de mezclar por inversión, se centrifugó nuevamente a máxima velocidad durante 15 min y el precipitado se lavó con 500 µL de etanol 70% y se volvió a centrifugar durante 5 min para eliminar las trazas de isopropanol. Se eliminó el etanol y se dejó secar a temperatura ambiente. El ADN se resuspendió en 20 µL (en el caso de muestras provenientes de muescas de oreja) o 40 µL (en el caso de muestras provenientes de fragmentos de embrión) de *buffer* TE (100 mM Tris-HCl pH 7,4; 10 mM EDTA pH 8).

2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones de PCR para identificar los alelos de interés se realizaron utilizando oligonucleótidos comprados a la empresa GBT (Genbiotech S.R.L Buenos Aires). Se utilizó 1 µl de las muestras de DNA en un volumen final de reacción de 20 µl con 0,5 µM de cada primer, *Buffer* PCR (Invitrogen) 1x, dNTPs 200 µM (Invitrogen), MgCl₂ 2 mM y TaqPol 1 U (Taq-UBA). Finalmente, los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 2 % p/v en TBE (45 mM Tris-borato, 1 mM EDTA, pH 8) con bromuro de etidio 0,4 µg/ml y se visualizó a la luz UV.

Secuencia de *primers* para la genotipificación de ratones:

1. Para la genotipificación de los ratones $\Delta 7$, se realizó una PCR multiplex con dos juegos de *primers* utilizando en ambos casos el mismo *primer forward*.

Primers:

-7 kb Set1 F: 5'- TTATGCTAAGGCGAAGGCAGG-3'

-7 kb Set2 R: 5'- CTATGTTTGGGAGGCTGGGT-3'

-7 kb Set3 R: 5'- AGGAGGATGATGGCTCCTGA-3'

Tamaño de la banda:

506 pb KO, 1451 pb WT, 438 pb WT

Banda WT de 1451 pb difícil de amplificar.

Condiciones de ciclado

94 °C 3 min; [94 °C 30 seg; 64.3 °C 30 seg, 72 °C 1.20 min]X 33 ciclos; 72 °C min, 12°C 3 min

2. Los ratones KI fueron genotipificados usando los siguientes *primers*:

Primers:

Shh minimal Promoter F: 5' TGTGTTCCGTTACCAGCGAC 3'

Lac Z R: 5' GGCGATTAAGTTGGGTAACGC 3'

Tamaño de la banda:

333 pb para animales KI, ausencia de banda para animales WT.

Condiciones de ciclado:

95 °C 5 min; [95 °C 30 seg; 59 °C 40 seg, 72 °C 30 seg;] X 33 ciclos; 72 °C 5 min, 12°C 3 min

3. Para determinar la inserción sitio específica de los *enhancers* se utilizaron los siguientes juegos de *primers*:

- a. Para los ratones -7 kb KI:

Primers:

H11 HA 5' F: AACTAAGGAACCCTGGCTGTG

H11 -7 kb R: GACCAGATGGCAGAGAACCC

Tamaño de la banda:

3.128 pb para animales KI positivos cuya inserción haya sido específica para el sitio, ausencia de banda para animales WT.

Condiciones de ciclado:

95 °C 7 min; [95 °C 30 seg; 70 °C 30 seg, 72 °C 4 min] X 33 ciclos; 72 °C 5 min, 12°C 3 min

b. Para los ratones KI sin enhancer

Primers:

Poly A F: 5'TGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCC 3'

H11 HA 3R: 5'CAACTGGGTGGGAGGAGTGTAG 3'

Tamaño de la banda:

2716 pb para animales KI positivos cuya inserción haya sido sitio específico, ausencia de banda para animales WT.

Condiciones de ciclado

95 °C 6 min; [95 °C 30 seg; 65 °C 30 seg, 72 °C 3.40 min] X 33 ciclos; 72 °C 5 min, 12°C 3 min

4. Para el sexado de los embriones se realizó una PCR multiplex, utilizando como control interno de la PCR los juegos de *primers* del gen DX2ds3.

a. Para el microsatélite del cromosoma X, *DX2ds3*

Primers:

NDS3: 5' GAGTGCCTCATCTATACTTACAG 3'

NDS4: 5' TCTAGTTCATTGTTGATTAGTTGC 3'

Tamaño de la banda:

244pb tanto machos como hembras

b. Para el gen *Sry*

Primers:

Sry2: 5' TCTTAACTCTGAAGAAGAGAC 3'

Sry4: 5' GTCTTGCCTGTATGTGATGG 3'

Tamaño de la banda:

404 pb, banda presente sólo en machos.

Condiciones de ciclado:

95 °C 4 min; [95 °C 30 seg; 57.5 °C 30 seg, 72 °C 0.55 min] X 2 ciclos; 72 °C 5 min, 12°C 3 min

Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa, con transcripción inversa (RT-qPCR)

La cuantificación del mRNA de *Pomc* se realizó mediante PCR en tiempo real (RT-qPCR) utilizando *primers* específicos en relación con el control interno β -actina (*Actb*). Con el fin de evaluar el grado de contaminación de melanotrofos en las muestras de corticotrofos hipofisarios, se diseñaron *primers* específicos para el gen de *Pax7* (factor de transcripción exclusivo del IL) y para el gen de *Prolactina*, utilizando este último como gen de referencia por expresarse exclusivamente en el AL de la hipófisis. Para todos los casos se utilizó una termocicladora que detecta fluorescencia en tiempo real (Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System) y el fluoróforo Power Up SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Cat. No.: A25472) para detectar la aparición de los productos de PCR.

1. Diseño de primers

Los *primers* para cada gen fueron diseñados empleando la herramienta *online* Primer3 (<https://primer3.ut.ee/>), teniendo en cuenta que cada *set* amplifique el empalme entre 2 exones, para evitar la amplificación de ADN genómico en caso de que el tratamiento con ADNasa no haya sido completo y hayan quedado remanentes de ADN antes de la síntesis de cADN a partir del ARN. Los *primers* usados en los experimentos fueron los siguientes:

Primers:

Pomc 2.3 A F: 5'- TAGATGTGTGGAGCTGGTGC – 3'

Pomc 2.3 A R: 5'-AGGGGCTGTTCATCTCCGTT– 3'

Tamaño del producto: 145 pb.

ActB F: 5'- CCTTCTTGGGTATGGAATCCTGT– 3'

*ActB*_R: 5'- CACTGTGTTGGCATAGAGGTCTTTAC– 3'

Tamaño del producto: 101 pb.

Condiciones de ciclado:

Holding stage: 50 °C 2min; 95°C 2min

PCR stage: [95 °C 0.15 min; 62 °C 1 min] x40

Melting Stage: 95 °C 0.15 min, 60 °C 1 min, 95°C 0.30 min

Primers:

Pax7 4_5 F: 5'- GAAAGCCAAACACAGCATCG – 3'

Pax7 4_5 R: 5'- CTGATTCCACATCTGAGCCC – 3'

Tamaño del producto: 76 pb.

Prolactina 3_4 F: 5'- TGAAGACAAGGAACAAGCC- 3'

Prolactina 3_4 R: 5'- GCTCTTGATAGGATGTATTCGGG - 3'

Tamaño del producto: 150 pb.

Condiciones de ciclado:

Holding stage: 50 °C 2min; 95°C 2min

PCR stage: [95 °C 0.15 min; 57 °C 1 min] x40

Melting Stage: 95 °C 0.15 min, 60 °C 1 min, 95°C 0.30 min

Primers:

CRH 1.2 F: 5' GAGGCATCCTGAGAGAAGTCCC 3'

CRH 1.2 R: 5' CGCATGTTAGGGGCGCT 3'

Tamaño del producto: 86 pb.

Condiciones de ciclado:

Holding stage: 50 °C 2min; 95°C 2min

PCR stage: [95 °C 0.15 min; 59 °C 1 min] x40

Melting Stage: 95 °C 0.15 min, 59 °C 1 min, 95°C 0.30 min

2. Recolección de muestras

EMBRIONES DE RATÓN E:10.5

Ratones heterocigotas fueron apareados en tríos (dos hembras y un macho) y cada mañana (alrededor de las 9 hs) se inspeccionó el tapón vaginal en las hembras. La presencia de un tapón vaginal indica la edad embrionaria 0,5 (E0, 5; por embryonic day 0.5), ya que los ratones se aparean en la mitad del ciclo nocturno (aprox. 1 am). Las madres preñadas fueron sacrificadas por dislocación cervical a los 10 días de haber observado el tapón vaginal. Luego de la dislocación, se produjo una incisión en el abdomen para exponer ambos cuernos del útero y se realizó un corte en la base del útero y otro a la altura de los ovarios para extraerlo del cuerpo de la madre. Los sitios de implantación se separaron cortando entre ellos con una tijera, y luego se utilizaron pinzas para desgarrar el tejido y exponer a los embriones, los cuales fueron removidos. De cada embrión se separó un pedazo de cola para posteriormente extraer ADN y llevar a cabo la genotipificación y sexado, y se cortó la cabeza las cuales fueron recolectadas en el reactivo de aislamiento de ARN TriPure (Sigma, nº de cat. 11667165001) y se almacenaron a -80 °C.

RATONES ADULTOS P90

Se seleccionó un grupo promedio de 7 ratones P90 para cada genotipo, KO y WT, y para cada sexo los cuales fueron sacrificados por dislocación cervical e inmediatamente cerebro e hipófisis fueron removidos. En una placa libre de RNAsa, las hipófisis de cada ejemplar fueron diseccionadas con el fin de separar el AL del intermedio y posterior o neural (NIL), proceso que requirió de la utilización de dos agujas 26G, luego, se colectaron los lóbulos anteriores en ARN TriPure, y se guardaron en -80 °C hasta su utilización.

3. Retrotranscripción: Extracción de ARN y síntesis de cDNA

Una vez recolectadas todas las muestras, se procedió a la extracción de ARN total siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de cada muestra fue medida por medio de la utilización del Nanodrop a una absorbancia de 260 nm, y con el fin de determinar la pureza de las muestras se evaluaron las relaciones 260/280 y 260/230. Se corroboró la integridad de las muestras a través de electroforesis en un gel de agarosa. Se trató 1 mg de ARN total con DNAsa I (Ambion, cat. no. AM2222) durante 45 minutos a 37 °C para asegurar la digestión del ADN genómico de las muestras y se utilizó para la síntesis de cADN un kit de transcripción reversa de alta capacidad con *primers* aleatorios que retrotranscriben todos los tipos de ARN (*Applied Biosystems*, nº de cat. 4368814).

4. qPCR

Para cada reacción, la mezcla de 15 µl de volumen final contenía 5 µl de una dilución de cADN, 0,4 µM de cada *primer -forward y reverse-*, y 7,5 µl de *master mix* con el fluoróforo SYBR Green. El programa de amplificación utilizado fue: 50°C por 2 min, 95°C por 2 min, 40 ciclos de 15 seg a 95°C más 1 min 60°C. Luego de la amplificación, se añadió un ciclo de desnaturalización térmica para obtener la curva de disociación de los productos de PCR y verificar la especificidad de la amplificación (*Melting stage*) en el cual se somete a la muestra a 95°C durante 15 seg. y finalmente 60°C durante 1 minuto. Cada reacción fue realizada por triplicado, se obtuvo el ciclo umbral (Ct, del inglés *cycle threshold*) para cada muestra, y se utilizó el método descrito por Pfaffl para analizar los resultados, que se basa en el ΔCt y la eficiencia de amplificación de los distintos genes (Pfaffl, 2001). Los datos de la expresión relativa para cada gen en cada tejido se expresaron en Unidades Arbitrarias tomando como

valor de “1 unidad” al promedio de los valores de expresión de los ratones *wild-type* machos y hembras por separado.

Las diluciones de ADNc a utilizar y las eficiencias en la fase exponencial de la reacción para cada juego de *primers* fueron calculadas a partir de una curva estándar la cual se construyó ensamblando iguales cantidades de ADNc de cada muestra en una única mezcla (*pool*) a partir de la cual se hicieron diluciones seriadas. A continuación, se graficó el Ct para la dilución *versus* el logaritmo del factor de dilución de cADN y se calculó la eficiencia a partir de la ecuación $E = 10^{-1/\text{pendiente}} \times 100$ donde la pendiente es el gradiente de la línea de regresión lineal. Las diluciones por emplear se determinaron a partir del rango dinámico lineal de la curva, el cual fue determinado a partir de la curva y los coeficientes de correlación (R^2).

5. Análisis estadístico

Los datos se procesaron con el programa GraphPad Prism (versión 8.0.2, 2019, GraphPad Software Inc. Diego, CA, EE.UU.) con el cual también se generaron los gráficos. El mismo programa fue empleado para el análisis de datos mediante test-t de Student y ANOVA de dos vías. Las comparaciones *post-hoc* entre grupos se realizaron utilizando la prueba de Tukey. La normalidad de las distribuciones se analizó con el test de Shapiro-Wilk ($p > 0,05$) y la igualdad de la varianza con la prueba de Bartlett o la prueba F ($p > 0,05$). Los valores de p menores a 0,05 fueron considerados estadísticamente significativos.

Inmunofluorescencia

Obtención, fijación, inclusión, congelamiento y corte de animales

EMBRIONES DE RATÓN E:15.5

De manera similar a la especificada anteriormente, los ratones se aparearon en tríos y cada mañana se inspeccionó el tapón vaginal en las hembras. Las madres preñadas fueron sacrificadas por dislocación cervical a los 15 días de haber observado el tapón vaginal y los embriones fueron colectados en PBS frío (PBS; 0.9% NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM K_2HPO_4 , 2 mM KH_2PO_4 a pH 7.4). Luego, se procedió a su fijación en PFA 4% en PBS (PFA; p/v) a 4 °C, por 2h. Una vez concluido el tiempo de fijación, se lavaron con PBS frío y se transfirieron a una solución de sacarosa al 10% en PBS durante 16 h a 4°C para crioproteger los tejidos. Se

estabilizaron en una solución de 10% gelatina-10% sacarosa en PBS durante media hora a 37°C antes de su inclusión. Luego se armaron tacos de gelatina en moldes plásticos dejando enfriar la gelatina y cuidando la orientación del tejido. Estos tacos se pegaron sobre cuadrados de corcho, de 3 cm de lado aproximadamente, con OCT (Tissue-Tek OCT compound de Sakura Finetek, nº de cat. 4583) cuidando su orientación y se congelaron rápidamente en un baño a -55°C utilizando como buffer la solución 2-metilbutano (Sigma, cat. no. M32631) y almacenados a -80 °C. Finalmente, se realizaron cortes de los tejidos en un criostato (Leica 1510S) y se obtuvieron secciones sagitales de 20 µm colectándolos sobre un portaobjetos Super-Frost Plus (FisherScientific, USA). Se dejaron secar a 16 hs a TA y se los almacenó a -20 °C hasta su uso.

RATONES ADULTOS P90

Ratones adultos fueron anestesiados con avertina (2,2,2-tribromoetanol, SIGMA-Aldrich) preparada en una concentración final del 2% en solución salina (NaCl 0,9%) y administrada (200 µl/10g) intraperitonealmente. Una vez anestesiados, los ratones fueron perfundidos por vía transcardíaca. Para ello se expuso el corazón, se realizó una incisión en la aurícula derecha y se colocó un catéter por el ventrículo izquierdo perfundiéndolo primero con 20 ml de PBS 1X y luego 20 ml de una solución de PFA 4% en PBS. El cerebro y la hipófisis fueron removido inmediatamente y fijado en PFA 4% a TA por 45 minutos y a 4°C durante 16 h respectivamente. Luego, los tejidos fueron lavados dos veces con PBS y los hipotálamos se cortaron groseramente usando cuchillas y un molde de cerebro adulto de acero inoxidable. Se procedió a la crioprotección, al congelamiento y al almacenamiento de igual manera que los embriones. Se obtuvieron cortes coronales de hipófisis (16µm) y de cerebro (20 µm) que fueron colectados en portaobjetos. Se dejaron secar a temperatura ambiente y se los almacenó a -20 °C hasta su uso.

Inmunofluorescencia indirecta en cortes de embriones, cerebros e hipófisis de ratón

Se descongelaron las secciones y se dejaron secar a TA y luego se rehidrataron en KPBS (NaCl al 0,9%, K₂HPO₄ 16 mM, KH₂PO₄ 3,6 mM y pH 7,4) por 1 min. Los cortes fueron incubados ON a 4°C en cámara húmeda, con una solución que contenía el anticuerpo primario anti rACTH (anticuerpo policlonal hecho en conejo; 1:500 para cortes de embriones y adultos; AFP-156102789, National Hormone and Peptide Program, National Institute of Health, NIH) y

suero normal de cabra NGS 2 % (Jackson ImmunoResearch, cat. no. 005-000-001) en KPBS - tritón 0,3%. A la mañana siguiente los cortes se lavaron dos veces con KPBS 1X durante 15 minutos y se incubaron durante dos horas con el anticuerpo secundario anti IgG de conejo hecho en cabra AF488 (1:1000, Cat. No.: A-11008, Invitrogen) en KPBS - tritón 0,3%. Luego, los vidrios se lavaron dos veces más por 15 min en KPBS 1X y se incubaron con una solución 1 mg/l de DAPI en KPBS durante 10 min. Por último, se repitió el proceso de lavado de vidrios en KPBS 1X antes de agregar el medio de montaje Fluorsave (EMD, Milipore Corp., Germany) y cubrirlos con cubreobjetos (Fisher) y asegurarlos con esmalte para evitar la deshidratación. Las imágenes fueron obtenidas usando un microscopio Leica Confocal TCS-SPE. El número de células fluorescentes y su intensidad fueron cuantificadas de manera semiautomática en el programa *ImageJ*, para ello generamos una máscara binaria que produce en última instancia un ROI manager y finalmente utilizamos la función "Analyze" propia del programa. Para el análisis de expresión de *Pomc*, se cuantificaron las células ACTH+ en valor absoluto y la intensidad de expresión con el parámetro IntDen (*Integrated density*) el cual corresponde al producto del área por el valor promedio de fluorescencia en gris. Esta cuantificación se llevó a cabo en la imagen del medio de las obtenidas en el plano Z, cuantificadas a su vez, en tres secciones seriadas de cada animal. Los experimentos de inmunofluorescencia se repitieron 3 veces tanto en adultos como en embriones para cada genotipo.

Tinción de X-gal

Obtención, fijación, inclusión, congelamiento y corte de animales:

EMBRIONES DE RATÓN E:13.5

Hembras *H11 -7 kb (n°s copias) – Lac Z* preñadas de 13.5 dpc fueron sacrificadas por dislocación cervical y sus embriones fueron removidos, lavados con PBS 1X (137mM de NaCl, 2.7 mM de KCl, 10mM Na₂HPO₄ y 2 mM KH₂PO₄, pH 7.4) y fijados con 4% de PFA en PBS durante 30 minutos. Los embriones fijados whole mount fueron lavados dos veces con *Rinse buffer* (fosfato de sodio 100 mM, MgCl₂ 2 mM, deoxicolato de sodio 0.01%, NP-40 0.02%, pH 7.3) durante 20 minutos, y teñidos con una solución de tinción X-gal que contiene: *Rinse buffer*, 1 mg/ml de 5- bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-ácido glucurónico (X-Gal), 2.12 mg/ml de ferrocianida de potasio y 1.64 mg/ml de ferricianida de potasio a 37 °C durante 16 h. Luego se lavaron en KPBS y se deshidrataron con sacarosa al 30% en KPBS a 4 °C durante 16 h.

Posteriormente, fueron incluidos en gelatina 10% - sacarosa 10% en PBS, congelados, cortados en secciones de 20 μ m en el criostato y colectados en portaobjetos Super-Frost Plus (FisherScientific, USA) guardándolos a -20°C hasta su uso.

RATONES ADULTOS P90

Animales adultos P90, de ambos sexos, fueron anestesiados con avertina y perfundidos con 20 ml de PBS y 20 ml de PFA al 4% en PBS, tal y como fue detallado con anterioridad. Tanto el cerebro como la hipófisis fueron removidos inmediatamente y fijados en PFA 4% a TA por 20 minutos y a 4°C por 2 horas respectivamente. Luego, los tejidos fueron lavados dos veces con *Rinse buffer* durante 20 minutos y teñidos con la solución de tinción X-gal durante 2 hs a 37°C. A continuación, dos lavados de 20 minutos en PBS 1X fueron realizados previo a crioproteger los tejidos embebiéndolos en una solución PBS – Sacarosa al 30% ON a 4°C. Finalmente tanto las hipófisis como los hipotálamos, fueron incluidos en gelatina 10% - sacarosa 10% en PBS, congelados, cortados en secciones de 16 μ m y 20 μ m en el criostato y colectados en portaobjetos Super-Frost Plus (FisherScientific, USA) guardándolos a -20°C hasta su uso.

Inmunohistoquímica de embriones, hipotálamos e hipófisis de ratón

Una vez finalizada la recolección, los cortes fueron secados durante 30 min a TA, y postfijado con PFA 2% por 20 minutos con el fin de inmovilizar las proteínas derivadas de la expresión de *Pomc*. A todos los vidrios se los lavó 2 veces con KPBS 1X durante 20 minutos y se los incubó 30 minutos en H₂O₂ al 1% en KPBS, a TA. Dos lavados consecutivos, de 20 minutos cada uno, en KPBS 1X fueron realizados antes de incubar los vidrios ON, en cámara húmeda, a 4°C, con el Anticuerpo primario rACTH (especificado anteriormente, dilución 1:750) con NGS al 2% en KPBS – tritón 0,3%. A la mañana siguiente, se realizó un lavado de 10 minutos en KPBS y se incubó los vidrios con un anticuerpo secundario biotinilado anti-conejo (1: 200, BA-1000, Vector) durante 2 h a TA, luego se lavaron con KPBS y se incubaron con el kit Vectastain Elite ABC (Vector) 1 h a TA. Finalmente, los portaobjetos se enjuagaron en PBS 1X y se incubaron con una solución de diaminobencidina al 1% y H₂O₂ al 0.015% en PBS hasta que se visualizó la coloración de la reacción. Finalmente, se detuvo la misma sumergiendo los portaobjetos en PBS. Se dejaron secar a TA durante 16 hs y luego fueron montados con Permout.

Medición de glucocorticoides en plasma

Recolección de plasma

Para esta etapa experimental, se utilizaron 7 ratones por genotipo (KO y WT) y por sexo ($n_{\text{total}}=28$) los cuales fueron separados de a dos en jaulas independientes 7 días antes de realizar la extracción de sangre con el fin de disminuir al máximo el estrés de los animales y evitar, en lo posible, modificar los niveles de cortisol basales. La sangre se extrajo en un grupo de 4 animales por vez y la misma fue recolectada a las 8 de la mañana y al finalizar la batería de test conductual. Para ello, se inmovilizaron los animales tomando un pellizco de piel amplio de la región dorsocervical y estirando la piel del cuello. Se punzó el plexo venoso a nivel submandibular con una aguja estéril 21G y se recolectó en un microtubo de 1.5ml entre 160 – 240 μl de sangre, dependiendo del peso de cada animal. Para cada ejemplar se tuvo en cuenta que la volemia del ratón es de 80ml/kg aproximadamente, y en todos los casos se extrajo menos del 10% del volumen de sangre circulante. La sangre se dejó reposar 30 minutos a temperatura ambiente y luego fue centrifugada a 4 °C, 3000 rpm, durante 15 minutos; se conservó el sobrenadante (plasma) y se descartó el precipitado. El plasma fue guardado a -20°C hasta terminar de coleccionar todas las muestras.

Medición de glucocorticoides

Para evaluar los niveles de glucocorticoides en plasma, se utilizó el kit comercial ELISA Corticosterone Competitive ELISA Kit (*Thermo Fisher Scientific #E1ACORT*) siguiendo las instrucciones propuestas por el fabricante.

Batería de pruebas conductuales

Con el fin de evaluar la respuesta al estrés, 5 animales de cada sexo y de cada genotipo (KO y WT) fueron probados ($n_{\text{total}} = 20$). Los ratones fueron sometidos a una secuencia de pruebas conductuales no invasivas consecutivas. Luego de que la sangre fuera extraída, se dejó reposar a los animales durante 30 minutos para su recuperación en una caja *Thoren* limpia y se los introdujo en el interior de la caja de la prueba de OF y se los inmovilizó durante dos horas. Se colocó a los animales en sus respectivas jaulas usadas con anterioridad por 10

minutos y se los sometió a la prueba de natación forzada (*The Mouse Forced Swim Test*). Por último, se secó a los animales y se los dejó que se recuperen 10 minutos más en sus jaulas para someterlos finalmente a un Open Field y recolectar de nuevo su sangre.

Prueba de campo abierto (*Open field*)

La actividad locomotora de los animales portadores de la delección del *enhancer* -7 kb fue analizada en una caja de acrílico de 40 x 40 x 40 cm (*Med Associates*) provista de un sistema de láseres de detección de movimiento conectado a una PC en la que el programa Activity Monitor (*Med Associates*) compila la información recibida a través de los siguientes parámetros: distancia ambulatoria recorrida, tiempo en movimiento ambulatorio, áreas de preferencia, entre otros. Estos parámetros sirven para determinar la actividad locomotora de los ratones, así como su nivel de motivación por la actividad exploratoria.

Para realizar las determinaciones, cada uno de los animales fue colocado al azar en una de las cajas, y su actividad fue registrada durante 10 minutos. Luego de la monitorización de cada animal el dispositivo fue desinfectado con una solución de alcohol 70%. En el análisis se estudiaron 6 parámetros en 1 bloque de 10 minutos, y se seleccionó la periferia de la caja como área de preferencia (ZO) versus el centro que en condiciones normales tiende a ser evitado por los ratones por ser un área abierta (Z1).

Los parámetros evaluados fueron:

1. Distancia ambulatoria recorrida en ZO y Z1
2. Número de entradas a Z1
3. Número de movimientos verticales

Definimos que un movimiento sea considerado como ambulatorio cuando interrumpa al menos tres láseres diferentes y continuos de lo contrario, el movimiento es considerado estereotipado. La conducta de movimiento vertical (rearing) se define como aquella en la cual los roedores se paran en sus patas traseras en posición vertical erguida.

Prueba de inmovilización (*Restraint test*)

Se perforó un tubo de centrífuga de 50 ml con orificios lo suficientemente pequeños como para evitar que el ratón se escape, pero lo suficientemente grande para que haya circulación

de aire, Además, la tapa del tubo fue perforada con un diámetro mayor para permitir el paso de la cola del ratón. Se introdujo a cada ratón en el interior del tubo con su cabeza orientada hacia la base cónica del tubo y su cola sujeta con la tapa durante dos horas quedando inmovilizado. Luego, el ratón fue removido del interior del tubo.

Prueba de la natación forzada (*Forced swim test*)

Se llenó un vaso de precipitado de vidrio de 2 litros, en un 75%, con agua que se encontraba entre 21°C – 25°C. Los ratones fueron ubicados en el medio del contenedor sujetándolos con suavidad de su cola y se les permitió nadar durante 10 minutos. Luego del tiempo transcurrido, los ratones fueron removidos del interior del tubo y secados con papel absorbente con delicadeza.

Análisis histológico de la glándula suprarrenal

Se sacrificaron por dislocación cervical 3 ratones P90 por genotipo (KO y WT) y por sexo ($n_{\text{total}} = 12$), y por medio de una incisión abdominal se expusieron los riñones junto a sus respectivas glándulas. Las mismas fueron removidas de inmediato y pesadas en una balanza con rango de medición 0.005g – 62g (*Ohaus, Explorer E00640*). Luego, con el fin de preservar el material, las glándulas suprarrenales fueron fijadas durante 2.30 h con formaldehído en PBS al 10% y preservadas en etanol 70% hasta su procesamiento (24 horas). Las muestras se enviaron a la Facultad de Ciencias Veterinaria – UBA donde fueron incluidas en parafina, cortadas en micrótopo en un tamaño entre 4 a 6 micras y teñidas con Hematoxilina – Eosina. Las imágenes de los cortes fueron obtenidas usando un microscopio Leica DM2500 LED y analizadas con el programa *ImageJ*.

BIBLIOGRAFÍA

Anderson, E. J. P., Çakir, I., Carrington, S. J., Cone, R. D., Ghamari-Langroudi, M., Gillyard, T., Gimenez, L. E., & Litt, M. J. (2016). 60 YEARS OF POMC: Regulation of feeding and energy homeostasis by α -MSH. *Journal of Molecular Endocrinology*, 56(4), T157–T174.

Atrooz, F., Alkadhi, K. A., & Salim, S. (2021). Understanding stress: Insights from rodent models. *Current research in neurobiology*, 2, 100013. <https://doi.org/10.1016/j.crneur.2021.100013>

Ay, N. (2020). Ingredients for robustness. *Theory in Biosciences = Theorie in Den Biowissenschaften*, 139(4), 309–318.

Bailey, K. R., & Crawley, J. N. (2009). Anxiety-Related Behaviors in Mice. In J. J. Buccafusco (Ed.), *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*. (2nd ed.). CRC Press/Taylor & Francis.

Barsh, G. S., & Schwartz, M. W. (2002). Genetic approaches to studying energy balance: perception and integration. *Nature reviews. Genetics*, 3(8), 589–600. <https://doi.org/10.1038/nrg862>

Benoit, S. C., Air, E. L., Coolen, L. M., Strauss, R., Jackman, A., Clegg, D. J., Seeley, R. J., & Woods, S. C. (2002). The catabolic action of insulin in the brain is mediated by melanocortins. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(20), 9048–9052.

Bininda-Emonds, O. R., Cardillo, M., Jones, K. E., MacPhee, R. D., Beck, R. M., Grenyer, R., Price, S. A., Vos, R. A., Gittleman, J. L., & Purvis, A. (2007). The delayed rise of present-day mammals. *Nature*, 446(7135), 507–512. <https://doi.org/10.1038/nature05634>

Blanchette, M., Kent, W. J., Riemer, C., Elnitski, L., Smit, A. F., Roskin, K. M., Baertsch, R., Rosenbloom, K., Clawson, H., Green, E. D., Haussler, D., & Miller, W. (2004). Aligning multiple genomic sequences with the threaded blockset aligner. *Genome research*, 14(4), 708–715. <https://doi.org/10.1101/gr.1933104>

Blayney, J. W., Francis, H., Rampasekova, A., Camellato, B., Mitchell, L., Stolper, R., Cornell, L., Babbs, C., Boeke, J. D., Higgs, D. R., & Kassouf, M. (2023). Super-enhancers include classical enhancers and facilitators to fully activate gene expression. *Cell*, 186(26), 5826–5839.e18.

Budry, L., Balsalobre, A., Gauthier, Y., Khetchoumian, K., L'honoré, A., Vallette, S., Brue, T., Figarella-Branger, D., Meij, B., & Drouin, J. (2012). The selector gene Pax7 dictates alternate pituitary cell fates through its pioneer action on chromatin remodeling. *Genes & Development*, 26(20), 2299–2310.

Busada, J. T., & Cidlowski, J. A. (2017). Mechanisms of Glucocorticoid Action During Development. *Current Topics in Developmental Biology*, 125, 147–170.

Candel González, F. J., Matesanz David, M., & Candel Monserrate, I. (2001). Insuficiencia corticosuprarrenal primaria. Enfermedad de Addison [Primary adrenal insufficiency. Addison's disease]. *Anales de medicina interna (Madrid, Spain : 1984)*, 18(9), 492–498.

Cawley, N. X., Li, Z., & Loh, Y. P. (2016). 60 YEARS OF POMC: Biosynthesis, trafficking, and secretion of pro-opiomelanocortin-derived peptides. *Journal of molecular endocrinology*, 56(4), T77–T97. <https://doi.org/10.1530/JME-15-0323>

Chabre, O., Goichot, B., Zenaty, D., & Bertherat, J. (2017). Group 1. Epidemiology of primary and secondary adrenal insufficiency: Prevalence and incidence, acute adrenal insufficiency, long-term morbidity and mortality. *Annales D'endocrinologie*, 78(6), 490–494.

Chang, A. C., Cochet, M., & Cohen, S. N. (1980). Structural organization of human genomic DNA encoding the pro-opiomelanocortin peptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(8), 4890–4894.

Chen, W., Kelly, M. A., Opitz-Araya, X., Thomas, R. E., Low, M. J., & Cone, R. D. (1997). Exocrine gland dysfunction in MC5-R-deficient mice: Evidence for coordinated regulation of exocrine gland function by melanocortin peptides. *Cell*, 91(6), 789–798. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80467-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80467-5)

Cheung, C. C., Clifton, D. K., & Steiner, R. A. (1997). Proopiomelanocortin Neurons Are Direct Targets for Leptin in the Hypothalamus. *Endocrinology*, 138(10), 4489–4492.

Chhajlani, V. (1996). Distribution of cDNA for melanocortin receptor subtypes in human tissues. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 38(1), 73–80. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8932521>

Chrousos, G. P., & Gold, P. W. (1992). The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 267(9), 1244–1252.

Cone, R. D. (2005). Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nature Neuroscience*, 8(5), 571–578.

Cone, R. D. (2006). Studies on the physiological functions of the melanocortin system. *Endocrine Reviews*, 27(7), 736–749.

Cortés, R., Navarro, S., Agulleiro, M. J., Guillot, R., García-Herranz, V., Sánchez, E., & Cerdá-Reverter, J. M. (2014). Evolution of the melanocortin system. *General and Comparative Endocrinology*, 209, 3–10.

Cowley, M. A., Smart, J. L., Rubinstein, M., Cerdán, M. G., Diano, S., Horvath, T. L., Cone, R. D., & Low, M. J. (2001). Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature*, 411(6836), 480–484.

Cowley, M. A., Smith, R. G., Diano, S., Tschöp, M., Pronchuk, N., Grove, K. L., Strasburger, C. J., Bidlingmaier, M., Esterman, M., Heiman, M. L., Garcia-Segura, L. M., Nillni, E. A., Mendez, P., Low, M. J., Sotonyi, P., Friedman, J. M., Liu, H., Pinto, S., Colmers, W. F., ... Horvath, T. L. (2003). The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron*, 37(4), 649–661.

Cramer P. (2019). Organization and regulation of gene transcription. *Nature*, 573(7772), 45–54. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1517-4>

Crusio, W. E., Sluyter, F., Gerlai, R. T., & Pietropaolo, S. (2013). Behavioral Genetics of the Mouse: Volume 1, Genetics of Behavioral Phenotypes. Cambridge University Press.

Czéh, B., Fuchs, E., Wiborg, O., & Simon, M. (2016). Animal models of major depression and their clinical implications. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 64, 293–310. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2015.04.004>

de Souza, F. S. J., Santangelo, A. M., Bumashny, V., Avale, M. E., Smart, J. L., Low, M. J., & Rubinstein, M. (2005). Identification of neuronal enhancers of the proopiomelanocortin gene by transgenic mouse analysis and phylogenetic footprinting. *Molecular and Cellular Biology*, 25(8), 3076–3086.

Drouin J. (2016). 60 YEARS OF POMC: Transcriptional and epigenetic regulation of POMC gene expression. *Journal of molecular endocrinology*, 56(4), T99–T112. <https://doi.org/10.1530/JME-15-0289>

Drouin, J., & Goodman, H. M. (1980). Most of the coding region of rat ACTH beta--LPH precursor gene lacks intervening sequences. *Nature*, 288(5791), 610–613.

Ennaceur, A. (2014). Tests of unconditioned anxiety - pitfalls and disappointments. *Physiology & Behavior*, 135, 55–71.

Fan, W., Boston, B. A., Kesterson, R. A., Hruby, V. J., & Cone, R. D. (1997). Role of melanocortinerig neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature*, 385(6612), 165–168.

Franchini, L. F., López-Leal, R., Nasif, S., Beati, P., Gelman, D. M., Low, M. J., de Souza, F. J., & Rubinstein, M. (2011). Convergent evolution of two mammalian neuronal enhancers by sequential exaptation of unrelated retroposons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(37), 15270–15275. <https://doi.org/10.1073/pnas.1104997108>

Fujii, W., Kawasaki, K., Sugiura, K., & Naito, K. (2013). Efficient generation of large-scale genome-modified mice using gRNA and CAS9 endonuclease. *Nucleic Acids Research*, 41(20), e187. Ghrelin. (2015). *Molecular Metabolism*, 4(6), 437–460.

Hael, C. E., Rojo, D., Orquera, D. P., Low, M. J., & Rubinstein, M. (2020). The transcriptional regulator PRDM12 is critical for Pomc expression in the mouse hypothalamus and controlling food intake, adiposity, and body weight. *Molecular metabolism*, 34, 43–53. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2020.01.007>

Hill, J. W., Elias, C. F., Fukuda, M., Williams, K. W., Berglund, E. D., Holland, W. L., Cho, Y.-R., Chuang, J.-C., Xu, Y., Choi, M., Lauzon, D., Lee, C. E., Coppari, R., Richardson, J. A., Zigman, J. M., Chua, S., Scherer, P. E., Lowell, B. B., Brüning, J. C., & Elmquist, J. K. (2010). Direct insulin and leptin action on pro-opiomelanocortin neurons is required for normal glucose homeostasis and fertility. *Cell Metabolism*, 11(4), 286–297.

Hnisz, D., Abraham, B. J., Lee, T. I., Lau, A., Saint-André, V., Sigova, A. A., Hoke, H. A., & Young, R. A. (2013). Super-enhancers in the control of cell identity and disease. *Cell*, 155(4), 934–947. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.053>

Joseph, D. N., & Whirledge, S. (2017). Stress and the HPA Axis: Balancing Homeostasis and Fertility. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(10). <https://doi.org/10.3390/ijms18102224>

Juruena, M. F., Eror, F., Cleare, A. J., & Young, A. H. (2020). The Role of Early Life Stress in HPA Axis and Anxiety. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1191, 141–153.

Kandel, E. R., Schwartz, J. H., & Jessell, T. M. (2001). *Principios de neurociencia*.

Kassouf, M., Ford, S., Blayney, J., & Higgs, D. (2023). Understanding fundamental principles of enhancer biology at a model locus: Analysing the structure and function of an enhancer cluster at the α -globin locus. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 45(10), e2300047.

Kent W. J. (2002). BLAT--the BLAST-like alignment tool. *Genome research*, 12(4), 656–664. <https://doi.org/10.1101/gr.229202>

Könner, A. C., Janoschek, R., Plum, L., Jordan, S. D., Rother, E., Ma, X., Xu, C., Enriori, P., Hampel, B., Barsh, G. S., Kahn, C. R., Cowley, M. A., Ashcroft, F. M., & Brüning, J. C. (2007). Insulin action in AgRP-expressing neurons is required for suppression of hepatic glucose production. *Cell Metabolism*, 5(6), 438–449.

Krashes, M. J., Lowell, B. B., & Garfield, A. S. (2016). Melanocortin-4 receptor-regulated energy homeostasis. *Nature Neuroscience*, 19(2), 206–219.

Krude, H., Biebermann, H., Luck, W., Horn, R., Brabant, G., & Grüters, A. (1998). Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nature Genetics*, 19(2), 155–157. <https://doi.org/10.1038/509>

Kvon, E. Z., Zhu, Y., Kelman, G., Novak, C. S., Plajzer-Frick, I., Kato, M., Garvin, T. H., Pham, Q., Harrington, A. N., Hunter, R. D., Godoy, J., Meky, E. M., Akiyama, J. A., Afzal, V., Tran, S., Escande, F., Gilbert-Dussardier, B., Jean-Marçais, N., Hudaiberdiev, S., ... Pennacchio, L. A. (2020). Comprehensive In Vivo Interrogation Reveals Phenotypic Impact of Human Enhancer Variants. *Cell*, 180(6), 1262–1271.e15.

Lam, D. D., de Souza, F. S. J., Nasif, S., Yamashita, M., López-Leal, R., Otero-Corchon, V., Meece, K., Sampath, H., Mercer, A. J., Wardlaw, S. L., Rubinstein, M., & Low, M. J. (2015). Partially redundant enhancers cooperatively maintain Mammalian pomc expression above a critical functional threshold. *PLoS Genetics*, 11(2), e1004935.

Lamolet, B., Pulichino, A. M., Lamonerie, T., Gauthier, Y., Brue, T., Enjalbert, A., & Drouin, J. (2001). A pituitary cell-restricted T box factor, Tpit, activates POMC transcription in cooperation with Pitx homeoproteins. *Cell*, 104(6), 849–859. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00282-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00282-3)

Langlais, D., Couture, C., Sylvain-Drolet, G., & Drouin, J. (2011). A pituitary-specific enhancer of the POMC gene with preferential activity in corticotrope cells. *Molecular Endocrinology*, 25(2), 348–359.

Leistner, C., & Menke, A. (2020). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis and stress. *Handbook of Clinical Neurology*, 175, 55–64.

Levasseur, A., Dumontet, T., & Martinez, A. (2019). Sexual dimorphism in adrenal gland development and tumorigenesis. *Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research*, 8, 60–65.

Liu, H., Du, T., Li, C., & Yang, G. (2021). STAT3 phosphorylation in central leptin resistance. *Nutrition & Metabolism*, 18(1), 39.

Miller, W. L. (2018). The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis: A Brief History. *Hormone Research in Paediatrics*, 89(4), 212–223.

Mitchell, A. L., & Pearce, S. H. (2012). Autoimmune Addison disease: pathophysiology and genetic complexity. *Nature reviews. Endocrinology*, 8(5), 306–316. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2011.245>

Moran T.H. Cholecystokinin and satiety: current perspectives. (2000). *Nutrition*, 16(10), 858–865.

Narváez-Casillas VE, Vargas-Hernández A (2012). Enfermedad de Addison en un adolescente masculino. *Rev Hosp Jua Mex.* 79(2):119-124.

Nasif, S., de Souza, F. S., González, L. E., Yamashita, M., Orquera, D. P., Low, M. J., & Rubinstein, M. (2015). Islet 1 specifies the identity of hypothalamic melanocortin neurons and is critical for normal food intake and adiposity in adulthood. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(15), E1861–E1870. <https://doi.org/10.1073/pnas.1500672112>

Navarro Acebes, X. (2002). Fisiología del sistema nervioso autónomo. *Revista de neurologia*, 35(06), 553.

Nguyen HP, Chan C, et al. (2022) Integrative single-cell characterization of hypothalamus sex-differential and obesity-associated genes and regulatory elements. *bioRxiv*.11.06.515311; doi.org/10.1101/2022.11.06.515311

Orquera, D. P., Tavella, M. B., de Souza, F. S. J., Nasif, S., Low, M. J., & Rubinstein, M. (2019). The Homeodomain Transcription Factor NKX2.1 Is Essential for the Early Specification of Melanocortin Neuron Identity and Activates *Pomc* Expression in the Developing Hypothalamus. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 39(21), 4023–4035. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2924-18.2019>

Papaioannou, V. E. (2014). The T-box gene family: emerging roles in development, stem cells and cancer. *Development*, 141(20), 3819–3833.

Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), e45.

Pulichino, A.-M., Vallette-Kasic, S., Couture, C., Gauthier, Y., Brue, T., David, M., Malpuech, G., Deal, C., Van Vliet, G., De Vroede, M., Riepe, F. G., Partsch, C.-J., Sippell, W. G., Berberoglu, M., Atasay, B., & Drouin, J. (2003). Human and mouse TPIT gene mutations cause early onset pituitary ACTH deficiency. *Genes & Development*, 17(6), 711–716.

Quarta, C., Fiset, A., Xu, Y., Colldén, G., Legutko, B., Tseng, Y.-T., Reim, A., Wierer, M., De Rosa, M. C., Klaus, V., Rausch, R., Thaker, V. V., Graf, E., Strom, T. M., Poher, A.-L., Gruber, T., Le Thuc, O., Cebrian-Serrano, A., Kabra, D., ... Tschöp, M. H. (2019). Functional identity of hypothalamic melanocortin neurons depends on Tbx3. *Nature Metabolism*, 1(2), 222–235.

Rojo, D., Hael, C. E., Soria, A., de Souza, F. S. J., Low, M. J., Franchini, L. F., & Rubinstein, M. (2024). A mammalian tripartite enhancer cluster controls hypothalamic *Pomc* expression, food intake, and body weight. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 121(18), e2322692121. <https://doi.org/10.1073/pnas.2322692121>

Rubinstein, M., & Low, M. J. (2017). Molecular and functional genetics of the proopiomelanocortin gene, food intake regulation and obesity. *FEBS Letters*, 591(17), 2593–2606.

Rubinstein, M., Mogil, J. S., Japón, M., Chan, E. C., Allen, R. G., & Low, M. J. (1996). Absence of opioid stress-induced analgesia in mice lacking beta-endorphin by site-directed mutagenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(9), 3995-4000.

Rubinstein, M., Mortrud, M., Liu, B., & Low, M. J. (1993). Rat and mouse proopiomelanocortin gene sequences target tissue-specific expression to the pituitary gland but not to the hypothalamus of transgenic mice. *Neuroendocrinology*, 58(4), 373–380. <https://doi.org/10.1159/000126566>

Sabarís, G., Laiker, I., Preger-Ben Noon, E., & Frankel, N. (2019). Actors with Multiple Roles: Pleiotropic Enhancers and the Paradigm of Enhancer Modularity. *Trends in Genetics: TIG*, 35(6), 423–433.

Sánchez, E., Rubio, V. C., & Cerdá-Reverter, J. M. (2009). Characterization of the sea bass melanocortin 5 receptor: a putative role in hepatic lipid metabolism. *The Journal of Experimental Biology*, 212(Pt 23), 3901–3910.

Santangelo, A. M., de Souza, F. S., Franchini, L. F., Bumashny, V. F., Low, M. J., & Rubinstein, M. (2007). Ancient exaptation of a CORE-SINE retroposon into a highly conserved mammalian neuronal enhancer of the proopiomelanocortin gene. *PLoS genetics*, 3(10), 1813–1826. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030166>

Schauer, E., Trautinger, F., Köck, A., Schwarz, A., Bhardwaj, R., Simon, M., Ansel, J. C., Schwarz, T., & Luger, T. A. (1994). Proopiomelanocortin-derived peptides are synthesized and released by human keratinocytes. *The Journal of Clinical Investigation*, 93(5), 2258–2262.

Scholzen, T. E., Brzoska, T., Kalden, D. H., Hartmeyer, M., Fastrich, M., Luger, T. A., Armstrong, C. A., & Ansel, J. C. (1999). Expression of functional melanocortin receptors and proopiomelanocortin peptides by human dermal microvascular endothelial cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 885, 239–253.

Sebé-Pedrós, A., Ariza-Cosano, A., Weirauch, M. T., Leininger, S., Yang, A., Torruella, G., Adamski, M., Adamska, M., Hughes, T. R., Gómez-Skarmeta, J. L., & Ruiz-Trillo, I. (2013). Early evolution of the T-box transcription factor family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(40), 16050–16055. <https://doi.org/10.1073/pnas.1309748110>

Sebé-Pedrós, A., & Ruiz-Trillo, I. (2017). Evolution and Classification of the T-Box Transcription Factor Family. *Current topics in developmental biology*, 122, 1–26. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2016.06.004>

Seibenhener, M. L., & Wooten, M. C. (2015). Use of the Open Field Maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 96, e52434.

Siepel A. (2019). Challenges in funding and developing genomic software: roots and remedies. *Genome biology*, 20(1), 147. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1763-7>

Siepel, A., Bejerano, G., Pedersen, J. S., Hinrichs, A. S., Hou, M., Rosenbloom, K., Clawson, H., Spieth, J., Hillier, L. W., Richards, S., Weinstock, G. M., Wilson, R. K., Gibbs, R. A., Kent, W. J., Miller, W., & Haussler, D. (2005). Evolutionarily conserved elements in vertebrate, insect, worm, and yeast genomes. *Genome research*, 15(8), 1034–1050. <https://doi.org/10.1101/gr.3715005>

Singh, D., & Yi, S. V. (2021). Enhancer Pleiotropy, Gene Expression, and the Architecture of Human Enhancer-Gene Interactions. *Molecular Biology and Evolution*, 38(9), 3898–3909.

Smith, A. I., & Funder, J. W. (1988). Proopiomelanocortin processing in the pituitary, central nervous system, and peripheral tissues. *Endocrine reviews*, 9(1), 159–179. <https://doi.org/10.1210/edrv-9-1-159>

Smith, E., & Shilatifard, A. (2014). Enhancer biology and enhanceropathies. *Nature structural & molecular biology*, 21(3), 210–219. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2784>

Spitz, F., & Furlong, E. E. (2012). Transcription factors: from enhancer binding to developmental control. *Nature reviews. Genetics*, 13(9), 613–626. <https://doi.org/10.1038/nrg3207>

Sturman, O., Germain, P.-L., & Bohacek, J. (2018). Exploratory rearing: a context- and stress-sensitive behavior recorded in the open-field test. *Stress*, 21(5), 443–452.

Tao, Y.-X. (2017). Melanocortin receptors. *Biochimica et Biophysica Acta, Molecular Basis of Disease*, 1863(10 Pt A), 2411–2413.

Tasic, B., Hippenmeyer, S., Wang, C., Gamboa, M., Zong, H., Chen-Tsai, Y., & Luo, L. (2011). Site-specific integrase-mediated transgenesis in mice via pronuclear injection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(19), 7902–7907. <https://doi.org/10.1073/pnas.1019507108>

Tritos, N. A., & Biller, B. M. (2014). Cushing's disease. *Handbook of clinical neurology*, 124, 221–234. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59602-4.00015-0>

Uchida, A., Zigman, J. M., & Perello, M. (2013). Ghrelin and eating behavior: evidence and insights from genetically-modified mouse models. *Frontiers in Neuroscience*, 7, 54794.

- Watson, S. J., Akil, H., Richard, C. W., 3rd, & Barchas, J. D. (1978). Evidence for two separate opiate peptide neuronal systems. *Nature*, 275(5677), 226–228.
- Wilson, V., & Conlon, F. L. (2002). The T-box family. *Genome Biology*, 3(6), REVIEWS3008.
- Wintzen, M., Yaar, M., Burbach, J. P., & Gilchrest, B. A. (1996). Proopiomelanocortin gene product regulation in keratinocytes. *The Journal of Investigative Dermatology*, 106(4), 673–678.
- Woods, S. C., Lutz, T. A., Geary, N., & Langhans, W. (2006). Pancreatic signals controlling food intake; insulin, glucagon and amylin. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 361(1471), 1219–1235.
- Yang, H., Wang, H., Shivalila, C. S., Cheng, A. W., Shi, L., & Jaenisch, R. (2013). One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, 154(6), 1370–1379.
- Yaswen, L., Diehl, N., Brennan, M. B., & Hochgeschwender, U. (1999). Obesity in the mouse model of pro-opiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin. *Nature medicine*, 5(9), 1066–1070. <https://doi.org/10.1038/12506>
- Yen, S.-T., Zhang, M., Deng, J. M., Usman, S. J., Smith, C. N., Parker-Thornburg, J., Swinton, P. G., Martin, J. F., & Behringer, R. R. (2014). Somatic mosaicism and allele complexity induced by CRISPR/Cas9 RNA injections in mouse zygotes. *Developmental Biology*, 393(1), 3–9.
- Yu, H., Rubinstein, M., & Low, M. J. (2022). Developmental single-cell transcriptomics of hypothalamic POMC neurons reveal the genetic trajectories of multiple neuropeptidergic phenotypes. *eLife*, 11. <https://doi.org/10.7554/eLife.72883>
- Zabidi, M. A., & Stark, A. (2016). Regulatory Enhancer-Core-Promoter Communication via Transcription Factors and Cofactors. *Trends in Genetics: TIG*, 32(12), 801–814.
- Zimprich, A., Garrett, L., Deussing, J. M., Wotjak, C. T., Fuchs, H., Gailus-Durner, V., de Angelis, M. H., Wurst, W., & Hölter, S. M. (2014). A robust and reliable non-invasive test for stress responsivity in mice. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 8, 125.