



Universidad de Concepción  
Dirección de Postgrado  
Facultad de Ciencias Biológicas -Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas  
Área Biología Celular y Molecular

**Participación de los transportadores de  
monocarboxilatos hipotalámicos en la regulación de la  
ingesta alimenticia.**

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas  
Área Biología Celular y Molecular

ROBERTO JAVIER ELIZONDO VEGA  
CONCEPCIÓN-CHILE  
2016

Profesor Guía: María de los Ángeles García Robles  
Dpto. de Biología Celular, Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

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

Profesores integrantes Comisión Evaluadora:

---

Dra. María de los Ángeles García Robles  
Profesor Guía de Tesis  
Facultad de Ciencias Biológicas

---

Dra. Roxana Pincheira  
Facultad de Ciencias Biológicas

---

Dr. Sylvain Marcellini  
Facultad de Ciencias Biológicas

---

Dr. Juan Reyes  
Profesor Evaluador Externo  
Universidad de Católica de Valparaíso

---

Dr. Juan Pablo Henríquez H.  
Director  
Programa Doctorado en Ciencias Biológicas  
Área Biología Celular y Molecular



Tesis de doctorado financiada por:

Proyecto FONDECYT # 1100705 (2010-2013).

Proyecto FONDECYT # 1140677 (2014-2017).

Beca CONICYT para estudios de doctorado (2011-2014).

Beca CONICYT para término de tesis doctoral (2015).

Beca CONICYT para la asistencia de congresos nacionales (2011-2015).


Beca CONICYT para la asistencia de congresos en el extranjero (2014).

Beca Escuela de Graduados de la Universidad de Concepción para la asistencia a congresos en el extranjero (2014).

Escuela de Graduados de la Universidad de Concepción (2015)

Beca proyecto MECESUP UCO 1311 para la asistencia a congresos nacionales (2015).

## INDICE GENERAL

	<b>Página</b>
<b>Índice General.</b>	<b>I</b>
<b>Índice de Figuras.</b>	<b>X</b>
<b>Índice de Tablas.</b>	<b>XV</b>
<b>Abreviaturas.</b>	<b>XVI</b>
<b>RESUMEN.</b>	<b>XX-XXI</b>
<b>ABSTRACT.</b>	<b>XXII-XXIII</b>
	
<b>I. INTRODUCCIÓN.</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Aspectos generales de la regulación de la ingesta de alimentos.</b>	<b>1</b>
<b>1.2. El hipotálamo y la ingesta de alimentos.</b>	<b>3</b>
1.2.1. Características morfológicas de la región hipotalámica.	3
1.2.2. Regulación hipotalámica de la ingesta de alimentos.	5
<b>1.3. Homeostasis de la glucosa.</b>	<b>10</b>
1.3.1. Control periférico de la concentración de glucosa.	10

1.3.2.	Participación del hipotálamo en la homeostasis de la glucosa.	11
1.3.3.	Glía endimaria hipotalámica y su función en el <i>sensing</i> de glucosa.	14
<b>1.4.</b>	<b>Interacción glía-neurona en el glucosensing hipotalámico.</b>	<b>18</b>
1.4.1.	Transportadores de monocarboxilatos y su expresión cerebral.	24
1.4.2.	Regulación de la actividad de los transportadores de monocarboxilatos y su asociación a patologías.	29
1.4.3.	Rol de los transportadores de monocarboxilatos en el acoplamiento glía-neurona hipotalámico.	32
<b>2.</b>	<b>Planteamiento general del problema</b>	<b>35</b>
<b>3.</b>	<b>Hipótesis.</b>	<b>38</b>
3.1.	Objetivo general.	38
3.2.	Objetivos específicos.	38
<b>II.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS.</b>	<b>39</b>
<b>1.</b>	<b>Animales de experimentación.</b>	<b>39</b>
<b>2.</b>	<b>Cultivos celulares</b>	<b>39</b>
2.1.	Cultivos primarios de tanicitos hipotalámicos.	39
2.2.	Cultivos de astrocitos obtenidos desde corteza de rata.	40

2.3.	Cultivo de células 293A.	41
2.4.	Cultivo de células 293T.	42
2.5.	Cultivo de células GT1-7	42
<b>3.</b>	<b>Procesamiento histológico.</b>	<b>43</b>
3.1.	Fijación.	43
3.2.	Procesamiento criogénico y obtención de cortes por congelación.	43
<b>4.</b>	<b>Inmunohistoquímica.</b>	<b>43</b>
4.1.	Inmunohistoquímica para cortes de tejidos.	43
4.2.	Inmunofluorescencia en células.	44
4.3.	Estudios de marcaje múltiple.	45
4.4.	Microscopía confocal.	46
4.5.	Microscopía confocal espectral.	47
4.6.	Procesamiento de imágenes.	47
<b>5.</b>	<b>RT-PCR convencional y RT-PCR en tiempo real.</b>	<b>48</b>
5.1.	Extracción de ARN total.	48
5.2.	Transcripción reversa del ARN total (RT).	48

5.3.	Amplificación del ADNc por PCR.	49
5.4.	RT-PCR cuantitativo en tiempo real (qRT-PCR).	50
5.5.	Electroforesis en gel de agarosa.	50
<b>6.</b>	<b>Ensayos de inmunodetección de proteínas.</b>	<b>51</b>
6.1.	Obtención de extractos de proteínas totales.	51
6.2.	Electroforesis en gel de poliacrilamida y electrotransferencia.	52
6.3.	Inmunodetección de proteínas.	52
<b>7.</b>	<b>Incorporación de L-lactato en cultivos primarios de tanicitos.</b>	<b>53</b>
<b>8.</b>	<b>Liberación de lactato en cultivos primarios de tanicitos.</b>	<b>54</b>
<b>9.</b>	<b>Determinación de la velocidad glucolítica.</b>	<b>56</b>
<b>10.</b>	<b>Construcción de plasmidios que expresan ARNs horquillas (shARN) y generación de adenovirus.</b>	<b>56</b>
10.1.	Selección de las secuencias blancas para shARN.	56
10.2.	Clonamiento de los shARN en vectores <i>shuttle</i> adenovirales.	57
10.2.1.	Construcción del vector shuttle adenoviral pDC311.2-OFF-tdTomato.	57
10.2.2.	TOPO- <i>cloning</i> .	59

10.2.3.	Transformación bacteriana.	59
10.2.4.	Selección de colonias.	61
10.2.5.	Clonamiento de los shARNs en el vector <i>shuttle</i> adenoviral (pDC311.2-OFF-EGFP y pDC311.2-OFF-tdTomato).	61
10.3.	Generación de adenovirus.	62
<b>11.</b>	<b>Utilización y evaluación de los adenovirus <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>.</b>	<b>65</b>
11.1.	Transducción <i>in vitro</i> .	65
11.2.	Transducción <i>in vivo</i> .	65
11.3.	Evaluación de la expresión de neuropéptidos hipotalámicos en respuesta a la inyección i.c.v. de glucosa.	66
11.4.	Evaluación de la ingesta alimenticia en animales <i>knockdown</i> .	67
<b>12.</b>	<b>Determinación de la glicemia.</b>	<b>70</b>
<b>13.</b>	<b>Análisis estadístico.</b>	<b>70</b>
<b>III.</b>	<b>RESULTADOS.</b>	<b>71</b>
<b>1</b>	<b>Capítulo 1. Definir si la inhibición de MCT1 y MCT4 disminuye el transporte de lactato en tanicitos <i>in vitro</i>.</b>	<b>71</b>
1.1.	Los cultivos primarios de tanicitos conservan la expresión de MCT1 y MCT4.	71
1.2.	Los cultivos primarios de tanicitos poseen una elevada	73



velocidad glicolítica y capacidad de liberar lactato.

1.3.	Los adenovirus pueden ser titulados gracias a la presencia del gen reportero.	77
1.4.	Inhibición de la expresión endógena de MCT1 en tanicitos utilizando vectores adenovirales.	80
1.5.	Inhibición de la expresión endógena de MCT4 en tanicitos utilizando AdshMCT4 EGFP y AdshMCT4-tdTomato.	84
1.6.	Doble <i>knockdown</i> para la expresión MCT1 y MCT4 en tanicitos utilizando AdshMCT1-EGFP y AdshMCT4-tdTomato.	88
1.7.	El <i>knockdown in vitro</i> de MCT1 y MCT4 disminuye la expresión del ARNm de MCT2.	89
1.8.	En cultivos primarios de tanicitos, el doble <i>knockdown</i> de MCT1 y MCT4 afecta la incorporación y liberación de lactato.	94
2.	<b>Capítulo 2. Demostrar que la inhibición <i>in vivo</i> de MCT1 y MCT4 en el hipotálamo, afecta la función glucosensora que controla la ingesta alimenticia durante aumentos de la glucorraquia.</b>	<b>97</b>
2.1.	Evaluación en el tiempo de la expresión de EGFP, al inyectar i.c.v. el AdshMCT1 en el tercer ventrículo.	98
2.2.	El AdshMCT1 inyectado en el 3V transduce tanicitos <i>in vivo</i> .	99
2.3.	Evaluación de la expresión de EGFP frente a la inyección i.c.v. del AdshMCT4.	108

2.4.	Análisis de la capacidad de <i>knockdown in vivo</i> del AdshMCT4 y su efecto sobre la expresión de MCT1.	110
2.5.	Análisis de la capacidad del doble <i>knockdown in vivo</i> para MCT1 y MCT4.	110
2.6.	Efecto del <i>knockdown in vivo</i> de MCT4 y del doble <i>knockdown</i> de MCT1 y MCT4 sobre la expresión de MCT2.	111
2.7.	Análisis del efecto de la glucosa i.c.v. en animales <i>knockdown</i> para MCT4, sobre la expresión de neuropéptidos orexígenos.	115
2.8.	Análisis del efecto de la inyección i.c.v. de glucosa en animales <i>knockdown</i> para MCT4 sobre la expresión de neuropéptidos anorexígenos.	116
2.9.	Análisis del efecto de la inyección i.c.v. de glucosa, en animales doble <i>knockdown</i> de MCT1 y MCT4, sobre la expresión de neuropéptidos orexígenos.	120
2.10.	Análisis del efecto de la inyección i.c.v. de glucosa, en animales doble <i>knockdown</i> para MCT1 y MCT4, sobre la expresión de neuropéptidos anorexígenos.	122
<b>3.</b>	<b>Capítulo 3. Definir los cambios en la conducta alimenticia en animales <i>knockdown</i> para MCT1 y MCT4.</b>	<b>124</b>
3.1.	Análisis del efecto del <i>knockdown</i> de MCT1 sobre la ingesta alimenticia.	124

3.2.	Evaluación de la inhibición de MCT1 sobre la frecuencia alimenticia.	125
3.3.	Análisis del establecimiento de la saciedad en animales inhibidos para MCT1.	129
3.4.	Disminución de la ingesta alimenticia en animales <i>knockdown</i> para MCT4.	133
3.5.	La frecuencia alimenticia aumenta en animales <i>knockdown</i> para MCT4.	135
3.6.	Los animales <i>knockdown</i> para MCT4 presentan problemas en el establecimiento de la saciedad.	136
3.7.	Los animales doble <i>knockdown</i> para MCT1 y MCT4, presentan un incremento en su ingesta alimenticia.	141
3.8.	La inhibición de MCT1 y MCT4, incrementa la frecuencia alimenticia.	143
3.9.	Los animales doble <i>knockdown</i> para MCT1 y MCT4, presentan alteración en el establecimiento de la saciedad.	144
<b>IV.</b>	<b>DISCUSIÓN.</b>	<b>149</b>
4.1.	Rol de MCT1 en el acoplamiento metabólico tanicito-neurona como modelo para la detección de glucosa en el hipotálamo.	149

4.2.	Rol de MCT4 en el mecanismo de detección de glucosa hipotalámico a través del acoplamiento metabólico tanicito-neurona.	161
4.3.	Función de MCT1 y MCT4 sobre la expresión de neuropéptidos y su participación en la regulación de la ingesta alimenticia.	166
<b>V.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.</b>	<b>173</b>



## INDICE DE FIGURAS

		<b>Página</b>
Figura 1	Representación esquemática de los núcleos hipotalámicos.	4
Figura 2	Circuitos neuronales que controlan la ingesta alimenticia y biodisponibilidad de glucosa.	9
Figura 3	Distribución general de los tanicitos en la pared ventricular del tercer ventrículo.	16-17
Figura 4	Modelo del <i>sensing</i> de glucosa hipotalámico basado en el acoplamiento metabólico entre tanicitos y neuronas.	34
Figura 5	Esquema de construcción de los vectores <i>shuttle</i> adenovirales.	60
Figura 6	Esquema del clonamiento de los shARN y de la producción de adenovirus por recombinación en las células HEK293A.	64
Figura 7	Procedimiento experimental diseñado para los estudios <i>in vivo</i> .	69
Figura 8	Caracterización de cultivos primarios de tanicitos obtenidos desde hipotálamo de rata.	75
Figura 9	Análisis de la velocidad glicolítica y liberación de lactato en tanicitos.	76
Figura 10	Producción de partículas adenovirales en células HEK293 para la expresión de sh $\beta$ gal, shMCT1 y shMCT4.	79

Figura 11	<i>Knockdown</i> de MCT1 en cultivos primarios de tanicitos hipotalámicos.	82-83
Figura 12	<i>Knockdown</i> de MCT4 en cultivos primarios de tanicitos hipotalámicos.	86-87
Figura 13	<i>Knockdown</i> de MCT1 y MCT4 en cultivos primarios de tanicitos hipotalámicos.	91-92
Figura 14	Análisis de la expresión de MCT2 en cultivos primarios de tanicitos hipotalámicos transducidos con AdshMCT1 y/o AdshMCT4.	93
Figura 15	Captación y liberación de lactato en cultivos primarios de tanicitos hipotalámicos <i>knockdown</i> para MCT1 y/o MCT4.	96
Figura 16	Identificación de las células transducidas en el 3V con el AdshMCT1, mediante microscopía confocal.	100
Figura 17	Co-distribución de EGFP y marcadores gliales en tanicitos $\alpha$ del hipotálamo basal transducidos con AdshMCT1.	103-104
Figura 18	Co-distribución de EGFP y marcadores gliales en tanicitos $\beta$ del hipotálamo basal transducidos con AdshMCT1.	105-106
Figura 19	Co-distribución de EGFP y el marcador neuronal HuC en el hipotálamo basal.	107
Figura 20	Co-distribución de EGFP y marcadores gliales del hipotálamo basal en animales <i>knockdown</i> para MCT4.	109
Figura 21	Análisis de la expresión de MCT1 y MCT4 en ratas transducidas con el adenovirus que codifica para shMCT4.	112

Figura 22	Análisis de la expresión de MCT1 y MCT4 en ratas transducidas con los adenovirus que codifican para shMCT1 y shMCT4.	113
Figura 23	Análisis de la expresión de MCT2 en ratas <i>knockdown</i> para MCT4 y MCT1-MCT4.	114
Figura 24	Expresión de neuropéptidos orexígenos, en respuesta a glucosa inyectada i.c.v. en animales <i>knockdown</i> para MCT4.	118
Figura 25	Expresión de neuropéptidos anorexígenos, en respuesta a glucosa inyectada i.c.v. en animales <i>knockdown</i> para MCT4.	119
Figura 26	Expresión de neuropéptidos orexígenos, en respuesta a glucosa inyectada i.c.v. en animales <i>knockdown</i> para MCT1 y MCT4.	121
Figura 27	Expresión de neuropéptidos anorexígenos, en respuesta a inyección de glucosa en animales <i>knockdown</i> para MCT1 y MCT4.	123
Figura 28	Los animales <i>knockdown</i> para MCT1 presentan un incremento sostenido de la ingesta de alimentos y del peso corporal.	127
Figura 29	Los animales <i>knockdown</i> para MCT1 presentan una disminución de la frecuencia alimenticia al inicio de la etapa oscura.	128
Figura 30	Los animales <i>knockdown</i> para MCT1 presentan una mayor saciedad.	131
Figura 31	La velocidad alimenticia se encuentra aumentada en animales <i>knockdown</i> para MCT1.	132

Figura 32	El <i>knockdown</i> de MCT4 produce una disminución de la ingesta de alimentos.	134
Figura 33	<i>Knockdown</i> para MCT4 incrementa la frecuencia alimenticia al final de la etapa oscura.	138
Figura 34	El <i>knockdown</i> de MCT4 produce una disminución de la saciedad.	139
Figura 35	Los animales <i>knockdown</i> para MCT4 poseen una menor velocidad de alimentación y consumen un menor tamaño de alimento promedio.	140
Figura 36	La inhibición de MCT1 y MCT4 produce incrementos de la ingesta de alimentos sin alterar el peso corporal y la glicemia.	142
Figura 37	El doble <i>knockdown</i> para MCT1 y MCT4 produce incrementos de la frecuencia alimenticia al final de la etapa oscura.	146
Figura 38	El doble <i>knockdown</i> de MCT1 y MCT4 produce una disminución de la saciedad.	147
Figura 39	Los animales <i>knockdown</i> para MCT1 y MCT4 poseen una menor velocidad de alimentación y una mayor duración de la alimentación promedio.	148
Figura 40	Modelo propuesto para el mecanismo sensor de glucosa mediado por la interacción entre tanicitos $\beta 1v$ y neuronas orexígenas.	160



Figura 41	Modelo del mecanismo sensor de glucosa basado en una interacción entre tanicitos $\beta 1d$ y neuronas anorexígenas.	165
Figura 42	Modelo del mecanismo sensor de glucosa basado en una interacción entre tanicitos $\beta 1v$ y $\beta 1d$ , y neuronas orexigénicas y anorexigénicas.	171



## INDICE DE TABLAS

	<b>Página</b>	
Tabla 1	Valores de Km para transportadores de monocarboxilatos, cinéticamente caracterizados.	25
Tabla 2	Anticuerpos primarios utilizados en ensayos de inmunolocalización.	45
Tabla 3	Anticuerpos secundarios usados en ensayos de inmunolocalización.	46
Tabla 4	Partidores utilizados para RT-PCR convencional y qRT-PCR.	51
Tabla 5	Resumen de resultado <i>in vivo</i> .	172



## ABREVIATURAS

ADN	:	ácido desoxirribonucleico
ADNasa	:	enzima desoxirribonucleasa
ADNc	:	ácido desoxirribonucleico copia
ADP	:	adenosin difosfato
AdshMCT1	:	adenovirus que codifica un ARN horquilla contra MCT1
AdshMCT4	:	adenovirus que codifica un ARN horquilla contra MCT4
Adsh $\beta$ gal	:	adenovirus que codifica un ARN horquilla contra $\beta$ -galactosidasa
AgRP	:	péptido relacionado a agoutí
ARNasas	:	enzima ribonucleasa
ARNm	:	ácido de ribonucleico mensajero
as	:	antisentido
ATP	:	adenosin trifosfato
BSA	:	albúmina de suero bovino
CART	:	transcrito regulado por cocaína y anfetamina
CCK	:	colecistoquinina
4-CIN	:	4-hidroxicinamato
CRH	:	hormona liberadora de corticotrofina
Cx43	:	conexina 43
cy <sup>2</sup>	:	cianina 2
cy <sup>3</sup>	:	cianina 3
cy <sup>5</sup>	:	cianina 5
DEPC	:	dietilpirocarbonato
DIDS	:	ácido 4,4-di-isotiocianoestibeno-2,2-disulfónico
DMEM	:	medio mínimo de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	:	dimetil sulfóxido
2-DOG	:	2-deoxi-D-glucosa
dNTPs	:	desoxirribonucleótidos
DTT	:	ditiotreitól

EDTA	:	ácido etilendiaminotetracético
EGFP	:	proteína fluorescente verde
EM	:	eminencia media
GFAP	:	proteína ácida fibrilar glial
GFP	:	proteína fluorescente verde
GK	:	glucoquinasa
GLP-1	:	péptido tipo glucagón-1
GLUT1	:	transportador de glucosa
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	:	ácido sulfúrico
HBSS	:	solución tampón salina de HEPES
HCl	:	ácido clorhídrico
HEPES	:	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazineetanosulfónico
HPLC	:	cromatografía líquida de alta presión
HRP	:	peroxidasa de rabano picante
HVM	:	hipotálamo ventromedial
i.c.v.	:	inyección intracerebroventricular
ifu/mL	:	unidades infectivas por mililitro
3V	:	tercer ventrículo
K <sup>+</sup>	:	potasio
KCl	:	cloruro de potasio
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	:	dihidrógeno fosfato de potasio
Kir 6.1	:	subunidad 6.1 de los canales de potasio sensibles a ATP
K <sub>m</sub>	:	constante de Michaelis
LB	:	medio de cultivo Luria Bertani
LCR	:	líquido cefalorraquídeo
LDH	:	enzima láctico deshidrogenasa
LH	:	hipotálamo lateral
LHA	:	área hipotalámica lateral
MCH	:	hormona liberadora de melanina
MCS	:	sitio de múltiple clonamiento
MCT	:	transportador de monocarboxilato

MEM	:	medio mínimo esencial de Eagle
MgCl <sub>2</sub>	:	cloruro de magnesio
MgSO <sub>4</sub>	:	sulfato de magnesio
α-MSH	:	hormona alfa estimulante de los melanocitos
NA	:	núcleo arqueado
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	:	hidrógeno fosfato de sodio
Nac	:	núcleo acumbens
NaCl	:	cloruro de sodio
NADH	:	nicotinamida di nucleótido reducido
NPV	:	núcleo paraventricular
NPY	:	neuropéptido Y
NTS	:	núcleo del tracto solitario
NVM	:	núcleo ventromedial
NVM	:	núcleo ventromedial
PAGE	:	electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	:	tampón fosfato salino
PC	:	plexos coroideos
pCMBS	:	ácido p-cloromercuribencenosulfónico
PCR	:	reacción de la polimerasa en cadena
PFA	:	paraformaldehído
pH1	:	promotor H1
POMC	:	derivado de la pro-opiomelanocortina
pUb	:	promotor de ubiquitina humano
qRT-PCR	:	retrotranscripción y PCR cuantitativo
RT	:	retrotranscripción
SDS	:	dodecilsulfato de sodio
SF1	:	factor esteroideogénico 1
SFB	:	suero bovino fetal
shARN	:	ácido ribonucleico de horquilla corta
sn	:	sentido
SNA	:	sistema nervioso autónomo

SNC	:	sistema nervioso central
SV40-polyA	:	señal de poliadenilación del virus SV40.
TAE	:	tampón tris acetato EDTA
TBS	:	tampón tris salino
TE	:	tampón tris-EDTA
TEMED	:	N,N,N',N'-Tetrametiletilenediamina
TL	:	tween leche
TRH	:	hormona liberadora de tirotrófina
Tris	:	2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
VDCC	:	canales de calcio dependiente del voltaje
V <sub>máx</sub>	:	velocidad máxima
VMH	:	hipotálamo ventromedial
VTA	:	área tegmental ventral



## RESUMEN

La detección de glucosa en el hipotálamo es un proceso crucial que regula el comportamiento alimenticio, la cual a través de la detección de cambios en la concentración de glucosa por células cerebrales, produce en respuesta la liberación de neuropéptidos orexígenos y anorexígenos. Las neuronas del núcleo arqueado (NA) han sido clásicamente identificadas como las células responsables del mecanismo glucosensor hipotalámico, a través de mecanismos directos de detección; sin embargo, estudios recientes han demostrado la existencia de un acoplamiento metabólico entre tanicitos y neuronas del NA, el cual sería mediado por lactato, mecanismo que podría contribuir a este proceso. Los transportadores de monocarboxilatos 1 (MCT1) y 4 (MCT4), son las principales transportadores de monocarboxilatos expresadas por tanicitos, los cuales facilitan la liberación de lactato a neuronas del NA, mientras que MCT2 es el principal transportador expresado por neuronas hipotalámicas. Nosotros hipotetizamos que los tanicitos interaccionan con las neuronas hipotalámicas a través de monocarboxilatos para regular la ingesta alimenticia, por lo tanto la inhibición de MCT1 y/o MCT4 podría alterar el acoplamiento metabólico entre tanicitos y neuronas del NA. Para evaluar esto, inhibimos la expresión de MCT1 y/o MCT4 a través de la transducción de shARN mediado por partículas adenovirales inyectadas en el tercer ventrículo, permitiendo la transducción de endimocitos y tanicitos. Utilizando estos animales *knockdown* para MCT1 y/o MCT4, evaluamos la expresión de neuropéptidos en respuesta a la inyección intracerebroventricular de glucosa, como el comportamiento alimenticio luego de un periodo de ayuno. Nuestros resultados

muestran una pérdida de la regulación de la expresión de neuropéptidos orexígenos mediada por glucosa, y una expresión anormal de neuropéptidos anorexígenos en respuesta al ayuno. Esto se ve acompañado por un incremento en la ingesta alimenticia y un incremento en el peso corporal en animales *knockdown* para MCT1, y una disminución de la saciedad en animales *knockdown* para MCT4. Por otro lado, la doble inhibición de MCT1 y MCT4, es capaz de producir un incremento en la ingesta alimenticia, un incremento del peso corporal y una disminución de la saciedad. En conjunto, estos resultados indican que la expresión de MCT1 y MCT4 posee un relevante rol en la regulación del comportamiento alimenticio.





## ABSTRACT

Hypothalamic glucosensing, which involves the detection of glucose concentration changes by brain cells and subsequent release of orexigenic or anorexigenic neuropeptides, is a crucial process that regulates feeding behavior. Arcuate nucleus (AN) neurons are classically thought to be responsible for hypothalamic glucosensing through a direct sensing mechanism. However, recent data has shown a metabolic interaction between tanycytes and AN neurons through lactate that may also be contributing to this process. Monocarboxylates transporters 1 (MCT1) and 4 (MCT4) are the main isoforms expressed by tanycytes, which could facilitate lactate release to hypothalamic AN neurons. We hypothesize that tanycytes interact with AN neurons through monocarboxylates to regulate feeding behavior, thus MCT1 and/or MCT4 inhibition could alter the metabolic coupling between tanycytes and AN neurons, affecting feeding behavior. To test this, we inhibited MCT1 and/or MCT4 expression using adenovirus-mediated transfection of a shRNA into the third ventricle, transducing ependymal wall cells and tanycytes. Neuropeptide expression and feeding behavior were measured in MCT1 and MCT4 inhibited animals after intracerebroventricular glucose administration following a fasting period. Our results showed a loss in glucose regulation of orexigenic neuropeptides and an abnormal expression of anorexigenic neuropeptides in response to fasting. This was accompanied by an increase in food intake and in body weight gain in MCT1 knockdown animals and with a satiety reduction in MCT4 knockdown animals. On the other hand, double knockdown of MCT1 and MCT4, produces an increase in food intake and in body weight, and also satiety reduction. Taken together, these

results indicate that MCT1 and MCT4 expression in tanycytes plays a role in feeding behavior regulation.



# I INTRODUCCIÓN

## 1.1. Aspectos generales de la regulación de la ingesta de alimentos.

En las últimas décadas, la regulación de la ingesta de alimentos se ha convertido en una importante área de estudio, debido a que las alteraciones de esta regulación son responsables del incremento en patologías de alto impacto a nivel mundial, tales como la obesidad, enfermedades cardiovasculares y la diabetes tipo II (Blouet and Schwartz, 2010).

La ingesta de alimentos cumple un rol fundamental en el mantenimiento del balance energético, permitiéndonos alcanzar un balance entre la cantidad de energía gastada y la cantidad de energía requerida. Esta homeostasis energética se logra a través de la comunicación del sistema nervioso central (SNC) con el tracto gastrointestinal, mediante la integración de estímulos aferentes, que llegan al tronco cerebral, en una región neuronal conocida como núcleo del tracto solitario (NTS), cercana al área postrema (AP), los que envían proyecciones hacia el núcleo paraventricular (NPV) en el hipotálamo, para inhibir la alimentación (Schwartz et al 2000). Esta información que recibe el hipotálamo se acompaña por una señalización hormonal, derivada del estómago (grelina), intestino delgado (colecistoquinina, GLP-1), de adipocitos (leptina) y de las células  $\beta$  pancreáticas (insulina), además de la concentración de nutrientes como la glucosa. Esta señalización, permite la generación de estímulos eferentes que salen del cerebro desde el complejo dorsal vagal (CDV), formado por el NTS, el núcleo motor dorsal del vago (NMDV) y el AP. Para la activación del sistema nervioso parasimpático, las neuronas postganglionares del sistema parasimpático liberan acetilcolina, interaccionando con receptores muscarínicos presentes en el páncreas,

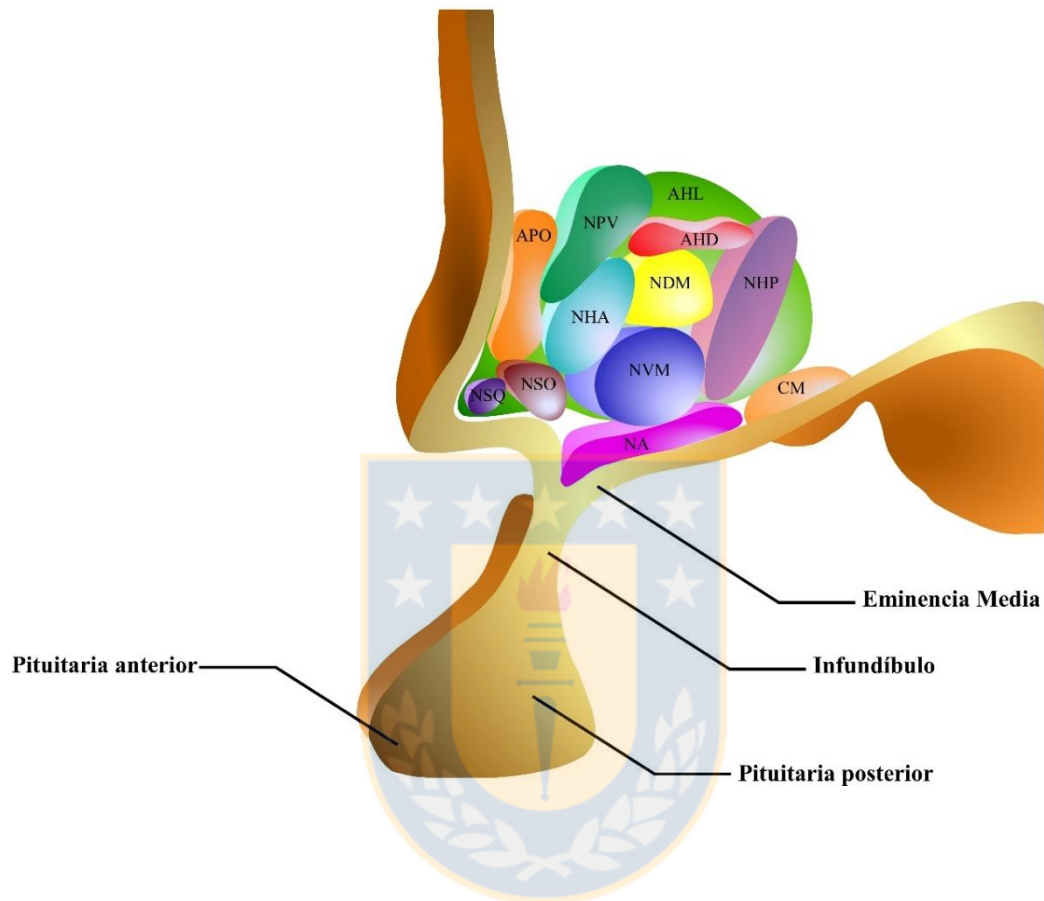
incrementando la liberación de insulina (Blouet and Schwartz, 2010; Bray, 1991; Lustig et al., 2006). Eferentes del NTS y del locus cerúleo son capaces de activar el sistema nervioso simpático. Las neuronas postganglionares del sistema simpático, liberan norepinefrina, activando a receptores adrenérgicos, localizados en la médula adrenal, la que a su vez descarga epinefrina y norepinefrina a la sangre. Esta señalización, permite el establecimiento de un equilibrio, frente a un balance energético negativo genera apetito y en respuesta a un balance energético positivo genera saciedad (Broberger, 2005). Comprender los mecanismos de detección y respuesta, es fundamental para el desarrollo de terapias que permitan controlar las patologías asociadas a la pérdida de la regulación de la ingesta de alimentos.

Para describir de mejor manera los fenómenos asociados a la regulación de la ingesta de alimentos, es necesario diferenciar entre los términos apetito y hambre. El apetito se ha definido como una fuerza interna que lleva al consumo de un alimento, siendo esta motivación de características psicológicas; mientras que el hambre, es una sensación fisiológica que indica una necesidad de ingerir alimentos. En contraparte, se ha hecho énfasis en distinguir entre dos fases: la saciación, definida por mecanismos causantes del término de la alimentación luego de alcanzar un estado cómodo de plenitud, y la saciedad, definida por mecanismos responsables del retraso en el inicio de un nuevo evento de alimentación generado por una sensación de no requerir alimentos por un cierto tiempo (Burton-Freeman et al., 1997; de Graaf et al., 2004; Zorrilla et al., 2005).

## 1.2. El hipotálamo y la ingesta de alimentos.

### 1.2.1 Características morfológicas de la región hipotalámica

El hipotálamo, localizado en la base del diencefalo, establece conexiones entre los hemisferios cerebrales y el tronco encefálico, regiones esenciales en la integración de patrones de conducta (Risold et al., 1997; Schneeberger et al., 2014). Puede dividirse en tres zonas: la zona periventricular, la región medial y el hipotálamo lateral. La zona periventricular está constituida por el núcleo preóptico (NPO), el núcleo supraquiasmático (NSQ), el núcleo paraventricular (NPV), el núcleo arqueado (NA) y el núcleo posterior (NP). La región medial está formada por el núcleo preóptico medial (NPM), el núcleo hipotalámico anterior (NHA), el núcleo ventromedial (NVM), el núcleo dorsomedial (NDM) y el núcleo premamilar (NPM); mientras que el hipotálamo lateral está formado por el núcleo lateral preoptico (NLP), el núcleo hipotalámico lateral (NHL), el núcleo tuberomamilar (NTM) y el núcleo supraóptico (NSO) (Iversen, 1999) (Fig. 1). La eminencia media (EM) se encuentra localizada en la región medial-basal del hipotálamo y en su región dorsal limita con el receso infundibular del tercer ventrículo hipotalámico (3-V), contactando con el LCR. En su región ventral, limita con la *pars tuberalis* de la hipófisis, contactando con el espacio perivascular del sistema capilar portal y el LCR subaracnoideo (Peruzzo et al., 2000). La región ependimaria de la EM se encuentra formada por tanicitos  $\beta_2$ , presentando uniones ocluyentes a nivel apical, con lo que genera una barrera entre los componentes de la EM y el LCR ventricular, conocida como la barrera EM-LCR (Chauvet et al., 1995; Flament-Durand and Brion, 1985; Peruzzo et al., 2000).



**Figura 1. Representación esquemática de los núcleos hipotalámicos.**

Vista sagital de la distribución de los núcleos hipotalámicos. NA: núcleo arqueado; NVM: núcleo ventromedial; NDM: núcleo dorsomedial; NPV: núcleo paraventricular; AHD: Área hipotalámica dorsal; AHL: Área hipotalámica lateral; NSQ: núcleo supraquiasmático; NSO: núcleo supraóptico; APO: Área preóptica; CM: cuerpos mamilares. Modificado de (Elizondo-Vega et al., 2015).

## 1.2.2 Regulación hipotalámica de la ingesta de alimentos.

El hipotálamo posee diversas conexiones neuronales que operan para regular la ingesta de alimentos en respuesta a la señalización hormonal, nerviosa y de nutrientes del organismo. Esto ha sido evidenciado al realizar la ablación de regiones hipotalámicas como la región del HVM (formado por el NA y el NVM), produciendo hiperfagia y obesidad, siendo conocido como el “centro de la saciedad”, mientras que la destrucción del AHL, conduce a una hipofagia y pérdida de peso, atribuyéndose el nombre del “centro del hambre” (Anand and Brobeck, 1951; Borg et al., 1994; Brobeck, 1946; Leibowitz et al., 1984). Sin embargo, actualmente se sabe que el cerebro no está agrupado en centros discretos que controlan funciones específicas, sino más bien, funciones específicas son realizadas por circuitos neuronales distribuidos en diferentes estructuras cerebrales.

El NA se encuentra formado por poblaciones neuronales con funciones antagonistas, las que incluyen neuronas que inhiben la ingesta de alimentos a través de la liberación de péptidos anorexigénicos como la hormona liberadora de  $\alpha$ -melanocitos ( $\alpha$ -MSH), un producto procesado de la pro-opiomelanocortina (POMC) y el transcrito regulado por amfetamina y cocaína (CART) (Elias et al., 1998; Kristensen et al., 1998); y neuronas capaces de estimular la ingesta de alimentos a través de la secreción de péptidos orexigénicos como el neuropéptido Y (NPY), el péptido asociado a agouti (AgRP) (Broberger et al., 1998; Hahn et al., 1998), opioides, galanina (Crawley, 1995) y el péptido tipo galanina o GALP (Jureus et al., 2000; Kerr et al., 2000). AgRP es un antagonista de los receptores de melanocortina 3 (MCR3) y 4 (MCR4), mientras que  $\alpha$ -MSH es un agonista de MCR4, por lo tanto AgRP compite por la acción de receptor de  $\alpha$ -MCH. Además, el NA es sensible a algunas hormonas como como leptina (proteína liberada por

adipocitos), insulina y el péptido YY (PYY) (Blevins et al., 2008), capaces de producir la inhibición de la ingesta alimenticia a través de la reducción en la expresión de NPY y AgRP (Flier, 2004). En contraparte, grelina, péptido de 28 aa, producido por las células oxínticas del estómago y en menor medida por el intestino delgado, intestino grueso e hipotálamo (Date et al., 2000; Date et al., 2002; Sato et al., 2005), es capaz, de incrementar la ingesta de alimentos al estimular a neuronas que expresan NPY y AgRP, e inhibir a neuronas que expresan POMC (Nakazato et al., 2001; Tschop et al., 2000; Wang et al., 2002; Wren et al., 2001).

Por otro lado, el NA a través de fibras axonales ascendentes, puede controlar a poblaciones neuronales de segundo orden localizadas en el NPV, NDM y el AHL, centros neuronales capaces de realizar una señalización neuroendocrina que permite regular el apetito y la ingesta de alimentos, como se detalla a continuación (Elias et al., 1998; Elmquist et al., 1998; Kalra et al., 1999). Las neuronas del NA que generan NPY/AgRP se proyectan hacia el NPV, donde se concentran las neuronas anorexigénicas, las cuales expresan MCR3 y MCR4, produciendo en ellas una prolongada corriente post-sináptica inhibitoria que estimula la alimentación (Atasoy et al., 2012). También se proyectan hacia el AHL, que contiene neuronas orexigénicas, estimulando la secreción de orexinas (también conocidas como hipocretinas) en respuesta a señales de hambre (Ebrahim et al., 2002).

Las neuronas POMC/CART del NA se proyectan hacia el NPV, incrementando el gasto energético; también se proyectan hacia el AHL, reduciendo la ingesta alimenticia (Cowley et al., 2001; Gautron and Elmquist, 2011; Schwartz et al., 2000). En el NPV, las neuronas POMC/CART estimulan la secreción de diferentes hormonas anorexigénicas como la oxitocina (Arletti et al., 1989; Olson et al., 1991), la hormona liberadora de corticotropina



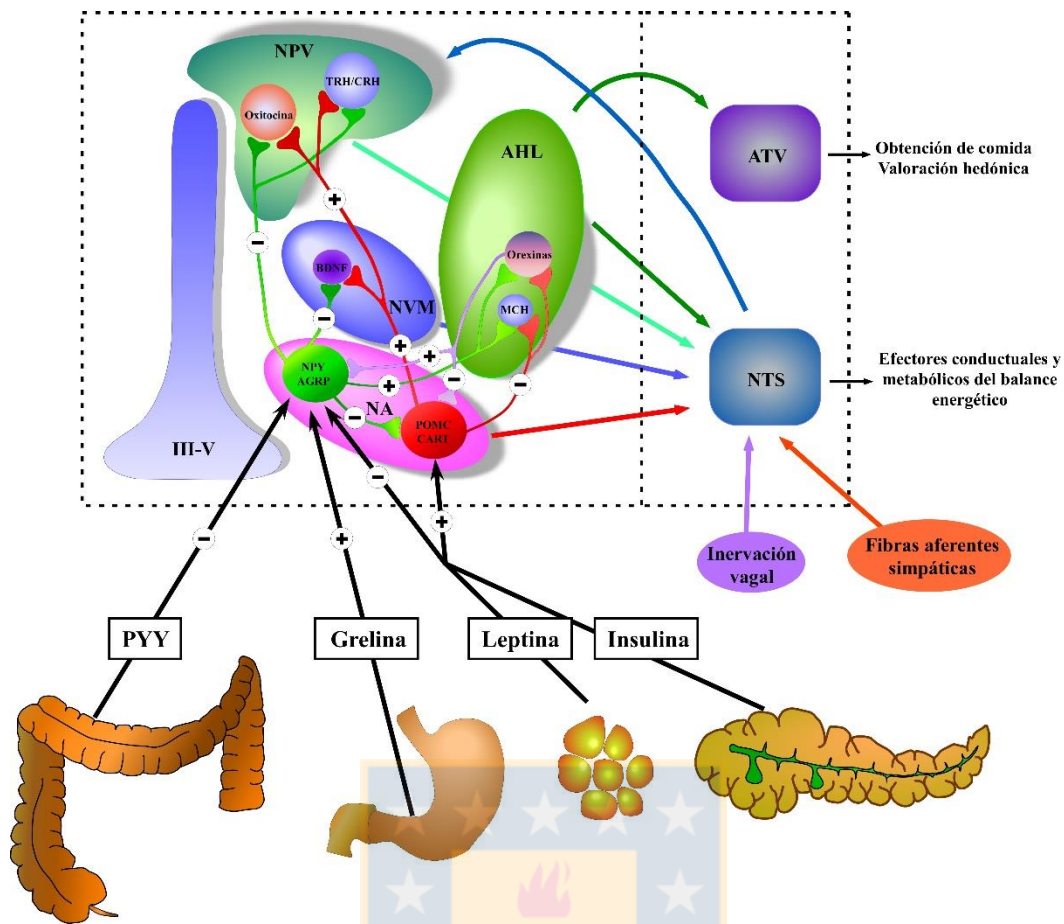
o CRH, la hormona liberadora de tirotropina o TRH y el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) (Ishikawa et al., 1988; Merchenthaler and Liposits, 1994; Millington, 2007) (Fig. 2).

Estudios en esta vía, también conocida como “sistema de melanocortina”, demuestran que la liberación y los niveles del ARN mensajero (ARNm) de NPY y AgRP, se incrementan con el ayuno y disminuyen luego de la alimentación (Swart et al., 2002). Lo contrario sucede con POMC y CART (Wynne et al., 2005), evidenciando la participación del NA en el control de la ingesta alimenticia. De esa forma el NA es la región más representativa de la integración del balance energético, sin embargo, otros núcleos neuronales también forman parte importante de este mecanismo de señalización.

El HVM (centro de la saciedad) es capaz de inhibir el apetito, en parte debido a que neuronas del NVM, expresan receptores de leptina y colecistoquinina (CCK) (Hillebrand et al., 2002). Además, el NVM recibe señalizaciones provenientes del NA, proyectándose hacia NDM y el NPV.

El AHL es rica en hormonas orexigénicas como la hormona concentradora de melanina (MCH) (Bittencourt et al., 1992; Viale et al., 1997) y las orexinas (de Lecea et al., 1998; Sakurai et al., 1998) (Fig. 2). Las neuronas MCH se proyectan a otros núcleos hipotalámicos y al sistema límbico, su expresión es estimulada por el ayuno y su administración crónica genera hiperfagia y obesidad (Boughton and Murphy, 2013). El NDM, es una región que recibe las proyecciones del NA, AHL, NPV y el tronco cerebral, siendo una región capaz de regular la señalización que estimula o inhibe la ingesta de alimentos. Por último, el NPV, es un centro integrador de las proyecciones provenientes del NA (NPY/AgRP y POMC/CART), como del AHL (orexinas y MCH) (Forbes et al., 2001) (Fig. 2).

Existen regiones extra-hipotalámicas implicadas en el comportamiento de alimentación, específicamente en el tronco cerebral y médula espinal se encuentra el NTS, el cual forma parte del CDV, en conjunto con el NMDV y el AP. Estos centros son capaces de integrar información proveniente de la inervación vagal (hígado, boca, estómago e intestinos), así como también señales hormonales periféricas como galanina, leptina y CCK, y señales eferentes provenientes del hipotálamo (Schwartz et al., 2000), siendo considerado como un centro integrador de señales de saciedad y hambre. Otras regiones como el área tegmental ventral (ATV), localizada en el mesencéfalo, y el núcleo accumbens, que forma parte del cuerpo estriado, han sido implicados en la regulación no homeostática o hedónica del comportamiento alimenticio, regulando procesos de adicción y recompensa. Interesantemente, a pesar de la gran cantidad de estudios sobre la expresión de los receptores hormonales, o la expresión de neuropéptidos en los diversos núcleos hipotalámicos, no existen muchos antecedentes que aborden como el hipotálamo es capaz de detectar variaciones en la concentración de glucosa en respuesta a la ingesta de alimentos y menos aún, si esta glucosa puede ser detectada de manera indirecta, a través del *sensing* de metabolitos derivados de su metabolización a nivel cerebral. Este tipo de estudios nos permitirían entender parte de la regulación que ejercen estos núcleos hipotalámicos al control de la ingesta en condiciones fisiológicas así como también en condiciones fisiopatológicas.



**Figura 2. Circuitos neuronales que controlan la ingesta alimenticia y biodisponibilidad de glucosa.**

El sistema de melanocortina corresponde al circuito neuronal mejor caracterizado en el mecanismo sensor de nutrientes en el hipotálamo. Neuronas anorexígenas POMC y CART; y neuronas orexígenas NPY/AgRP del NA proyectan eferentes a los núcleos hipotalámicos NPV, NVM y AHL, inhibiendo o estimulando la ingesta alimenticia. El NA recibe eferentes del NVM y AHL, núcleos que están interconectados y que conectan con el NPV. Estos circuitos neuronales producen una señal integrada que en conjunto con aferentes sensoriales provenientes a través de inervación vagal y fibras simpáticas del sistema nervioso autónomo, los que contactan el área tegmental ventral (ATV) y el núcleo del tracto solitario (NTS), modificando la ingesta alimenticia y biodisponibilidad de glucosa. MCH: hormona concentradora de melanina; TRH: hormona liberadora de tirotrófina; CRH: hormona liberadora de corticotrofina; BDNF: factor neurotrófico derivado de cerebro; III-V: tercer ventrículo. Modificado de (Blouet and Schwartz, 2010).

### 1.3. Homeostasis de la glucosa.

#### 1.3.1. Control periférico de la concentración de glucosa

La mantención de la homeostasis de la glucosa comprende la detección y posterior respuesta a cambios en su concentración a nivel sistémico. Este mecanismo se conoce como “*sensing*” de glucosa y depende de la existencia de “*sensores*” localizados en diversas partes del organismo, que son capaces de regular en forma precisa la concentración extracelular de glucosa (Magni et al., 2009). Uno de ellos es el páncreas, específicamente las células  $\beta$  (Schwartz et al., 2000), en las cuales la glucosa y sus derivados metabólicos juegan un papel central en la liberación de insulina dependiente de glucosa.

El mecanismo por el cual las células  $\beta$ -pancreáticas realizan este proceso involucra al transportador facilitativo de glucosa 2 (GLUT2) y a la enzima glucoquinasa (GK, Hexoquinasa IV), las que facultan a las células  $\beta$  pancreáticas para *sensar* el contenido de glucosa sanguíneo (Thorens et al., 1988; Vischer et al., 1987). Este tipo celular a diferencia de otros, posee una elevada actividad de la enzima piruvato carboxilasa (Schuit et al., 1997), permitiendo a estas células consumir eficientemente grandes cantidades de piruvato, producto final de la degradación de la glucosa-6-fosfato. Esto genera una gran cantidad de NADH para el metabolismo mitocondrial y por ende, una gran capacidad de producción de ATP, frente a alzas en la concentración de glucosa. Paso crucial para que las células sean capaces de liberar insulina (Schuit et al., 2001). En el páncreas endocrino existe otra población celular, las células  $\alpha$ -pancreáticas, que son capaces de *sensar* la disminución en la concentración de glucosa sanguínea, secretando glucagón, el cual activa la glucogenólisis y la gluconeogénesis, en órganos

blancos como el hígado (Schuit et al., 2001). El hígado funciona como un "sistema amortiguador de la glicemia", ya que frente a un aumento en el nivel de glucosa, promueve el almacenamiento de ésta, en forma de glucógeno por acción de la insulina, disminuyendo así la glicemia. Al contrario, cuando el nivel de glucosa disminuye se produce un aumento en la liberación de glucosa hacia la sangre por la acción glucogenolítica del glucagón, retornando la glicemia a sus valores normales (Schuit et al., 2001).

### **1.3.2. Participación del hipotálamo en la homeostasis de la glucosa.**

El sistema nervioso central (SNC) ha sido reconocido como un regulador de la homeostasis de la glucosa por décadas. Una de las primeras evidencias a favor de este rol regulatorio muestra que la sensación de hambre se inicia al detectarse una disminución de los niveles de glucosa en sangre (Mayer, 1953), dando origen a la denominada hipótesis glucostática, la cual propone que el inicio de la alimentación, se encuentra precedida de una disminución de la glicemia, estableciendo una conexión entre la concentración de glucosa sanguínea y el apetito (Mayer, 1953). Apoyando a esta hipótesis, estudios *in vivo* mostraron posteriormente que la glucoprivación, inducida al realizar inyección intracerebroventricular (i.c.v.) de un análogo de glucosa fosforilable pero no metabolizable, como 2-deoxi-D-glucosa (2-DOG), permite inhibir la glicólisis y crear un estado glucopénico similar a la hipoglicemia, produciendo un incremento del peso y el apetito en ratas (Miselis and Epstein, 1975).

Estudios electrofisiológicos en cortes cerebrales han demostrado la presencia de neuronas hipotalámicas que pueden incrementar o reducir su actividad eléctrica en función de la concentración de glucosa (Oomura et al., 1964) y lactato (Yang et al., 1999),

las cuales han sido clasificadas en neuronas glucosa excitadas (NGE) y neuronas glucosa inhibidas (NGI), respectivamente (Oomura et al., 1969; Oomura and Yoshimatsu, 1984; Yang et al., 1999), las que han sido localizadas en el NA, NVM, NPV y AHL (Dunn-Meynell et al., 1997; Wang et al., 2004). Análisis a través de *patch clamp*, utilizando rebanadas cerebrales de ratón incubadas en una solución extracelular que contiene D-glucosa, han llevado a proponer la existencia de otras dos poblaciones neuronales: neuronas excitadas con alta glucosa (NEAG) y neuronas inhibidas con alta glucosa (NIAG) (Fioramonti et al., 2007; Penicaud et al., 2006). Sin embargo, es importante recalcar que estos estudios indican que las neuronas pueden, directa o indirectamente ser activadas o inhibidas por glucosa, ya que la utilización de rebanadas cerebrales, hace imposible determinar si la glucosa o derivados metabólicos de estas, son los responsables de los cambios en sus actividades eléctricas. Además, estos metabolitos no solamente funcionarían como substratos metabólicos, sino también como moléculas de señalización que informen del estado energético del organismo, permitiendo la liberación de hormonas y/o neuropéptidos que controlan la ingesta alimenticia (Schwartz et al., 2000).

A través de la determinación de señales de calcio e inmunohistoquímica en rebanadas cerebrales, se ha reportado que el 40% de las neuronas NPY son NIG (Muroya et al., 1999), sin embargo la identidad de las NGE no ha sido completamente determinada y podrían corresponder a neuronas que expresan POMC (Ibrahim et al., 2003; Parton et al., 2007). Estos hallazgos se relacionan directamente con los cambios en la actividad eléctrica neuronal, inducida por variaciones en la concentración extracelular de glucosa, asociado al control de la ingesta alimenticia. Estudios *in vivo*, han demostrado que la inyección i.c.v. de glucosa en ratones, es capaz de imitar a una hiperglicemia luego de 2 h post-inyección, detectándose a través de qRT-PCR, una disminución en la expresión del

ARNm de NPY y un incremento en la expresión de POMC, lo que se correlaciona con un término de la ingesta alimenticia (Archer et al., 2005; Bady et al., 2006).

Sin embargo, la citoarquitectura hipotalámica, plantea una problemática para la detección de cambios en la concentración de glucosa sanguínea (Langlet, 2014; Langlet et al., 2013a). A través de microdiálisis ha sido demostrado que la concentración de glucosa en el parénquima cerebral no varía significativamente, alcanzando un valor de aproximadamente 1,6 mM, siendo poco probable que las neuronas detecten variaciones directas de la concentración de glucosa (de Vries et al., 2003). En este contexto, una posibilidad es que las neuronas detecten las variaciones de la concentración de glucosa desde el LCR, donde la concentración de glucosa varía de manera proporcional a la sangre (Steffens et al., 1988). Sin embargo, los núcleos involucrados en la homeostasis de glucosa (NA y NVM) no están en contacto directo con el LCR, pero si lo están las células gliales ventriculares (Akmayev and Popov, 1977; Cortes-Campos et al., 2013; Cortes-Campos et al., 2011; Garcia et al., 2003; Levin et al., 1999; Rodriguez et al., 2005). Estos antecedentes morfológicos, han permitido postular que la glía ependimaria sería la célula encargada de detectar los cambios en la concentración de glucosa desde el LCR y generar una señal que permita la generación de una respuesta por parte de las neuronas adyacentes, formando un circuito en el que participan ambos tipos celulares de manera acoplada (Cortes-Campos et al., 2013; Cortes-Campos et al., 2011; Garcia et al., 2003; Garcia et al., 2001; Millan et al., 2010).

Estudios *in situ*, a través de *patch clamp* y detecciones de célula-única en rebanadas cerebrales, han demostrado que el lactato extracelular es capaz de incrementar la frecuencia de los potenciales de acción de las NGE en el HVM (Song and Routh, 2005; Yang et al., 1999), sugiriendo que este monocarboxilato puede participar en el mecanismo



sensor de glucosa cerebral. De manera similar, estudios *in vivo* han demostrado que la inyección i.c.v. de lactato o glucosa en el tercer ventrículo hipotalámico (3V) es capaz de disminuir los niveles de glicemia, respuesta que es inhibida cuando estos metabolitos se co-inyectan con oxamato, inhibidor de la enzima láctico deshidrogenasa (LDH), corroborando que la captación y metabolización del lactato están involucradas en la homeostasis de glucosa (Lam et al., 2005). Del mismo modo, la inyección de lactato en la arteria carótida de ratas, reproduce los efectos mediados por glucosa, generando incrementos transientes de la secreción de insulina, sugiriendo que la detección de lactato a nivel cerebral puede gatillar la secreción de insulina. En este mecanismo podrían participar hemicanales formados por Cx43 (Allard et al., 2013; Allard et al., 2014). Sin embargo, para probar los efectos que puede mediar el lactato, es necesario generar modelos de animales que permitan el estudio *in vivo*, del efecto del lactato en el mecanismo sensor de glucosa hipotalámico.

### **1.3.3. Glía endimaria hipotalámica y su función en el *sensing* de glucosa.**

Las paredes del 3V se encuentran formadas por endimocitos, células ciliadas que permiten el movimiento, transporte y secreción del LCR (Altman and Bayer, 1978; Brawer, 1972; Bruni et al., 1972) y que basalmente se diferencian a un tipo celular glial conocido como tanicito. En la región central y posterior del hipotálamo, los tanicitos se encuentran localizados en la región basal y en el piso de las paredes del tercer ventrículo. Su morfología es elongada y a diferencia de los endimocitos, estos carecen de cilios (Altman and Bayer, 1978). Los tanicitos han sido clasificados de acuerdo a su distribución en las paredes ventriculares hipotalámicas (Akmayev and Popov, 1977) en tanicitos  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$  y  $\beta 2$ . Los tanicitos  $\alpha 1$  poseen proyecciones que contactan al NVM, mientras que

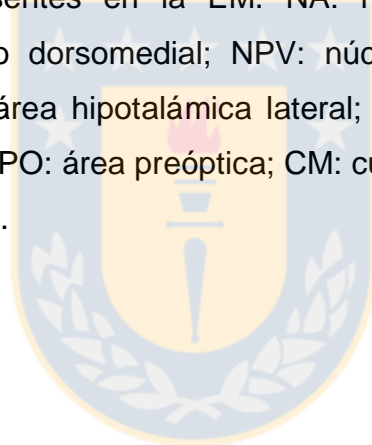


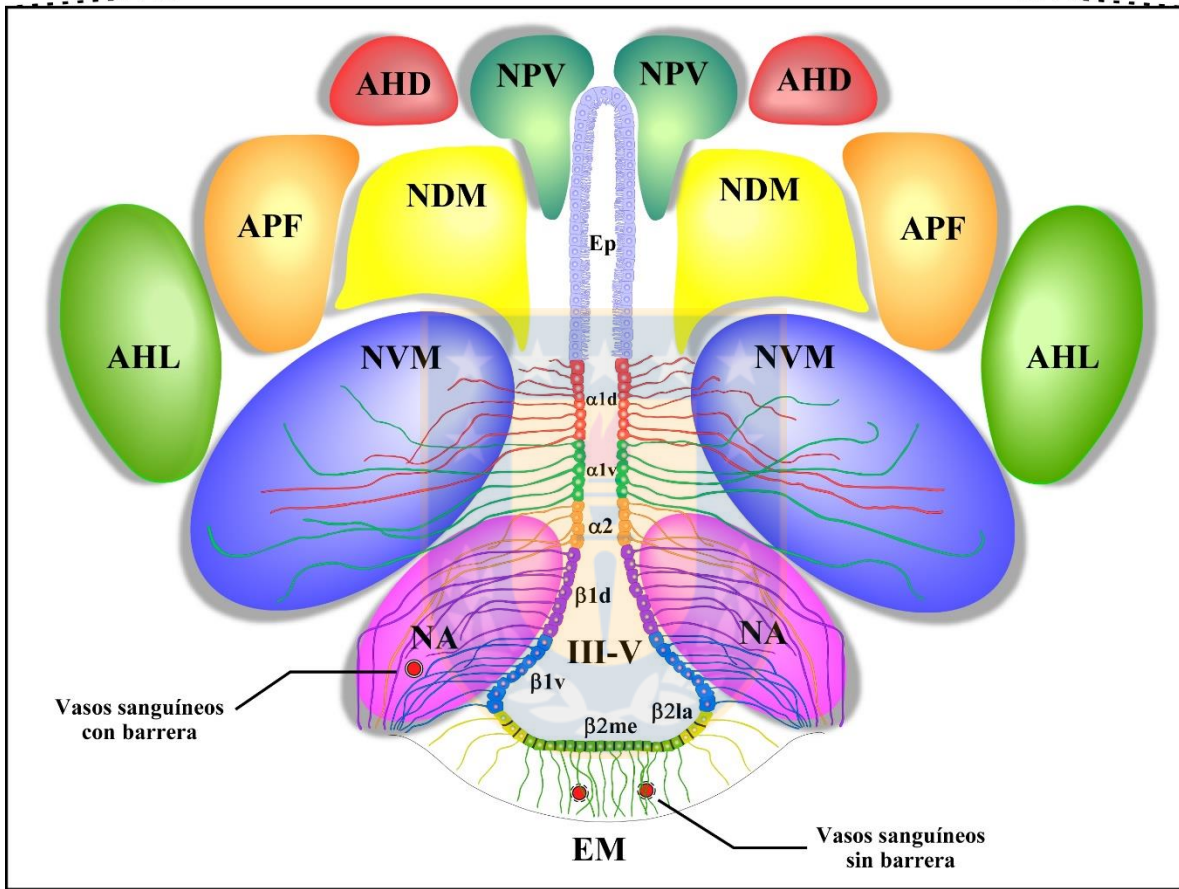
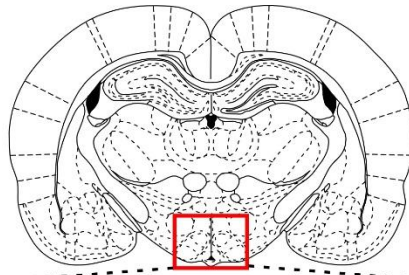
los  $\alpha 2$ , contactan con el NA, formando una interfase entre el LCR y los núcleos neuronales, permitiendo el intercambio de moléculas entre ambos tipos celulares (Garcia et al., 2001). Los tanicitos  $\beta 1$  bordean el receso infundibular y sus proyecciones alcanzan las regiones laterales de la EM y el NA. Los tanicitos  $\beta 2$  tapizan el piso del 3V, extendiendo sus proyecciones hacia la EM. Con el objetivo de entender de mejor manera el rol de cada población de tanicitos, a través del análisis de diversos marcadores moleculares, se han identificado diversas subpoblaciones: tanicitos  $\alpha 1$  dorsales y ventrales ( $\alpha 1d$  y  $\alpha 2d$ ), tanicitos  $\alpha 2$ , tanicitos  $\beta 1$  dorsales y ventrales ( $\beta 1d$  y  $\beta 1v$ ) y tanicitos  $\beta 2$  laterales ( $\beta 2la$ ) y mediales ( $\beta 2me$ ) (Cortes-Campos et al., 2013; Cortes-Campos et al., 2011; Robins et al., 2013) (Fig. 3).



**Figura 3. Distribución general de los tanicitos en la pared ventricular del tercer ventrículo.**

**A:** Mapa estereotáxico de Pacinos y Watson, señalando la región hipotalámica que se detalla en B. **B:** Vista frontal de la ubicación aproximada de los núcleos hipotalámicos y los tanicitos. Ependimocitos ciliados (Ep) limitan la pared dorsal del 3V. Los tanicitos  $\alpha 1d$  ( $\alpha 1d$ ) y tanicitos  $\alpha 1v$  ( $\alpha 1v$ ) poseen largas proyecciones que toman contacto con neuronas del NVM. Las proyecciones de los tanicitos  $\alpha 1$  ( $\alpha 2$ ) establecen contacto con el NA y con vasos sanguíneos. En una región más ventral del 3V, los tanicitos  $\beta 1d$  ( $\beta 1d$ ) y tanicitos  $\beta 1v$  ( $\beta 1v$ ) se proyectan hacia el NA, contactando a neuronas orexigénicas, anorexigénicas y vasos sanguíneos. En el piso del 3V, los tanicitos  $\beta 2$  laterales ( $\beta 2la$ ) y los tanicitos  $\beta 2$  mediales ( $\beta 2med$ ) se encuentran unidos por uniones ocluyentes formando parte de la barrera de la EM-LCR, y sus proyecciones toman contacto con los capilares fenestrados presentes en la EM. NA: núcleo arqueado; NVM: núcleo ventromedial; NDM: núcleo dorsomedial; NPV: núcleo paraventricular; AHD: área hipotalámica dorsal; AHL: área hipotalámica lateral; NSQ: núcleo supraquiasmático; NSO: núcleo supraóptico; APO: área preóptica; CM: cuerpos mamilares. Modificado de (Elizondo-Vega et al., 2015).





Los tanicitos  $\beta_2$  que limitan la EM, tienen un acceso privilegiado a señales nutricionales provenientes de la sangre, como glucosa y hormonas (Balland et al., 2014; Langlet, 2014), los que ingresan a través de capilares fenestrados (Ciofi et al., 2009). Por otro lado, los cuerpos celulares de los tanicitos que limitan las paredes del 3V, tienen contacto directo con el LCR (Rodriguez et al., 2005). Además, los procesos basales de los tanicitos, penetran en el parénquima hipotalámico, contactando con neuronas del NA (Akmayev and Popov, 1977; Garcia et al., 2003), llegando a contactar vasos sanguíneos hipotalámicos (Rodriguez et al., 2005). Es muy importante destacar que en la región donde la pared ventricular está constituida por tanicitos  $\alpha$  y  $\beta_1$ , existe escasa presencia de astrocitos subependimarios, siendo este tipo de glía endimaria la principal célula glial que está en contacto con las neuronas neuroendocrinas (Garcia et al., 2001; Rodriguez et al., 2005). Por lo anterior, histológicamente es factible proponer a los tanicitos como la célula glial, que está capacitada para acoplarse funcional y metabólicamente con neuronas de la región hipotalámica. Como apoyo a esta hipótesis es importante considerar que la glía forma un sincicio estructural y metabólico, a través de conexiones (Giaume et al., 1997), creando compartimentos cerebrales acoplados que responden coordinadamente a los requerimientos energéticos (Tabernero et al., 1996). Por otra parte, nuestro grupo ha demostrado que los tanicitos localizan en su región proximal el transportador GLUT2 (Garcia et al., 2003) y expresan la enzima GK (Millan et al., 2010) y su proteína reguladora GKRP (Salgado et al., 2014), proteínas clave del glucosensing a nivel periférico, lo que los faculta para detectar eficientemente los cambios de la concentración de glucosa. Junto con estas evidencias, se ha informado que la destrucción selectiva de los tanicitos inhibe las respuestas contraregulatorias generadas frente a hipoglicemia (Sanders et al., 2004), apoyando la participación de los tanicitos en el sistema *sensor* de glucosa.

#### 1.4. Interacción glía-neurona en el glucosensing hipotalámico.

Basado en observaciones microscópicas de la barrera hemato-cerebral (BHC) las células gliales se encuentran posicionadas entre los vasos sanguíneos y las neuronas por lo cual el acceso de la glucosa a las neuronas no es directo. La glucosa necesita atravesar la membrana de las células endoteliales, los pericitos y astrocitos, que forman la BHC, y su difusión es dependiente del gradiente de concentración entre la sangre y el fluido intersticial a través del transportador de glucosa 1 (GLUT1) (Barros, 2013; Kacem et al., 1998). Esta disposición anatómica de glía, neuronas y capilares, sugiere que los nutrientes son captados preferentemente por células de tipo glial y transferidos hacia neuronas cercanas. La transferencia de substratos energéticos (glucosa o monocarboxilatos) ocurriría a través del espacio extracelular, el cual es tan estrecho, que las moléculas liberadas por una célula, difundirían instantáneamente a células adyacentes (Nicholson, 1995).

En el cerebro, las neuronas poseen un mayor requerimiento energético que la glía, sin embargo diversos reportes han demostrado que *in vitro* e *in situ*, las neuronas metabolizan glucosa de forma más lenta que la glía en condiciones similares (Ainscow et al., 2002; Almeida et al., 2001; Barros et al., 2009; Bouzier-Sore et al., 2006; Bouzier-Sore et al., 2003; Shimizu et al., 2007). En un escenario alternativo, ha sido propuesto que las neuronas pueden utilizar otro substrato para suplir sus demandas energéticas, mecanismo que es conocido como la hipótesis del acoplamiento astrocito-neurona mediado por lactato (Pellerin and Magistretti, 1994). Es importante considerar que el lactato es una excelente fuente energética para células oxidativas, ya que si una molécula de glucosa produce 36 moléculas ATP, 2 moléculas de lactato son capaces de producir 34 moléculas de ATP. Este acoplamiento mediado por lactato ha sido demostrado por

ejemplo, a nivel periférico en retina, entre las células de Müller y las neuronas fotoreceptoras (Poitry-Yamate et al., 1995), o a nivel del epitelio olfatorio, entre las neuronas olfatorias y las células gliales de soporte (Nunez-Parra et al., 2011). De igual forma, en el SNC, el modelo de acoplamiento metabólico ha sido propuesto entre neuronas glutamatérgicas y astrocitos (Pellerin and Magistretti, 1994). Los astrocitos corresponden al tercer componente celular, necesario en la señalización entre neuronas pre y post-sinápticas, cuya función es remover el 95% del glutamato liberado a través del transportador de glutamato GLAST (Anderson and Swanson, 2000). El transporte de glutamato acoplado a sodio, produce la acumulación de sodio intracelular y la consecuente activación de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , produciendo una disminución del contenido de ATP. Esta reducción es incrementada por la metabolización de glutamato a glutamina, debido a los requerimientos de ATP por parte de la glutamina sintetasa, produciéndose la activación de la glicólisis y la incorporación de glucosa (Magistretti and Pellerin, 1999). Este modelo de acoplamiento metabólico, propone que los astrocitos liberan lactato debido a su elevada actividad glicolítica, el cual es incorporado por neuronas adyacentes y metabolizado oxidativamente, en una hipótesis conocida como la lanzadera de lactato astrocito-neurona. Evidencia experimental indica que el glucógeno presente en astrocitos puede ser metabolizado a lactato en ausencia de glucosa (Dringen et al., 1993), siendo capaz de mantener la actividad axonal del nervio óptico en ratas (Wender et al., 2000). También ha sido demostrado que los astrocitos metabolizan la glucosa aeróbicamente para la generación de  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ , sin embargo son capaces de funcionar prolongadamente bajo condiciones completamente anaeróbicas (Goldberg and Choi, 1993; Rose et al., 1998). Incluso, aún en condiciones aeróbicas, los astrocitos son capaces de metabolizar glucosa de forma anaeróbica, permitiéndoles liberar grandes

cantidades de lactato (Dringen et al., 1993; Pellerin and Magistretti, 1994; Walz and Mukerji, 1988), y no glucosa (Dringen et al., 1993). Adicionalmente, estudios *in vitro* demuestran que el lactato puede mantener la actividad neuronal y la integridad morfológica de la sinapsis en rebanadas hipocampales del cerebro (Schurr et al., 1999). Además, se ha demostrado que el lactato puede actuar como un mediador de la regulación de la actividad neural del órgano subfornical en el control de la ingesta de sal (Shimizu et al., 2007). Estudios *in vivo* han demostrado que alteraciones producidas por una hipoglicemia severa inducida por insulina, puede ser prevenida completamente luego de la infusión con lactato (Wyss et al., 2011). Estudios neuronales *in vitro*, utilizando lactato marcado radioactivamente, han demostrado que aún en presencia de glucosa, la mayor cantidad de CO<sub>2</sub> producido se encuentra marcado radioactivamente, indicando que la fuente de carbono utilizada para su metabolización fue el lactato (Bouzier-Sore et al., 2003; Larrabee, 1983; Larrabee, 1995; Poitry-Yamate et al., 1995). Otros estudios *in vivo*, han demostrado que el transporte de lactato en el hipocampo es esencial para el establecimiento de la memoria a largo plazo. La interrupción de la expresión glial del transportador de monocarboxilatos 1 (MCT1) y 4 (MCT4), a través de *short hairpin RNA* (ARNsh), produce amnesia, la que puede ser rescatada por la inyección de lactato pero no por glucosa (Suzuki et al., 2011). Interesantemente, este mecanismo de acoplamiento metabólico, parece no ser exclusivo de mamíferos. Un análisis ultraestructural y estudios inmunohistoquímicos han demostrado que en la especie de tiburón, *Squalus acanthias*, las células endoteliales de los vasos sanguíneos carecen de la expresión de GLUT1, el cual a su vez se encuentra localizado en la región apical de las células gliales que forman parte de la barrera hemato cerebral (Balmaceda-Aguilera et al., 2012). Esta localización subcelular de GLUT1 permitiría la incorporación de glucosa en las células gliales desde



la sangre, siendo está metabolizada hasta lactato, lo que sugiere un acoplamiento entre la glía y las neuronas circundantes (Balmaceda-Aguilera et al., 2012). Estos antecedentes nos han permitido proponer, en conjunto con otros investigadores, que el *sensing* de glucosa hipotalámico es mediado por una interacción metabólica entre las células gliales (tanicitos y astrocitos) y las neuronas neuroendocrinas que controlan la ingesta alimenticia (Cortes-Campos et al., 2011; Chih et al., 2001; Garcia et al., 2003; Magistretti and Pellerin, 1999; Millan et al., 2010). En este contexto, es interesante considerar que las neuronas GE incrementan su actividad eléctrica a través de un mecanismo similar al que ocurre periféricamente en células  $\beta$  pancreáticas, las que liberan insulina en respuesta a incrementos de la concentración de glucosa (Thorens, 2012). Además, en respuesta a incrementos de la concentración de glucosa extracelular, la concentración de ATP intracelular ( $[ATP]_i$ ) aumenta, produciendo el cierre de canales de potasio sensibles a ATP y generando un cambio en el potencial de membrana, el cual gatilla la apertura de canales de calcio sensibles a voltaje y el incremento en la concentración de calcio intracelular, provocando la liberación de neurotransmisores y neuropéptidos (Oomura et al., 1992). Un análisis bioluminiscente, que detecta  $[ATP]_i$  en tiempo real, en cultivos primarios de neuronas y células gliales hipotalámicas, demuestra que incrementos de 3 a 15 mM en la concentración de glucosa extracelular no son capaces de producir cambios significativos en la  $[ATP]_i$  en neuronas, capaces de producir el cierre de canales de potasio sensibles a ATP y la subsecuente depolarización (Ainscow et al., 2002). Sin embargo, cuando el cultivo neuronal es expuesto a 5 mM de lactato (no así piruvato), se produce un incremento significativo de  $[ATP]_i$  (cuya síntesis es sensible a oligomicina, inhibidor del ciclo de Krebs), suficiente para generar el cierre de canales de potasio sensibles a ATP. Interesantemente, la exposición de cultivos primarios de glía hipotalámica a incrementos



de 3 a 15 mM de glucosa, son capaces de producir un incremento significativo en la  $[ATP]_i$ , el cual no es observado en respuesta a lactato (Ainscow et al., 2002). Estos resultados sugieren que el lactato liberado por las células gliales circundantes podría activar a neuronas GE hipotalámicas en condiciones de alta glucosa. La participación del lactato en el mecanismo glucosensor y en el comportamiento alimenticio se encuentra apoyado por estudios *in vivo*, en los cuales, la inyección i.c.v de lactato en el 3V hipotalámico, es capaz de reproducir los efectos generados por la i.c.v de glucosa, produciendo una disminución de la ingesta alimenticia y una reducción del peso corporal (Lam et al., 2008). Además, nuestro laboratorio, ha demostrado que cultivos primarios de tanicitos son altamente glicolíticos, ya que frente a un incremento en la concentración de glucosa extracelular (de 2 a 10 mM), son capaces de producir incrementos en la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular ( $[Ca^{2+}]_i$ ), respuesta que es dependiente de la glicólisis, debido a que la utilización de iodoacetato (inhibidor irreversible de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa) inhibe las ondas de calcio, efecto que no es replicado por antimicina A (inhibidor del complejo III de la cadena transportadora de electrones). El ATP producido glucolíticamente, es liberado al medio extracelular a través de hemicanales formados por conexina 43 (HC-Cx43), y a través de una señalización autocrina, activa a receptores  $P2Y_1$ , permitiendo la producción de inositol trifosfato y la liberación de  $Ca^{2+}$  desde reservorios intracelulares (Orellana et al., 2012). Estos hallazgos fueron complementados con un análisis *in situ* en rebanadas de hipotálamo, las que al ser sometidas a una exposición aguda de glucosa o análogos de glucosa no metabolizables sobre los cuerpos de los tanicitos, producen incrementos del  $[Ca^{2+}]_i$  de forma ATP dependiente (Frayling et al., 2011), sugiriendo que el paradigma de las células  $\beta$ -pancreáticas no se aplica a estas células. Sin embargo, ambos estudios demuestran que las ondas de  $Ca^{2+}$  producidas en

respuesta a glucosa, son dependientes de la liberación de ATP y la activación de receptores P2Y<sub>1</sub>, seguido de la activación del receptor de inositoltrifosfato y la liberación de Ca<sup>2+</sup> de reservorios intracelulares (Orellana et al., 2012). Estos antecedentes, indican que los tanicitos pueden sensor glucosa por más de un mecanismo, el que al parecer se encuentra determinado por la subpoblación de tanicitos. Frayling et al. (2011) utilizó tanicitos  $\alpha$  en rebanadas de hipotálamo, mientras que los cultivos primarios se encuentran altamente enriquecidos en tanicitos  $\beta$ 1, los que expresan enzimas y transportadores expresados *in situ* (Cortes-Campos et al., 2011; Garcia et al., 2001; Millan et al., 2010; Orellana et al., 2012). Interesantemente, ha sido reportado que la inyección i.c.v de ATP estimula a neuronas del AHL, NDH y NVM (Matsumoto et al., 2004; Sorimachi et al., 2001; Wollmann et al., 2005). Además, el ATP extracelular y posiblemente el ADP pueden regular la ingesta de alimentos a través de la activación de receptores P2Y<sub>1</sub> (Kittner et al., 2006). La liberación de lactato y/o ATP por los tanicitos (Cortes-Campos et al., 2011; Orellana et al., 2012) pueden modular la actividad neuronal de áreas hipotalámicas asociadas con la regulación del comportamiento alimenticio. Estos antecedentes sugieren que los tanicitos pueden sensor y responder rápidamente a glucosa, activando vías de transducción de señales.

#### **1.4.1. Transportadores de monocarboxilatos y su expresión cerebral.**

La familia de los MCTs está constituida por 14 genes (MCT1-MCT14), de los cuales solo MCT1, MCT2, MCT3 y MCT4 han sido descritos como simportadores de protones y monocarboxilatos como L-lactato, L-acetoacetato y DL- $\beta$ -hidroxibutirato, en una relación estequiométrica de 1:1 (Poole and Halestrap, 1993). Recientemente MCT7, ha sido asociado al transporte de  $\beta$ -hidroxibutirato en la membrana plasmática de hepatocitos de

*Zebra fish* (Hugo et al., 2012). MCT6 ha sido descrito como un transportador de fármaco diurético bumetanida, sin embargo se desconoce su sustrato endógeno (Murakami et al., 2005). MCT8 es un transportador de alta afinidad para hormonas tiroideas (Friesema et al., 2003), mientras que se ha sugerido que MCT9 facilita el transporte de carnitina (Suhre et al., 2011). MCT10 ha sido descrito como un transportador de aminoácidos aromáticos (Kim et al., 2002). El resto de los miembros de la familia de MCTs, han sido denominados transportadores huérfanos, ya que se desconoce los sustratos que transportan (Halestrap, 2013). De los 14 transportadores conocidos, solo de MCT1-4 han sido caracterizados cinéticamente para el transporte de monocarboxilatos (Tabla 1).

**Tabla 1. Valores de Km para transportadores de monocarboxilatos, cinéticamente caracterizados.**

Monocarboxilato	MCT1	MCT2	MCT3	MCT4
L-lactato	7,7	0,74	5,8	28
Piruvato	1,0	0,08	ND	153
D-β-hidroxi butirato	10,1	1,2	ND	64
Acetoacetato	5,5	0,8	ND	216
Acetato	3,7	ND	ND	31

ND: No determinado

Se ha determinado que la capacidad de transporte de MCT1, MCT2 y MCT4, es afectado reversiblemente, por una serie de inhibidores competitivos como 4-hidroxicinamato (4-CIN), inhibidores del transporte aniónico general como el ácido 4,4-di-isotiocianoestibeno-2,2-disulfónico (DIDS) y flavonoides como quercetina y floretina (Broer et al., 1999; Broer

et al., 1997; Broer et al., 1998; Dimmer et al., 2000; Lin et al., 1998). El transporte también se puede ver afectado de manera irreversible por compuestos organomercuriales como el ácido p-cloromercuribencenosulfónico (pCMBS), el cual puede inhibir el transporte de MCT1 y MCT4, al eliminar puentes disulfuro presentes en la proteína auxiliar basignina o CD147 (chaperona), impidiendo su asociación con MCT1 y MCT4, sin embargo es incapaz de afectar a MCT2, transportador que se une preferentemente con la proteína auxiliar embigina, también conocida como GP-70, la cual es insensible a pCMBS (Broer et al., 1999; Garcia et al., 1995; Wilson et al., 2005). El transportador MCT3 sólo es inhibido por dietilpirocarbonato (DEPC), no reportándose efecto de inhibidores antes descritos (Grollman et al., 2000). Recientemente se generaron una serie de inhibidores específicos para MCT1, conocidos como AR-C155858 y AR-C117977. Sin embargo, ha sido demostrado que AR-C155858 también puede inhibir MCT2, cuando éste se encuentra unido a basignina pero no cuando está asociada a embigina (Ovens et al., 2010a; Ovens et al., 2010b), mientras que AR-C117977 es capaz de inhibir con similar afinidad a ambos transportadores (Murray et al., 2005; Ovens et al., 2010b).

Estudios de localización de los MCTs han logrado determinar que MCT1 es un transportador expresado ubicuamente, tanto en tejidos productores de monocarboxilatos (eritrocitos), como en tejido que consumen lactato (músculo estriado cardiaco y músculo estriado esquelético) (Broer et al., 1997; Halestrap and Price, 1999; Jackson and Halestrap, 1996). Su localización periférica ha sido reportada principalmente en: miocitos (Halestrap et al., 1997), músculo estriado esquelético (Garcia et al., 1995; Wilson et al., 1998), membrana basolateral de los túbulos proximales de la corteza renal, plexos coroideos, vasos sanguíneos y epéndimo (Koehler-Stec et al., 1998; Pierre et al., 2000). A nivel del SNC MCT1 ha sido detectado en astrocitos (Gerhart et al., 1997; Hanu et al.,

2000; Pierre et al., 2000), células endoteliales y pericitos (Gerhart et al., 1997; Leino et al., 1999), cultivos primarios de glía y neuronas hipotalámicas (Ainscow et al., 2002). En el hipotálamo, ha sido demostrado que MCT1 se expresa en tanicitos  $\alpha$  y  $\beta$  que tapizan las paredes ventriculares y el piso del 3V, así como también en células endoteliales de vasos sanguíneos hipotalámicos (Cortes-Campos et al., 2011). En tanicitos  $\alpha$ , MCT1 se encuentra polarizado en la membrana celular ventricular y en los procesos de los pies terminales que contactan las células endoteliales de los vasos sanguíneos (Cortes-Campos et al., 2011). En la pared ventricular, los tanicitos  $\beta_{1v}$  poseen una intensa inmunoreacción para MCT1 en su membrana apical, la cual también es observada en sus procesos celulares que contactan a neuronas orexigénicas del NA, vasos sanguíneos y la región externa del cerebro (Cortes-Campos et al., 2011). En cambio, una débil inmunoreacción es detectada en tanicitos  $\beta_2$  localizados en la EM. Es importante destacar que existe una intensa reactividad para MCT1 en astrocitos de la glía marginal y la EM. Recientemente, mediante un análisis inmunohistoquímico, MCT1 fue localizado en neuronas NPY (Carneiro et al., 2016), expresión que es coincidente con la capacidad de este transportador de permitir tanto el influjo como liberación de monocarboxilatos.

El transportador MCT4 ha sido localizado solo en tejidos productores de lactato (Manning Fox et al., 2000; Rafiki et al., 2003) y que poseen una elevada capacidad glicolítica, siendo altamente expresado en el epitelio pigmentado de retina de ratas (Bergersen et al., 1999), fibras musculares esqueléticas blancas (Garcia et al., 1995; Wilson et al., 1998), condrocitos (Meredith et al., 2002), leucocitos (Wilson et al., 1998) y en músculo estriado esquelético de ratas neonatales, que posee un metabolismo más glicolítico que en etapas adultas, donde la expresión de MCT4 se pierde e incrementa la de MCT1 (Hatta et al., 2001; Wilson et al., 1998). En el cerebro, MCT4 ha sido detectado en astrocitos de la

corteza, hipocampo, cerebelo, cuerpo caloso y capsula interna (Bergersen et al., 2001; Pellerin et al., 2005; Rafiki et al., 2003). MCT4 también ha sido detectado a nivel hipotalámico en astrocitos y células endoteliales ciliadas del NPV (Pellerin et al., 2005). Recientemente, hemos descrito que MCT4 se encuentra localizado en la región lateral del NA, particularmente en los procesos de tanicitos  $\beta 1d$  que contactan neuronas anorexigénicas y que son positivos para GFAP, pero que poseen una baja inmunoreactividad para vimentina, en comparación con los procesos de los tanicitos  $\beta 1v$ . Además, MCT4 es expresado en astrocitos subependimarios, astrocitos y vasos sanguíneos de la EM (Cortes-Campos et al., 2011).

El transportador MCT2, a diferencia de MCT1 y MCT4, se encuentra expresado diferencialmente en diversos tejidos dependiendo de la especie, sin embargo esta suele encontrarse en tejidos que incorporan monocarboxilatos como testículo, riñón, estómago, hígado y bajos niveles en pulmón, cerebro y epidídimo (Koehler-Stec et al., 1998). A nivel cerebral MCT2 se localiza especialmente en la densidad postsináptica de neuronas, una región rica en mitocondrias y que se cree es capaz de oxidar preferentemente lactato como fuente energética (Bergersen et al., 2001; Chiry et al., 2008; Pierre and Pellerin, 2005). Sin embargo, en términos generales su localización se encontraría restringida a neuronas (Pierre et al., 2000), glía limitante, endotelios (Gerhart et al., 1997) y procesos vasculares de astrocitos (Gerhart et al., 1997; Pierre et al., 2000). En el hipotálamo, MCT2 ha sido detectado en neuronas orexigénicas y anorexigénicas del NA (Cortes-Campos et al., 2013), como también en el HDM y el NHA, en ratas alimentadas con una dieta rica en grasas (Pierre et al., 2007).

El transportador MCT3, tiene una localización más restringida, localizándose en membranas basolaterales del epitelio pigmentado de la retina y en las células del plexo

coroideo (Philp et al., 2003; Yoon et al., 1999).

En el hipotálamo, la expresión y función de MCT1 y MCT4 ha sido corroborado por estudios *in vitro* en cultivos primarios de tanicitos, los cuales en respuesta a incrementos en la concentración de glucosa extracelular, captan y liberan lactato a través de MCT1 y MCT4 (Cortes-Campos et al., 2011). La localización *in situ* de MCT1 y MCT4 en los tanicitos es consistente con el modelo de acoplamiento metabólico entre tanicitos y neuronas del NA. Por otro lado, Cortés-Campos et al (2013) confirmó la localización de MCT2 en neuronas neuroendocrinas que controlan la ingesta alimenticia (Cortes-Campos et al., 2013).

#### **1.4.2. Regulación de la actividad de los transportadores de monocarboxilatos y su asociación a patologías**

La expresión de los genes de MCTs son dependientes la condición metabólica de la célula, cuya regulación puede ser mediada tanto por mecanismos transcripcionales y post-transcripcionales.

Ha sido propuesto que, durante un ejercicio aeróbico intenso, el incremento en  $[Ca^{2+}]_i$  y de los niveles de AMP, pueden mediar un incremento en la expresión de MCT1, en un mecanismo dependiente de calcineurina y la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) (Halestrap, 2012). Calcineurina media la defosforilación y activación del factor de transcripción NFAT (Bigard et al., 2000), cuyas secuencias de unión al ADN han sido localizadas en la región promotora de MCT1 (Halestrap, 2012). Por otro lado, la activación de AMPK en conjunto con incrementos de  $[Ca^{2+}]_i$ , permiten la activación del co-activador transcripcional PGC1 $\alpha$  (Lee et al., 2006; Ojuka, 2004), el cual se ha sido involucrado en incrementos de la expresión de MCT1 durante la actividad muscular (Benton et al., 2008).

También se ha reportado que la hormona tiroidea T3, es capaz de incrementar la transcripción de MCT1 y MCT4 en músculo esquelético, sin embargo solo MCT4 es capaz de incrementar sus niveles de expresión proteica (Wang et al., 2003). La regulación negativa de la expresión de MCT1, ha sido reportada en células  $\beta$  pancreáticas, células que carecen de la expresión de MCTs (Zhao et al., 2001), en un mecanismo post-transcripcional, que incluiría la expresión del micro ARN 29 (miR-29), el cual previene la traducción del ARNm de MCT1 a unirse a su región 3'-UTR (Pullen et al., 2011).

Los antecedentes de literatura sobre la regulación transcripcional de MCT2 son más limitados, sin embargo se ha descrito que un ayuno de 48 h, el incremento en la concentración  $\beta$ -hidroxibutirato, es capaz de incrementar la expresión de MCT2 a nivel del tronco cerebral de ratas hembras (Matsuyama et al., 2009). En este contexto, se ha descrito que la expresión del ARNm de MCT2 es mayor en cerebros neonatales que en cerebro adulto, lo que puede estar asociado a la mayor concentración de cuerpos cetónicos, producidos por la oxidación hepática de lípidos provenientes de la leche materna, el principal componente alimenticio en estadio neonatales (Cremer, 1982; Dombrowski et al., 1989; Hawkins et al., 1971). Además, existe evidencia que la expresión de MCT2 se incrementa en respuesta a noradrenalina (Chenal and Pellerin, 2007), insulina y el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1), en un mecanismo de señalización mediado por la quinasa Akt y mTOR (Chenal et al., 2008).

MCT4 se incrementa significativamente en condiciones de hipoxia, lo que es consistente con su elevada capacidad de liberar lactato en condiciones de estrés metabólico (Perez de Heredia et al., 2010; Ullah et al., 2006), mecanismo que estaría mediado por el factor inducible por hipoxia 1- $\alpha$  (HIF-1- $\alpha$ ), capaz de unirse a la región promotora de MCT4, que posee al menos 4 elementos de respuesta para HIF-1- $\alpha$  (Ullah et al., 2006). MCT4 se



encuentra sobreexpresado en músculo estriado cardiaco en etapas neonatales, momento en el cual su metabolismo es más glicolítico que en un corazón adulto (Hatta et al., 2001; Wilson et al., 1998), sin embargo se desconoce si esta sobreexpresión es mediada por HIF-1- $\alpha$ . Interesantemente, ha sido reportado que en un metabolismo glicolítico, el incremento en la producción de L-lactato es capaz de incrementar los niveles de HIF-1- $\alpha$  (De Saedeleer et al., 2012), lo que permitiría establecer un nexo entre el metabolismo glicolítico y la expresión de MCT4 (Halestrap, 2013).

Otro potencial mecanismo de regulación que ha sido propuesto para los MCTs, involucra la translocación de transportadores almacenados en compartimentos intracelulares hacia la membrana plasmática, como también ha sido reportado para transportadores como GLUT4 (Bogan, 2012). En este contexto, se ha descrito que la hipertrofia del ventrículo izquierdo del corazón, en respuesta a isquemia, ocurre en paralelo a un incremento en la localización de MCT1 en la membrana plasmática, el cual se produce sin cambios en la expresión del ARNm de MCT1 (Johannsson et al., 2001).

Recientemente, ha sido informado que la expresión de MCTs en el hipotálamo y en diferentes regiones cerebrales puede verse afectada al someter a ratas a un ayuno prolongado, observándose que MCT1 y MCT2 aumentan su expresión a nivel de corteza cerebral, hipocampo e hipotálamo, mientras que MCT4 incrementa su expresión sólo a nivel hipotalámico, lo que sugeriría que la expresión de MCTs es dependiente de funciones cerebrales específicas, lo que incluye el control de la ingesta de alimentos en el hipotálamo (Takimoto and Hamada, 2014).

Por otro lado, ha sido demostrado que la expresión de MCT1 es esencial en el desarrollo, debido a que el *knockout* de MCT1<sup>-/-</sup> es letal, sin embargo el ratón heterocigoto MCT1<sup>+/-</sup> es viable, el cual desarrolla una degeneración axonal a nivel de la médula espinal y

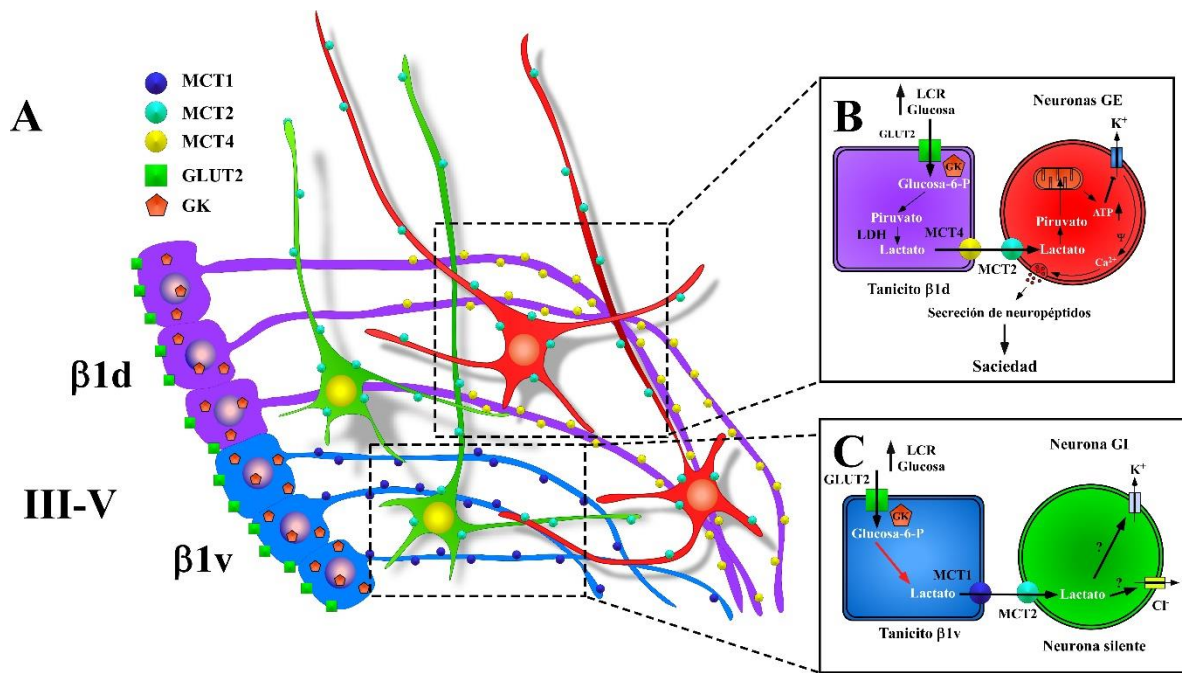
cerebro (Lee et al., 2012b). En este contexto, es interesante destacar que en pacientes que sufren de esclerosis lateral amiotrófica, existe una reducción en la expresión de MCT1 en oligodendrocitos (Lee et al., 2012b), lo que sugiere que la función de MCT1 en la patogénesis de la enfermedad, sería consistente con el rol de los oligodendrocitos en apoyar metabólicamente a la función axonal y neuronal al entregar lactato como metabolito energético, como ha sido propuesto en el modelo de acoplamiento metabólico glía-neurona (Bergersen, 2007; Pierre and Pellerin, 2005). Por último, recientemente se ha demostrado que ratones heterocigotos para MCT1<sup>+/-</sup> presentan resistencia a la obesidad inducida por una dieta rica en grasas, como también una menor resistencia a la insulina y una menor esteatosis hepática, comparado a ratones MCT1<sup>+/+</sup> (Lengacher et al., 2013).

#### **1.4.3. Rol de los transportadores de monocarboxilatos en el acoplamiento glía-neurona hipotalámico.**

La capacidad de los tanicitos de liberar lactato en respuesta a glucosa, junto con la expresión glial de MCT1 y MCT4 en procesos de tanicitos y la expresión neuronal de MCT2 (Fig. 4A), sugiere que el transporte de monocarboxilatos a través de MCTs puede tener un rol clave en el control indirecto de la actividad neuronal en respuesta a incrementos de la concentración de glucosa en el hipotálamo. La localización de MCT4 en tanicitos  $\beta$ 1d sugiere que estas células pueden acoplarse metabólicamente con neuronas GE, las que expresan MCT2 y el neuropéptido POMC, localizadas en el área lateral del NA (Cortes-Campos et al., 2013). El lactato liberado a través de MCT4 e incorporado a nivel neuronal a través de MCT2, podría incrementar la [ATP]<sub>i</sub>, produciendo el cierre de canales de K<sup>+</sup> sensibles a ATP e incrementar la actividad eléctrica neuronal

(Ainscow et al., 2002) (Fig. 4B). Esta propuesta se encuentra apoyada por el hecho que neuronas GE localizadas en el HVM y en el NTS, incrementan su actividad en respuesta a incrementos en la concentración extracelular de lactato (Himmi et al., 2001; Yang et al., 1999). Además, la expresión de MCT2 en neuronas orexigénicas junto con la localización de MCT1 en tanicitos  $\beta 1v$  que se encuentran distribuidos en el área peri-ventricular, nos lleva a proponer que los tanicitos pueden regular la actividad de neuronas GI, y que el lactato puede llegar a inhibir a estas neuronas, produciendo su hiperpolarización a través de la apertura de canales de  $Cl^-$  y/o  $K^+$  (Fioramonti et al., 2007) (Fig. 4C). Por lo tanto, es factible que el lactato posea un doble rol en el control del comportamiento alimenticio, el cual sería dependiente del subtipo de neurona y glía activada durante el proceso.





**Figura 4. Modelo del *sensing* de glucosa hipotalámico basado en el acoplamiento metabólico entre tanicitos y neuronas.**

**A:** Representación esquemática de la localización de MCT4 (círculos amarillo) en procesos de tanicitos β1d (morado), MCT1 (círculos azules) en procesos de tanicitos β1v (celeste), y MCT2 (círculos verde claro) en neuronas orexigénicas (verde), y en neuronas anorexigénicas (rojo) del NA. **B:** Esquema de la representación del acoplamiento glía-neurona basado en la transferencia de lactato propuesto para el mecanismo sensor de glucosa cerebral entre neuronas GE y tanicitos. **C:** Esquema basado en la propuesta de interacción entre neuronas GI (orexigénicas) y tanicitos β1v en respuesta a incrementos en la concentración de glucosa en el LCR. III-V: tercer ventrículo; β1d y β1v: tanicitos; LCR: líquido cefalo-raquídeo; GK: glucoquinasa; LDH: láctico deshidrogenasa. Modificado de (Elizondo-Vega et al., 2015).

## 2. Planteamiento general del problema

La regulación de la homeostasis de la glucosa es un proceso altamente regulado, en los cuales participan de forma concertada tanto en tejidos periféricos como el páncreas, hígado e intestino, como órganos del sistema nervioso central (SNC), a través de circuitos neuronales especializados. Estos son capaces de detectar y responder a cambios en la concentración de glucosa gatillando la secreción hormonal o la activación del sistema nervioso autónomo (SNA), que en conjunto controlan la biodisponibilidad de la glucosa y la conducta alimenticia (Schwartz et al., 2000). Se ha postulado que las bases moleculares de la glucodetección, son similares al que se establece en el páncreas. En él, las células  $\beta$  pancreáticas liberan insulina en respuesta a hiperglicemia, mecanismo en el que participan proteínas como el transportador de glucosa GLUT2, la enzima glucoquinasa (GK) (Thorens et al., 1988; Vischer et al., 1987) los canales de potasio sensibles a ATP (Cook et al., 1988), canales de calcio regulados por voltaje y los receptores de la proteína relacionada al glucagón-1 (GLP-1) (Meloni et al., 2013). En el cerebro, evidencias experimentales señalan que el hipotálamo cumple un rol fundamental en la regulación de la ingesta alimenticia y el control de la homeostasis de glucosa. En el hipotálamo basal, cercanos a las paredes del tercer ventrículo se localizan núcleos neuronales como el área hipotalámica lateral (LHA), el núcleo ventromedial (VMN) y el núcleo arqueado (NA) (Garcia et al., 2003; Oomura and Yoshimatsu, 1984; Schwartz et al., 2000). En el hipotálamo ventromedial (VMH), se ha demostrado que existen neuronas que son activadas eléctricamente por cambios en la concentración de glucosa y lactato (Yang et al., 1999). Sin embargo, los mecanismos moleculares por los cuales el hipotálamo detecta y responde a variaciones en los niveles de glucosa son desconocidos (Thorens, 2001). Mediante estudios *in vitro*, se ha planteado que el mecanismo sensor de glucosa puede

operar mediante un acoplamiento metabólico entre las neuronas que responden a glucosa y la glía circundante, en el cual la glía sería capaz de detectar cambios en la concentración de glucosa y liberar lactato, activando a las neuronas adyacentes, las cuales generarían una respuesta celular coordinada a los cambios en la concentración de glucosa sistémica (Ainscow et al., 2002). A nivel hipotalámico, la principal célula glial es conocida como tanicito, célula que reviste las paredes ventriculares hipotalámicas y posee características estructurales y moleculares que le permitirían detectar cambios en la concentración de glucosa cerebral y liberar lactato. Los tanicitos contactan con el líquido cefalorraquídeo (LCR) (Akmayev and Popov, 1977), único fluido intracerebral que es capaz de incrementar la concentración de glucosa de manera proporcional a la sangre (Steffens et al., 1988). Además, los tanicitos localizan en su región proximal el transportador GLUT2 de los transportadores de hexosas (García et al., 2003) y el transportador GLUT1 en sus procesos basales, en zonas donde existe un bajo contenido de astrocitos (García et al., 2001). Recientemente, hemos demostrado que los tanicitos expresan la enzima GK (Millan et al., 2010), lo que faculta a este tipo celular para la detección eficiente de cambios en la concentración de glucosa. En cuanto a la localización de MCT a nivel hipotalámico, hemos demostrado que los tanicitos expresan funcionalmente los transportadores MCT1 y MCT4, y que estas células, *in vitro*, son capaces de liberar lactato en respuesta a alzas en la concentración de glucosa (Cortes-Campos et al., 2011). Además, mediante estudios *in vitro* e *in vivo*, hemos demostrado que las neuronas hipotalámicas expresan el transportador MCT2, principal transportador involucrado en procesos de incorporación de lactato (Cortes-Campos et al., 2013).

La participación de lactato en este sistema, ha sido demostrado mediante la inyección intracerebroventricular (i.c.v.) de L-lactato a ratas euglicémicas. Los animales en

presencia de este monocarboxilato, disminuyen los niveles de glucosa sanguínea y reducen la ingesta alimenticia y el peso corporal, emulando los efectos generados por la glucosa. Además, en ellos, la inhibición de la conversión de lactato a piruvato por oxamato (inhibidor de la LDH), suprime las respuestas antes descritas, demostrando que el metabolismo de lactato es una etapa bioquímica obligada para la regulación de la homeostasis de la glucosa y la ingesta alimenticia (Lam et al., 2008; Lam et al., 2005). Estos resultados obtenidos *in situ* e *in vivo* validan el mecanismo sensor de glucosa cerebral basado en la interacción glía-neurona, mediado por lactato. Es así como se ha propuesto que la glía hipotalámica, detecta variaciones en los niveles de glucosa, transduciendo esta señal a los núcleos neuronales adyacentes, utilizando como mensajero intercelular el lactato. Sin embargo, es necesario validar *in vivo*, que el lactato participa de una interacción metabólica entre la glía y la neurona, además de modular cambios en el comportamiento alimenticio. Con estos antecedentes, proponemos como hipótesis que “los tanicitos interactúan con las neuronas hipotalámicas a través de monocarboxilatos para regular la ingesta alimenticia”.

### 3. Hipótesis.

Nuestra hipótesis propone que: “Los tanicitos interaccionan con las neuronas hipotalámicas a través de monocarboxilatos para regular la ingesta alimenticia”.

#### 3.1. Objetivo general.

Evaluar el rol de los transportadores de monocarboxilatos gliales, sobre la ingesta alimenticia.

#### 3.2. Objetivos específicos.

1. Definir que la inhibición de MCT1 y MCT4 disminuye el transporte de lactato en tanicitos *in vitro*.
2. Demostrar que la inhibición *in vivo* de MCT1 y MCT4 en el hipotálamo, afecta la función glucosensora que controla la ingesta alimenticia durante aumentos de la glucorraquia.
3. Definir los cambios en la conducta alimenticia en animales *knockdown* para MCT1 y MCT4.



## II MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Animales de experimentación.

En esta tesis se utilizaron ratas Sprague-Dawley de 1 día postnatal y machos adultos de aproximadamente 2 meses de edad. Los animales se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura (20-25°C) y fotoperíodo (12/12 h luz/oscuridad), recibieron acceso libre al agua y fueron alimentados diariamente con pellet para roedores estándar (Lab Diet, 5P00 Prolab RMH 3000, Purina Mills, St. Louis, MO), excepto bajo algunas condiciones experimentales. Todos los animales de experimentación se manejaron según las normas de bioética del *National Institutes of Health, Bethesda, Meriland* y por el manual de Bioseguridad (2008) de CONICYT.

### 2. Cultivos celulares.

Todos los cultivos celulares fueron mantenidos en una incubadora de células a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad. Los procedimientos de obtención y expansión celular fueron realizados en un gabinete de seguridad biológica clase II y las líneas celulares fueron almacenadas por congelamiento con DMSO 10% v/v en medio de cultivo con suero bovino fetal (SBF) al 10 % v/v, en nitrógeno líquido.

#### 2.1. Cultivos primarios de tancitos hipotalámicos.

Los cultivos primarios fueron obtenidos a 1 día post-natal bajo lupa estereoscópica. La región hipotalámica, del cerebro de ratas, fue microdiseccionada a 4°C en tampón de disección [glucosa 2 mM, sacarosa 44 mM, HEPES 10 mM, NaCl 135 mM, KCl 5 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,15 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 mM, pH 7,4, 340 mOsm/L] realizando dos cortes

transversales, uno a nivel del quiasma óptico y otro inmediatamente antes de los cuerpos mamilares, disecando el área diencefálica ventral. Posteriormente, el tejido se sometió a disgregación enzimática por 20 min a 37°C en presencia de tripsina 0,25 p/v (Gibco® Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) y EDTA 0.20% p/v (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), y luego a disgregación mecánica en la solución de plantado consistente en: MEM (Gibco® Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), SBF 10% v/v (HyClone Laboratories, Logan, UT, USA), L-glutamina 2 mM (Gibco® Invitrogen, Life Technologies) y DNasa 2 mg/mL (Sigma-Aldrich). Posteriormente, se procedió a realizar el recuento y la estimación de la viabilidad celular por el método de exclusión con azul de tripán. Las células obtenidas se sembraron en frascos de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> (T25) (TrueLine®, USA) previamente tratados con poli-L-lisina 0,2 mg/mL (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), a una densidad aproximada de 1,2x10<sup>5</sup> células/cm<sup>2</sup>. Luego de 2 h, se reemplazó el medio de cultivo por MEM suplementado con SBF 10% v/v, L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/mL, estreptomycin 100 µg/mL (HyClone Laboratories) y fungizona 2,5 µg/mL (Gibco® Invitrogen, Life Technologies). Las células se mantuvieron por 2 semanas en cultivo, con cambio de medio cada 2 días, al cabo de los cuales las células se expandieron para realizar análisis inmunohistoquímico, de RT-PCR, *Western blot*, transporte de L-lactato, liberación de lactato y ensayos de *knockdown in vitro*.

## **2.2. Cultivo de astrocitos obtenidos desde corteza de rata.**

Los cultivos primarios de astrocitos fueron preparados a partir de ratas de 1 a 3 días post natales, los cuales fueron sacrificados por guillotina para la obtención del cerebro. Luego fue traspasado a la solución de disección descrita previamente, para extraer la corteza y

eliminar las meninges, procedimiento que se realizó a 4°C bajo una lupa estereoscópica. La corteza fue cortada en pequeños trozos y llevada a un tampón fosfato salino (PBS) 0,1M [ $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10,6mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3,2mM, NaCl 123,5mM, pH 7,4 y 320 mOsm]. Luego se sometió a disgregación enzimática por 15 min a 37°C en presencia de tripsina 0,25% p/v y EDTA 0,20% p/v y posteriormente a disgregación mecánica en medio DMEM suplementado con SBF 10% v/v, glutamina 2 mM, penicilina 100 U/mL, estreptomycinina 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , glucosa 2 mM y fungizona 2,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Luego de realizar el recuento y estimación de la viabilidad celular, por el método de exclusión con azul de tripán 0,2% p/v, las células fueron sembradas en placas de cultivo a una densidad aproximada de  $1 \times 10^5$  células/mL. El primer cambio de DMEM, suplementado con SBF 10% v/v, glutamina 2 mM, penicilina 100 U/mL, estreptomycinina 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , glucosa 2 mM y fungizona 2,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , a las 4 horas de realizada la disección para retirar restos celulares propios del proceso de disección. Posteriormente, el medio fue cambiado cada 48 h y los cultivos se mantuvieron por dos semanas, luego de los cuales se utilizaron para realizar ensayos de RT-PCR y análisis de velocidad glicolítica.

### **2.3. Cultivo de células 293A.**

Estas células derivadas de riñón humano embrionario transfectadas establemente con el gen E1 adenoviral (tipo 5), fueron utilizadas para la producción y amplificación de los adenovirus. Las células de pasajes tempranos (3-16) fueron cultivadas en placas petri de 10 cm de diámetro (TrueLine®) con 10 mL de medio de cultivo DMEM alta glucosa (Gibco® Invitrogen, Life Technologies) suplementado con 10% v/v de SBF, 0,1 mM de aminoácidos no esenciales (Gibco® Invitrogen, Life Technologies), penicilina 100 U/mL, estreptomycinina 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y fungizona 2,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  con cambio de medio de cultivo cada

2-3 días. Cuando las células en cultivo alcanzaron un 90% de confluencia, aproximadamente, fueron expandidas utilizando densidades de siembra de 8.000 cél/cm<sup>2</sup>. El recuento y la estimación de la viabilidad celular fueron realizados por el método de exclusión con azul de tripán 0,2 % p/v.

#### **2.4. Cultivo de células 293T.**

La línea celular HEK 293T fue utilizada para la titulación de partículas adenovirales. Células de pasajes tempranos fueron cultivadas en medio DMEM 25 mM glucosa [DMEM-HG], suplementado con SBF 10% v/v, penicilina 100 U/mL, estreptomycin 100 µg/mL, glutamina 2 mM y fungizona 2,5 µg/mL, con cambio de medio de cultivo cada dos días. Se utilizaron densidades de siembra de 8.000 cél/cm<sup>2</sup>, y se mantuvieron hasta alcanzar un 80-90% de confluencia. El recuento y la estimación de la viabilidad celular fueron realizados por el método de exclusión con azul de tripán 0,2 % p/v.

#### **2.5. Cultivo de células GT1-7.**

Las células de la línea GT1-7 son derivadas de un tumor de neuronas hipotalámicas de ratón, fueron mantenidas en cultivo utilizando DMEM-HG (Invitrogen) suplementado con SBF 10% v/v, piruvato 110 mg/L (Invitrogen), penicilina 100 U/mL, estreptomycin 100 µg/mL, glutamina 3,75 mM y fungizona 2,5 µg/mL. Las células fueron mantenidas en placas de 10 cm de diámetro (TrueLine®) con 10 mL de medio de cultivo con cambios de medio cada 2 días. Cuando los cultivos alcanzaron un 90% de confluencia, aproximadamente, fueron expandidos en una proporción de 1:5. Esta línea celular fue utilizada para realizar análisis de velocidad glicolítica.

### **3. Procesamiento histológico.**

#### **3.1. Fijación.**

Ratas adultas de aproximadamente dos meses de edad, fueron anestesiadas con una mezcla de 4 volúmenes de ketamina al 10 %, 4 volúmenes de xilaxina al 2 % y 2 volúmenes de pacifor 10 mg/ml. Posteriormente sus cerebros fueron extraídos y fijados por inmersión en para-formaldehído (PFA) 4 % p/v, preparado en tampón fosfato 100 mM pH 7,4, durante 15 min. Posteriormente, se realizaron cortes frontales en las muestras de cerebro, para facilitar la penetración del fijador, y se mantuvieron por 48 h, para luego transferirlos a una solución de sacarosa al 30% p/v por 72 h a 4°C. Pasado este tiempo se procedió a realizar el procesamiento criogénico y obtención de cortes por congelación.

#### **3.2. Procesamiento criogénico y obtención de cortes por congelación.**

Las muestras de cerebro fijadas con PFA 4% p/v por inmersión y mantenidas en sacarosa fueron embebidas en el medio para tejidos criopreservados (Leica Microsystems, Nussloch, Germany), congeladas con CO<sub>2</sub> y mantenidos a -80°C hasta el momento de realizar los cortes histológicos de 30 µm en el micrótopo de congelamiento (Microm HM520), para ensayos de inmunofluorescencia en cortes flotantes.

### **4. Inmunohistoquímica.**

#### **4.1. Inmunohistoquímica para cortes de tejido.**

Se utilizaron cortes de tejido obtenidos por microtomía de congelación. Los cortes fueron lavados tres veces en solución tampón Tris-fosfato 10 mM (pH 7,8) por 10 min, luego se

permeabilizaron con Tritón X-100 1 % v/v en Tris-fosfato 10 mM (pH 7,8) por 20 min. La mezcla de anticuerpos preparada en Tris-BSA 1 % Tritón X-100 0,2 % v/v se incubó por 16 h y a 4° C en las diluciones correspondientes (Tabla 1), para los cortes de 30  $\mu$ m. Posterior a la incubación con el primer anticuerpo las muestras se lavaron 5 veces por 5 min en tampón Tris-fosfato 10 mM (pH 7,8) e incubadas durante 2 h con los segundos anticuerpos unidos a fluoróforos (Tabla 2), diluidos en Tris-BSA 1 %. La incubación se realizó en una cámara húmeda a temperatura ambiente y en oscuridad. Luego, las muestras fueron lavadas 5 veces por 5 min en tampón Tris-fosfato 10 mM (pH 7,8) y montadas con medio de montaje para fluorescencia (Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA). Como tinción nuclear se utilizó Hoechst o TOPRO-3 (Gibco® Invitrogen, Life Technologies).

#### **4.2. Inmunofluorescencia en células.**

Las células fueron cultivadas sobre cubreobjetos de vidrio de 12 mm recubiertos con poli-L-lisina 0,2 mg/mL en placas de 12 o 24 pocillos (TrueLine®). Las preparaciones fueron lavadas en tampón PBS y fijadas por 30 min a temperatura ambiente en PFA al 4%, preparado en PBS pH 7,4. Posteriormente, las células fueron lavadas 5 veces por 5 min con tampón Tris-fosfato 10 mM (pH 7,8) y permeabilizadas con Tritón X-100 0,2% (Sigma) por 10 min. Luego, fueron incubadas con el anticuerpo primario (Tabla 2) diluido en tampón Tris-Fosfato 10 mM (pH 7,8), BSA al 1% por 15 h en cámara húmeda a temperatura ambiente. Luego fueron lavadas 5 veces por 5 min en Tris-Fosfato 10 mM (pH 7,8) e incubadas con un segundo anticuerpo marcado con fluoróforos (Tabla 2), diluido en Tris-Fosfato 10 mM (pH 7,8) más BSA al 1% por 2 h. Como tinción de contraste fue utilizada una tinción nuclear con TOPRO-3 utilizando el mismo procedimiento

anterior. Finalmente, las células crecidas sobre cubreobjeto fueron lavadas 5 veces con Tris-Fosfato 10 mM (pH 7,8) por 5 min y montadas en 10  $\mu$ L de medio de montaje fluorescente (DAKO) previo pasaje rápido por agua destilada para eliminar las sales.

#### 4.3. Estudios de marcaje múltiple.

El análisis de doble, triple o cuadruple marcaje se realizó utilizando dos o tres anticuerpos primarios, respectivamente (Tabla 1), generados en especies animales distintos de modo que no exista reacción cruzada. Los segundos anticuerpos utilizados (Tabla 2) tienen unidos distintos fluoróforos, para observar la inmureactividad mediante filtros diferentes. Los anticuerpos se aplicaron en conjunto en la misma solución (Tris-BSA) de incubación y lavados según el protocolo descrito anteriormente.

**Tabla 2. Anticuerpos primarios utilizados en ensayos de inmunolocalización.**

Anticuerpos primarios			
Anticuerpo	Especie	Dilución	Origen
Anti-MCT1	Pollo	1:100	Milipore
Anti-MCT2	Pollo	1:20	Milipore
Anti-MCT4	Pollo	1:20	Milipore
Anti-vimentina	Pollo	1:200	Millipore
Anti-GFAP	Conejo	1:200	DAKO
Anti-GFAP	Ratón	1:200	DAKO
Anti-Cx43	Conejo	1:1000	Donado por Dr. Sáez
Anti-Kir 6.1	Cabra	1:50	Santa Cruz Biotech
Anti-DARPP32	Cabra	1:50	Santa Cruz Biotech
Anti-glucoquinasa	Cabra	1:100	Donado por Dr. Mark Magnuson
Anti-HuC	Mouse	1:200	Donado por Dr. Christian Cortes

**Tabla 3. Anticuerpos secundarios usados en ensayos de inmunolocalización.**

<b>Anticuerpos secundarios</b>			
<b>Anticuerpo</b>	<b>Especie</b>	<b>Dilución</b>	<b>Origen</b>
Anti-conejo-Dylight 488	Burro	1:200	Jackson immunoresearch
Anti-conejo-Dylight 549	Burro	1:200	Jackson immunoresearch
Anti-conejo-Cy5	Burro	1:200	Jackson immunoresearch
Anti-ratón-Cy2	Burro	1:200	Jackson immunoresearch
Anti-ratón-Cy3	Burro	1:100	Jackson immunoresearch
Anti-ratón-Cy5	Burro	1:200	Jackson immunoresearch
Anti-cabra-Cy2	Conejo	1:200	Jackson immunoresearch
Anti-cabra-Cy3	Conejo	1:200	Jackson immunoresearch
Anti-chicken-Alexa 488	Burro	1:200	Jackson immunoresearch
Anti-chicken-Cy5	Burro	1:200	Jackson immunoresearch
Anti-chicken-Cy3	Burro	1:200	Jackson immunoresearch
Anti-conejo-Alexa 514	Cabra	1:200	Invitrogen

#### **4.4. Microscopía confocal.**

Muestras de cultivos celulares o cortes de tejidos con inmunofluorescencia fueron analizados utilizando un microscopio confocal LSM700 (Zeiss), equipado con tres líneas de láser sólidos, de 488 nm, 555 y 639 nm y dos detectores de alta sensibilidad, lo que permite obtener imágenes en distintos planos focales de hasta tres marcadores fluorescentes. Las imágenes fueron adquiridas mediante el software ZEN 2011 (Zeiss) con un tamaño de 1024 x 1024 x16 bits. Los parámetros que modifican la intensidad de fluorescencia capturada por el equipo, como potencia de láser y ganancia digital fueron seteados con muestras sin marcar.

Para el análisis de la proteína fluorescente verde (EGFP) en cortes hipotalámicos, estructuras que presentan cierto volumen, las imágenes fueron adquiridas además en distintos planos z, los que apilados en un z-stack son superpuestos para generar una



imagen que corresponde a una proyección de máxima intensidad (MIP).

#### **4.5. Microscopía confocal espectral.**

Para aquellas muestras en donde se utilizaron más de tres marcadores fluorescentes, se utilizó para su análisis un microscopio confocal espectral LSM780 NLO (Zeiss). Este equipo posee cinco líneas de láser sólidos de 405 nm, 458 nm, 488 nm, 514 nm, 561 nm y 633 nm y un detector policromático que permite la separación espectral y la detección simultánea de hasta 10 marcadores fluorescentes. Las imágenes fueron adquiridas mediante el software ZEN 2011 (Zeiss) con un tamaño de 1024 x 1024 x16 bits y los parámetros de intensidad de fluorescencia ajustados con muestras sin marcar.

Para el análisis de cortes gruesos de tejido, en los cuales era necesario recuperar mayor información de la muestra, se realizó un escaneo segmentado de manera automatizada en los planos x, y, con un objetivo de 40x, mediante la modalidad mosaico o *tile scan*. La captura de las imágenes fue realizada en profundidad (mediante z-stack), abarcando 19  $\mu\text{m}$  de espesor, lo que junto a la modalidad de escaneo anterior nos permitió obtener una visión panorámica de toda la región de interés, manteniendo la resolución del objetivo utilizado.

#### **4.6. Procesamiento de imágenes.**

Las reconstrucciones tridimensionales fueron obtenidas utilizando directamente el software de adquisición de imágenes ZEN 2011 (Zeiss) o el software de procesamiento Imaris (Bitplane, Saint Paul, MN), ambos a partir de la información almacenada en los archivos de MIP.

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

### **5.1. Extracción de ARN total.**

Se obtuvo ARN total de cultivos primarios de tanicitos y de hipotálamo de rata adulta. El ARN fue extraído mediante el método de extracción tiocianato de guanidina-fenol/cloroformo, homogenizando las muestras en 500 a 1000  $\mu\text{L}$  de Trizol®, dependiendo del número de células o cantidad de tejido según instrucciones del fabricante, e incubándolas por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras fueron tratadas con 200  $\mu\text{L}$  de cloroformo, agitadas vigorosamente por 15 seg e incubadas a temperatura ambiente por 3 min. Las muestras fueron centrifugadas a 12.000 g por 15 min a 4°C, para separar las fases. Una vez recuperada la fase acuosa, se agregaron 300  $\mu\text{L}$  de isopropanol a cada muestra, las que fueron incubadas por 10 min a temperatura ambiente y luego centrifugadas a 12.000 g por 10 min a 4°C. El sobrenadante fue eliminado y el pellet fue lavado 2 veces con 500  $\mu\text{L}$  de etanol 70 % v/v y centrifugado a 12.000 g por 5 min a 4°C. El sobrenadante fue eliminado y el pellet fue resuspendido en 10 a 50  $\mu\text{L}$  de agua libre de ARNasa. El ARN total fue cuantificado midiendo su absorbancia a 260 nm y su pureza se midió por la relación 260/280 nm.

### **5.2. Transcripción reversa del ARN total (RT).**

La síntesis de ADNc fue realizada utilizando la enzima transcriptasa reversa RevertAid® H Minus M-MuLV (ThermoScientific). Previo a la síntesis, 2  $\mu\text{g}$  de las muestras de ARN total fueron tratadas con ADNasa (ThermoScientific). Para un volumen final de 20  $\mu\text{l}$ , se incubó la mezcla anterior con 0,5  $\mu\text{g}$  de oligo-dT, denaturado a 70° C por 5 min y llevado a hielo por 2 min. Posteriormente, se agregó el tampón de transcripción (Tris-HCl 50 mM,

pH 8,3, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 4 mM, DTT 10 mM), la mezcla de dNTPs (1 mM de cada uno) y 20 U del inhibidor de ARNasa o Ribolock (ThermoScientific), incubando por 5 min a 37°C. Finalmente, se agregaron 200 U de la enzima transcriptasa reversa RevertAid® H Minus M-MuLV y se incubó por 1 h a 42°C. Al finalizar la reacción la muestra fue calentada a 70°C por 10 min. Los controles negativos para la amplificación de las muestras fueron tratados con el mismo protocolo de transcripción, pero sin añadir a la mezcla oligo-dT ni enzima transcriptasa reversa.

### **5.3. Amplificación del ADNc por PCR.**

La reacción de amplificación del ADNc obtenido se realizó en un termociclador Mastercycler (Eppendorf) en una mezcla que contenía Tris-HCl 10 mM (pH 8,8), KCl 50 mM, Nonidet P40 0,8 % v/v, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, mezcla de dNTPs (0,2 mM de cada uno), set de partidores específicos (0,2 µM de cada uno) (Tabla 3), Taq ADN polimerasa 0,31 U (ThermoScientific) y 1 µL del producto de transcripción reversa, en un volumen final de 12,5 µL. El programa de incubación fue el siguiente: 95°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 95°C por 30 s, 50-60°C (dependiendo de los partidores usados) por 30 s y 72°C por 30-40 s, y una extensión final de 72°C por 7 min. La síntesis de todos los ADNc fue testeada utilizando partidores específicos para β-actina o ciclofilina. Los partidores utilizados para amplificar los distintos genes fueron diseñados utilizando el programa AmplifX (versión 1.5.4 por Nicolás Jullien), teniendo en cuenta su T<sub>m</sub>, el porcentaje de GC, la formación de dímeros y estructuras secundarias. En la mayoría de los casos cada partidor de un set de partidores se encuentra en un exón distinto actuando como control para la amplificación de ADN genómico contaminante.

#### **5.4. RT-PCR cuantitativo en tiempo real (qRT-PCR).**

Este ensayo fue realizado en muestras de hipotálamo de rata macho adulta, cultivos primarios de tanicitos transducidos e hipotálamo de ratas transducidas con los vectores adenovirales. Se obtuvieron muestras de ARN total por triplicado o más y los procesos de extracción de ARN y transcripción reversa fueron realizadas de la misma forma que para el RT-PCR convencional. Para la amplificación del producto se usó el kit “Brilliant® SYBR® Green QPCR master mix” (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA) en un volumen final de 25 µL conteniendo 2 µL de ADNc, 500 nM de los partidores respectivos. Las muestras se denaturaron inicialmente a 95°C por 10 min, luego se realizaron 40 ciclos de 95°C por 30 s, 60°C por 15 s y 72°C por 15 s, en el termociclador Mx3000P (Agilent Technologies, Inc.). Se realizaron curvas de calibración, con diluciones seriadas, de una de las muestras para determinar la eficiencia de cada una de las reacciones. La cuantificación se realizó comparando el número de ciclos requeridos para amplificar cada gen sobre el ciclo umbral (Ct) en relación al gen de referencia ciclofilina. Los resultados fueron expresados aplicando el método  $\Delta\Delta C_t$ s en los cuales la cantidad de ARN fue expresado como X veces sobre una muestra utilizada como referencia (muestra transducida con adenovirus control, muestra sin transducir, etc.).

#### **5.5. Electroforesis en gel de agarosa.**

Los productos de PCR se identificaron sembrando en geles de agarosa 1,2 % p/v en tampón TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM) y bromuro de etidio 0,2 µg/mL. Para cargar las muestras se utilizó tampón de carga 6 X (glicerol 30 % v/v, azul de bromofenol 0,5 % p/v en tampón TE Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM). Como estándar de peso molecular se sembraron 0,5 µg de un estándar de pares de bases. La electroforesis se

realizó a 100 V por 40 min en tampón TAE en una cámara de electroforesis (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, California, USA). La visualización de los fragmentos se realizó en un transiluminador de luz ultravioleta. Las imágenes de los geles se obtuvieron en el equipo Molecular Imagen FX (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, California, USA).

**Tabla 4. Partidores utilizados para RT-PCR convencional y qRT-PCR.**

Nombre	Partidor sense 5'-3'	Partidor antisense 5'-3'	Producto (pb)
rMCT1	GGCAAGGTGGAAAACTCAA	ACACTCCATTGCAACAACA	400
rMCT2	CAGGAGGTCCCATCAGTAGT	ACTTTTAGACTTCGCAGCAC	416
rMCT4	TGCGGCCCTACTCTGTCTAC	TCTCCGATGCAGAAGAAG	369
$\beta$ actina	GCTGCTCGTCGACAACGGCTC	CAAACATGATCTGGGTCATCTTCTC	353
qRT-rMCT1	TGGAATGTTGTCCTGTCCTCCTGG	TCCTCCGCTTTCTGTTCTTTGGC	178
qRT-rMCT2	CTATCGTGGAGTGTTGCCAGTTC	CATTTCTTTGGATGCCTGCGAG	227
qRT-rMCT4	TTCTCCAGTGCCATTGGTCTCGTG	CCC GCCAGGATGAACACATACTTG	122
qRT-NPY	TGTTTGGGCATTCTGGCTGAGG	CTGGGGGCATTTCTGTGCTTTC	203
qRT-AgRP	GCAGACCGAGCAGAAGATGTTC	GTAGCACGTCTTGAAGAAGCGG	186
qRT-POMC	CTCCTGCTTCAGACCTCCATAGAC	AAGGGCTGTTTCATCTCCGTTG	164
qRT-CART	TCTGGGAAGAAGAGGGACTTTCGC	TCCATTTGTGTTGCTTTGGGGTG	137
qRT-Ciclofilina	ATAATGGCACTGGTGGCAAGTC	ATTCTGGACCCAAAACGCTCC	239

## 6. Ensayos de inmunodetección de proteínas

### 6.1. Obtención de extractos de proteínas totales.

Extractos de proteínas totales fueron obtenidos a partir de cultivos primarios de tanicitos transducidos y tejido hipotalámico de rata adulta. Tanto los cultivos como los tejidos fueron lavados en PBS y homogenizados en 500  $\mu$ l de solución inhibidora de proteasas 1X (Roche) y mantenidas en hielo. Posteriormente, las muestras fueron sonicadas con una amplitud de 60 a 4°C en tres ciclos de un pulso de 10 s de duración y luego centrifugados por 10 min a 8.000 g a 4°C y el sobrenadante resultante se conservó a -80°C. La concentración de proteínas fue cuantificada por el método de Bradford (Bio-Rad Laboratories Inc.) midiendo su absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro.

## **6.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida y electrotransferencia.**

Para resolver las proteínas de interés, se utilizaron geles en gradiente de 5 a 15 % v/v de acrilamida/bisacrilamida. El gel separador fue preparado utilizando dos mezclas, una que contenía acrilamida-bisacrilamida 5 % p/v y otra 15 % p/v, además de SDS 0,4 % p/v, TEMED 0,1 % v/v y persulfato de amonio 0,02 % p/v, preparados ambos en tampón Tris-HCl 750 mM (pH 8,8). El gel espaciador fue preparado utilizando una mezcla acrilamida/bisacrilamida 5 % p/v, SDS 0,5 % p/v, TEMED 0,1 % v/v y persulfato de amonio 0,02 % p/v, preparado en tampón Tris-HCl 60 mM (pH 6,8). Como tampón de corrida se utilizó un tampón Tris-glicina [Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1 % p/v, pH 6,8]. Se sembraron 50 a 100 µg de extractos de proteínas diluidas en tampón de carga 5 X [Tris-HCl 250 mM, pH 6,8, SDS 4 % p/v, glicerol 20 % v/v, β-mercaptoetanol 1,25 M, azul de bromofenol 0,04 % p/v]. Se aplicó un voltaje de 100 V al gel montado en la cámara de electroforesis por 6 h aproximadamente. Las proteínas del gel resultante fueron transferidas a membranas de fluoruro de polivinilideno Immobilon-P®. Para esto, el gel fue puesto en contacto con la membrana en una cámara de electrotransferencia en presencia de tampón Tris-HCl 25 mM (pH 8,8), glicina 192 mM y metanol 20 % v/v. La electrotransferencia fue realizada a 80 mA durante 14-16 h a temperatura ambiente.

## **6.3. Inmunodetección de las proteínas.**

Una vez realizada la transferencia se tiñó la membrana con una solución de rojo Ponceau-S 0,2 % p/v para confirmar la correcta transferencia de las proteínas a la membrana. Posteriormente, la membrana fue lavada repetidas veces con tampón TBS-T [NaCl 150 mM, Tris 10 mM, pH 7,4, Tween-20 0,05 % v/v] por 2 h y bloqueada con leche descremada 5 % p/v en tampón TBS-T por 2 h. Luego, las membranas fueron incubadas

con los anticuerpos primarios: anti-MCT1 (1:4000), anti-MCT2 (1:1000), anti-MCT4 (1:1000), anti-GFP (1:5000) o anti-actina (1:2000), diluido en TBS-T-leche por 16 h a 4° C. Posteriormente, la membrana fue lavada con TBS-T, bloqueada con TBS-T-leche e incubada, en oscuridad, por 2 h con un segundo anticuerpo anti-pollo IgY o anti-conejo IgG conjugado con peroxidasa (HRP), diluido en TBS-T-leche. Finalmente la membrana fue lavada con TBS-T e incubada por 5 min con el reactivo quimioluminiscente Western Lightning Plus-ECL (PerkinElmer Inc, Massachusetts, USA). La quimioluminiscencia fue detectada por exposición de la membrana a una película fotográfica KODAK y posterior revelado y fijación fotográfica con líquidos reveladores y fijadores AGFA. Posteriormente, las membranas fueron reincubadas con anticuerpos para otras proteínas, previo al tratamiento con una solución comercial para reblotear membranas (Restore Plus Western blot Striping Buffer, Thermo Scientific Inc, Illinois, USA). Esta incubación se realizó por 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas fueron lavadas con TBS-Tween-20, bloqueadas con TBS-TL por 30 min e incubadas con el primer anticuerpo, tal como se describió anteriormente.

## **7. Incorporación de L-lactato en cultivos primarios de tancitos.**

Los ensayos de incorporación de L-lactato fueron realizados en cultivos primarios de tancitos transducidos. Se utilizó L-[<sup>14</sup>C(U)]lactato de sodio (>100 mCi [3.70GBq]/mmol; PerkinElmer-NEN, Boston, MA, USA). La estimación del número de células existentes en cada pocillo, se realizó en triplicado mediante la técnica exclusión de azul de tripán. Los ensayos fueron hechos por triplicado y los resultados representan el promedio de tres experimentos independientes. Los datos fueron analizados utilizando el programa Graph Pad Prism 5.0.

Para medir la incorporación de L-lactato se utilizaron cultivos primarios de tanicitos obtenidos de postnatal 1 como se describió anteriormente y se mantuvieron durante 12 días *in vitro* (DIV) en placas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> (TrueLine®), en 2 mL de medio MEM (Gibco® Invitrogen, Life Technologies) pH 7,4 suplementado con 10% SBF, glutamina 2 mM, antibióticos (penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100 µg/mL), y fungizona 2,5 µg/mL. Posteriormente, las células se traspasaron a placas de cultivo de 12 pocillos con una confluencia de 2x10<sup>5</sup> células/cm<sup>2</sup> y se mantuvieron durante 3 DIV. Luego de 15 DIV, desde la obtención del cultivo primario, las células fueron transducidas con partículas adenovirales (5x10<sup>7</sup> ifu/mL) que expresan un shRNA para β-galactosidasa (control) y adenovirus que expresan un shRNA para MCT1, MCT4 y/o MCT1-MCT4 por un periodo de 96 h. Al cabo de ese tiempo, las células se incubaron 10 min a temperatura ambiente con el tampón de incubación y posteriormente con 200 µL de L-lactato en tampón de incubación [0,1 y 25 mM y 4 µCi/mL de L-Lactato [U-<sup>14</sup>C], 320 mOsm, 4°C]. Se detuvo la captación con 500 µL de tampón de detención a 4°C y se lavó tres veces utilizando mismo tampón, luego las células fueron homogenizadas con 400 µL de tampón de lisis. El producto de lisis se llevó a viales con 2 mL de líquido de centelleo (Ecoscint, Nacional Diagnostics, Atlanta, Georgia, USA) y la radioactividad incorporada se midió utilizando un contador de centelleo líquido (Packard 1600 TR, Palo Alto, CA, USA). En los análisis de incorporación en que se utilizaron altas concentraciones de L-lactato, se realizaron controles de osmolaridad comparando la incorporación de 1mM de lactato en medio de incubación iso y hiperosmolar, no observándose diferencias en la captación de L-lactato.

## **8. Liberación de lactato en cultivos primarios de tanicitos.**

Se realizó la determinación de la liberación de lactato en cultivos primarios de tanicitos



transducidos. Para este propósito los cultivos fueron establecidos en placas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> (TrueLine®), de acuerdo al protocolo descrito anteriormente. Luego de 12 DIV las células se traspararon a placas de cultivo de 12 pocillos con una confluencia de 2x10<sup>5</sup> células/cm<sup>2</sup> y se mantuvieron durante 3 DIV. Luego de alcanzada la confluencia, los cultivos fueron transducidos con partículas adenovirales (5x10<sup>7</sup> ifu/mL) que expresan un shRNA para β-galactosidasa (control) y adenovirus que expresan un shRNA para MCT1, MCT4 y/o MCT1-MCT4 por un periodo de 96 h. Posteriormente, se evaluó la capacidad liberar lactato frente a un aumento en la concentración de glucosa, para lo cual las células fueron incubadas en HBSS [HEPES 10 mM, NaCl 135 mM, KCl 5 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,15 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 mM, Sacarosa 44 mM, pH 7,4, 320 mOsm] suplementado con 15 mM de glucosa. El medio de incubación fue colectado a los 60 min y almacenado a -80°C para su posterior cuantificación por HPLC.

El lactato presente en el buffer de incubación fue medido a través de HPLC, utilizando una columna de intercambio iónico de 300 x 7.8 mm Aminex HPX-87H (Bio-Rad Laboratories Inc.) y una fase móvil de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,02M (Merck) utilizando agua desionizada y filtrada en un poro de 0,2 μm. El flujo sobre la columna no excedió los 0,5 mL/min, utilizando la bomba cuaternaria Jasco PU-2089SPlus, y la presión en la columna fue menor a los 1000 psi. La presencia de lactato fue cuantificada a una longitud de onda de 225 nm utilizando un detector Jasco UV-2075Plus. La concentración fue establecida de acuerdo a una curva de calibración realizada por triplicado con concentraciones definidas de lactato. Los resultados fueron expresados en mg de proteína, para lo cual fue determinada la concentración de proteínas de 6 pocillos mediante el método de Bradford (Bio-Rad Laboratories Inc.). Todos los experimentos se realizaron en triplicado y los resultados representan el promedio de al menos 2 experimentos por separado,

procesados utilizando el programa Graph Pad Prism 5.0.

## **9. Determinación de la velocidad glucolítica.**

La velocidad glucolítica en tanicitos se determinó por la producción de H<sub>2</sub>O tritiada (<sup>3</sup>H<sub>2</sub>O) a partir de [3-<sup>3</sup>H]-glucosa. Para estos experimentos se utilizaron cultivos de tanicitos de 15 DIV, cultivos de astrocitos de 15 DIV y la línea celular de neuronas hipotalámicas GT1-7. Las células fueron disgregadas con Tripsina/EDTA para ser luego incubadas en tubos eppendorf sellados (tubo de reacción) que contenían el tampón Krebs-Henseleit [Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 11 mM, NaCl 122 mM, KCl 3,1 mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,4 mM, MgSO<sub>4</sub> 1,2 mM y CaCl<sub>2</sub> 1,3 mM a pH 7,4] suplementado con D-glucosa 5 mM (concentración final) y con 5 µCi de [3-<sup>3</sup>H]-glucosa (Perkin Elmer). La incubación se realizó a 37°C durante 60 min en agitación leve (50 rpm), tras los cuales las reacciones se detuvieron con HClO<sub>4</sub> al 3 % v/v. Para la cuantificación del <sup>3</sup>H<sub>2</sub>O, los tubos de reacción se depositaron dentro de viales de centelleo que contenían 1 mL de agua ultra pura, estos viales fueron equilibrados durante 48 h en agitación leve y a 37°C, luego el agua ultra pura conteniendo las moléculas de <sup>3</sup>H<sub>2</sub>O generadas en el proceso glicolítico se mezcló con 4 mL de líquido de centelleo para cuantificar la radioactividad. Como control se realizó el mismo procedimiento pero sin añadir la suspensión celular al tubo de reacción.

## **10. Construcción de plasmidios que expresan ARNs horquillas (shARN) y generación de adenovirus.**

### **10.1. Selección de las secuencias blancas para shARN.**

Para la selección de los shARN se utilizó la secuencia codificante de MCT1 (Gene bank

ID: D63834.1) y MCT4 (Gene ID: 295356). La selección de las secuencias que codifican para el shARN de MCT1 y MCT4 fue determinada mediante el programa siDESIGN Center (Dharmacon RNAi Technologies) y fueron analizadas con el programa BLAST para evitar que tuvieran homología con otros genes. Los oligonúcleotidos de ADN que contenían los sitios de restricción para *Ascl* y *Pacl* y la secuencia en horquilla, fueron enviados a sintetizar a la empresa Invitrogen y purificados por PAGE.

## **10.2. Clonamiento de los shARNs en vectores *shuttle* adenovirales.**

### **10.2.1. Contrucción del vector *shuttle* adenoviral pDC311.2-OFF-tdTomato.**

Nuestro laboratorio cuenta con un vector *shuttle* adenoviral denominado pDC311.2-OFF-EGFP, modificado del vector pDC311 (Microbix Biosystems Inc, Toronto, Ontario, Canada) y el vector pFuxH1 (donado por Dr. Pedro Zamorano) (Fig. 5A). Este vector posee un casete de expresión que contiene el promotor H1 para la síntesis de un shARN, un sitio de múltiple clonamiento, el promotor de ubiquitina humano y el gen que codifica para la proteína reportero EGFP. Con el objetivo de poder visualizar la infección de dos adenovirus diferentes, generamos un nuevo vector adenoviral que expresa el gen reportero tdTomato, contenido en el plásmido lentiviral pLVX-IRES-tdTomato (Clontech, cat: 631238), en el vector adenoviral pDC311.2-OFF-EGFP. Para ello, la forma completa del gen tdTomato, fue amplificada a partir de PCR desde el vector pLVX-IRES-tdTomato, utilizando los partidores sn: 5'-GGA TCC ATG GTG AGC AAG GGC GAG GA -3' y as: 5'-GCG GCC GCT CAC TTG TAC AGC TCG TCC A-3', los que amplifican un fragmento de 1413 pb (Fig. 5B). Posteriormente, el producto de amplificación fue clonado en el vector de clonamiento y secuenciación pCR™4Blunt-TOPO® (Life Technologies). Los

partidores sentido y antisentido, fueron diseñados conteniendo en sus extremos 5' un sitio de corte para la enzima BamHI y NotI, respectivamente (protocolo 10.2.2 descrito a continuación).

Posteriormente, 0,5 µg del vector pCR®4Blunt-TOPO-tdTomato y 0,5 µg del vector pDC311.2-OFF-EGFP, fueron digeridos por 4 h a 37°C con las enzimas de restricción BamHI (5U) y NotI (5U) en buffer NEB3 (New England Biolab), BSA 1% p/v en un volumen final de 10 µL (Fig. 5B).

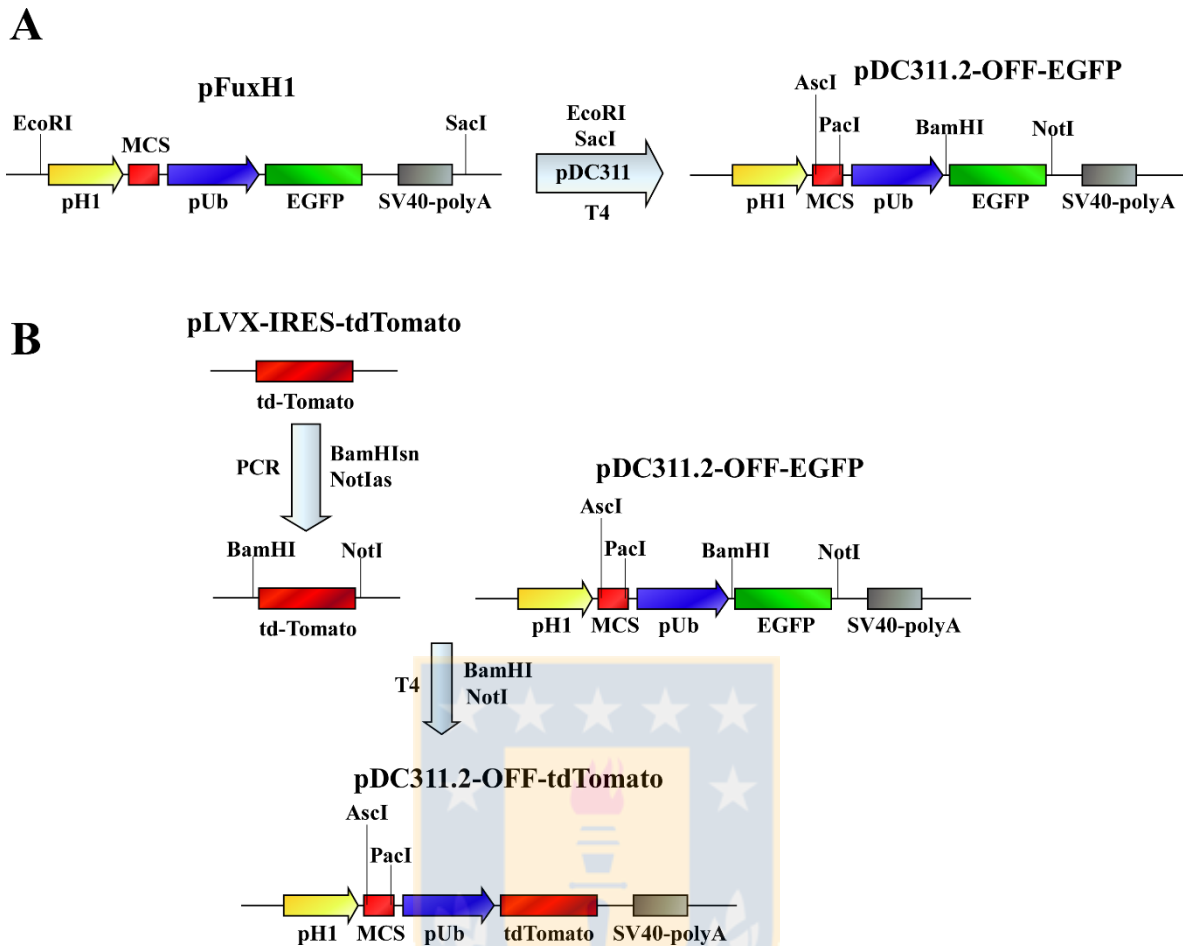
El resultado de ambos ensayos fue evaluado mediante un gel de agarosa al 1,5 %. Los productos de cada ensayo de restricción (el vector pDC311.2-OFF digerido sin reportero y el fragmento que contiene el reportero tdTomato) fueron purificados de acuerdo al protocolo descrito por el Kit StrataPrep DNA Gel Extraction Kit (Agilent Technologies) y ligados en una proporción molar vector:inserto de 1:5, utilizando 10 µL de buffer de ligación T4 y 1U de la enzima T4DNA Ligasa (Invitrogen), en un volumen de reacción de 20 µL y se incubó a 16°C por 16 h. La mezcla de ligación fue transformada en bacterias Top10 químicamente competentes (protocolo 10.2.3 descrito a continuación), y las bacterias fueron incubadas en placas de agar LB suplementadas con 100 µg/mL de ampicilina 37°C por 12-16 h. Las colonias obtenidas después de la incubación fueron aisladas y crecidas en medio LB/ampicilina (100 µg/mL). Se purificó el ADN plasmidial de los diferentes clones y se verificó el clonamiento por ensayo de restricción utilizando las enzimas BamHI y NotI, que generaron un fragmento del tamaño molecular esperado. Además un clon seleccionado fue secuenciado, ratificándose la inserción del reportero tdTomato.

### **10.2.2. TOPO-cloning.**

La reacción de PCR se llevó a cabo con la ADN polimerasa de alta fidelidad *KOD Hot Start DNA Polymerase* (Novagen Inc., Madison, WI) y se estandarizó con distintas concentraciones de templado (ADNc). Luego la mezcla de este PCR se utilizó para el clonamiento en pCR™4Blunt-TOPO®, mezclando 2 µl de producto de PCR con 1 µl de tampón salin [NaCl 200 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM] y 1 µl de vector TOPO en un volumen final de 6 µL. La mezcla fue incubada por 15 min a temperatura ambiente y luego en hielo.

### **10.2.3. Transformación bacteriana.**

Los productos ligados al vector TOPO, como los provenientes de la ligación de la digestión del vector pCR®4Blunt-TOPO-tdTomato y pDC311.2-OFF-EGFP, fueron transformados en bacterias químicamente competentes *E.coli One Shot® TOP10* (Invitrogen), agregando 3 µl la mezcla de clonamiento a un vial con 25 µL de bacterias TOP10. La mezcla fue incubada por 30 min en hielo y luego sometida a un golpe de calor de 42°C por 30 s, para luego mantener en hielo por 2 min. Se agregaron 250 µl de medio LB a cada vial y estos fueron luego incubados en agitación (225 rpm) a 37°C por 1 h. Posteriormente, se centrifugaron a 3000 r.p.m por 3 min a temperatura ambiente y el sobrenadante fue eliminado. Cada pellet fue resuspendido en 100 µl de medio LB y esparcido sobre dos placas de agar LB con kanamicina 50 mg/ml precalentadas a 37°C. Las placas se incubaron toda la noche en una estufa a 37°C.



**Figura 5. Esquema de construcción de los vectores *shuttle* adenovirales.**

**A:** Esquema de la construcción del vector pDC311.2-OFF-EGFP a partir del vector pFuxH1. Los vectores pFuxH1 y pDC311, fueron digeridos con las enzimas EcoRI y Sacl. El casete de expresión pH1-MCS-pUb-EGFP-SV40 poliA liberado por el vector pFuxH1, fue subclonado en el vector pDC311. **B:** Esquema de la construcción del vector pDC311.2-OFF-tdTomato a partir del vector pLVX-IRES-tdTomato. MCS: sitio de múltiple clonamiento, pH1: promotor H1, pUb: promotor de ubiquitina humano, SV40-poliA: señal de poliadenilación del virus SV40.

#### 10.2.4. Selección de colonias.

De las colonias obtenidas, algunas fueron seleccionadas para evaluar la presencia del inserto de interés. Para ello fueron aisladas y crecidas en medio LB/kanamicina (50 µg/mL) y luego incubados en agitación (225 rpm) a 37°C por 16 h. Se purificó el ADN plasmidial de los diferentes clones y se verificó el clonamiento por ensayo de restricción utilizando las enzimas BamHI y NotI, que generaron un fragmento del tamaño molecular esperado (1413 pb). Además un clon seleccionado fue secuenciado, ratificándose la inserción del reportero tdTomato.

#### 10.2.5. Clonamiento de los shARNs en el vector *shuttle* adenoviral (pDC311.2-OFF-EGFP y pDC311.2-OFF-tdTomato).

Los oligos inhibidores MCT1 sentido: 5'-CGC GCC GCA GCT TCT TTC TGT AAC ATT CAA GAG ATG TTA CAG AAA GAA GCT GCT TTT TTT TAA T-3' y MCT1 antisentido: 5'-TAA AAA AAA GCA GCT TCT TTC TGT AAC ATC TCT TGA ATG TTA CAG AAA GAA GCT GCG G-3'; MCT4 sentido: 5'- CGC GCC GGG ATT GGC TAC AGC GAC ATT CAA GAG ATG TCG CTG TAG CCA ATC CCT TTT TTT TAA T-3' y MCT4 antisentido: 5'- TAA AAA AAA GGG ATT GGC TAC AGC GAC ATC TCT TGA ATG TCG CTG TAG CCA ATC CCG G-3'; y los oligos controles E.coli βgal sentido: 5'-CGC GCC AAG GCC AGA CGC GAA TTA TTT CAA GAG AAT AAT TCG CGT CTG GCC TTT TTT TTT TAA T-3' y E.coli βgal antisentido: 5'- TAA AAA AAA AAG GCC AGA CGC GAA TTA TTC TCT TGA AAT AAT TCG CGT CTG GCC TTG G-3', fueron resuspendidos a una concentración de 2 mg/mL en agua estéril libre de ARNasas y ADNasas (Fermentas International Inc.), denaturados y alineados. Para ello 10 µg de cada oligo fueron calentados por 1 min a 90°C y luego incubados a temperatura ambiente por 1 h en un volumen final de 2 µL. Los

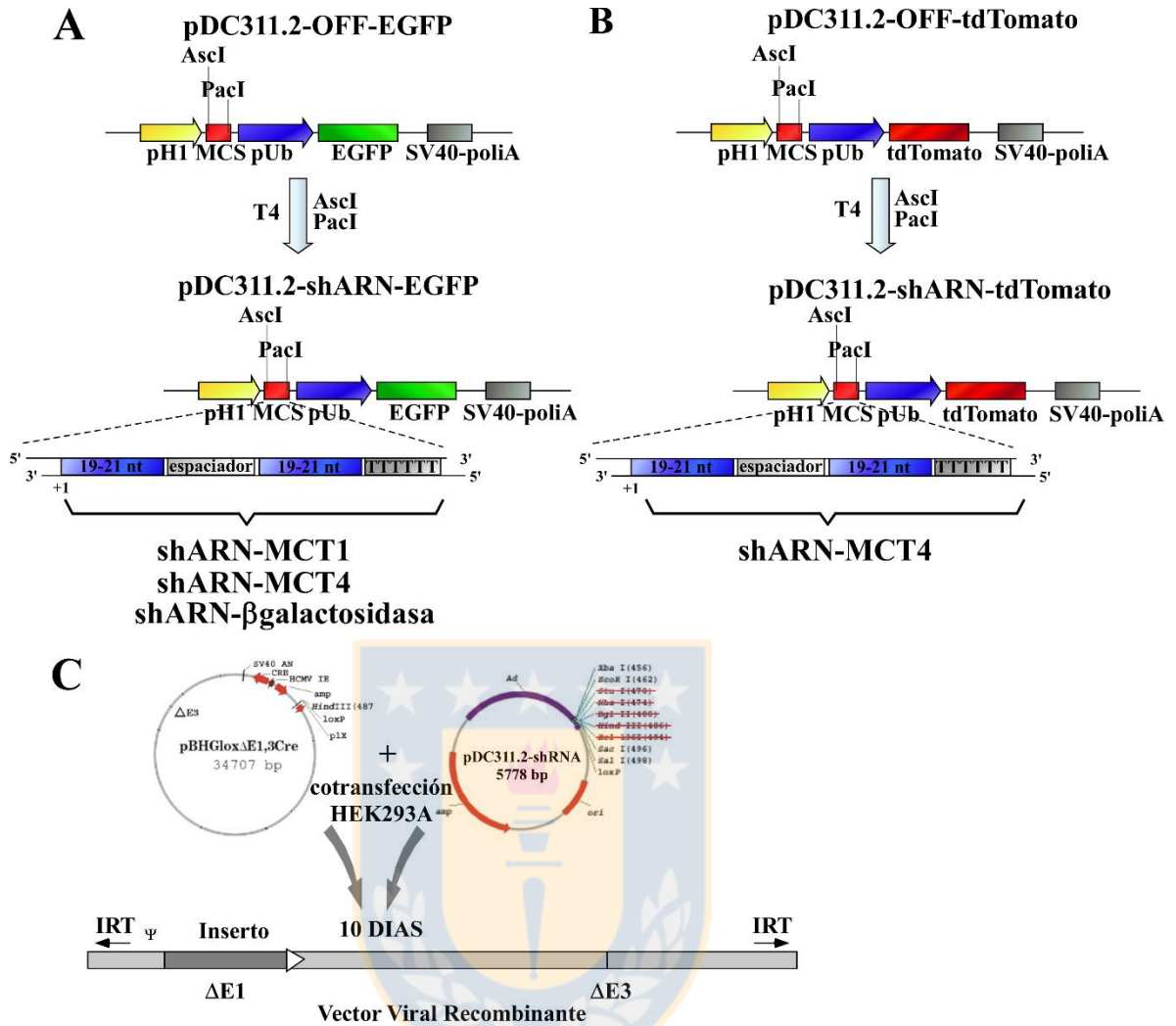
vectores pDC311.2-OFF-EGFP (1 µg) y pDC311.2-OFF-tdTomato (1 µg), fueron digeridos por 1 h a 37°C con las enzimas de restricción Ascl (1 U) y PacI (1 U) en el tampón NEB4 (New England Biolab) con 1% de BSA, en un volumen final de 10 µL. El resultado del ensayo de restricción fue evaluado mediante un gel de agarosa al 1,5 %, purificado mediante el Kit StrataPrep DNA Gel Extraction Kit (Agilent Technologies) y posteriormente cuantificado. La ligación fue realizada con 30 ng del vector pDC311.2.OFF (Fig. 6A) o pDC311.2-OFF-tdTomato (Fig. 6B), 1 µL de cada oligo alineado (control e inhibidor) y se mezclaron 10 µL de buffer de ligación T4 y 1 U de la enzima DNA Ligasa (Invitrogen), en un volumen de reacción de 20 µL y se incubó a 16°C por 16 h. Para la transformación se utilizaron bacterias TOP10 químicamente competentes (Invitrogen) y se procedió de acuerdo al protocolo descrito por el fabricante. Los clones positivos fueron seleccionados mediante doble ensayo de restricción con BsRGI y NheI. De los clones que liberaron los fragmentos correspondientes se seleccionó uno para cada oligo clonado, se crecieron en 50 mL de medio LB más ampicilina y fueron purificados mediante el StrataPrep Plasmid Miniprep Kit (Agilent Technologies), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Estos clones: pDC311.2-shMCT1-EGFP, pDC311.2-shMCT4-EGFP, pDC311.2-shβgal-EGFP (Fig. 6A) y pDC311.2-shMCT4-tdTomato (Fig. 6B), fueron enviados a secuenciar, para corroborar que presentaban el inserto correctamente clonado y sin mutaciones.

### **10.3. Generación de adenovirus.**

Los adenovirus (Adshβgal-EGFP, AdshMCT1-EGFP, AdshMCT4-EGFP y AdshMCT4-tdTomato) fueron construídos a partir de la recombinación del plasmidio pBHGloxΔE1,3Cre, que contiene la delección de los genes E1 y E3, con los vectores de



transferencia pDC311.2-shMCT1-EGFP, pDC311.2-shMCT4-EGFP, pDC311.2-shMCT4-tdTomato y pDC311.2-sh $\beta$ gal-EGFP (Fig. 6C). Para ello se sembraron  $1 \times 10^5$  células de HEK 293A (Invitrogen) en placas de 6 pocillos y se co-tranfectaron con el vector pBHGlox $\Delta$ E1,3Cre y el vector de transferencia en relaciones molares de 1:4 y 1:6, con lipofectamina 2000 (Invitrogen) cuando la células se encontraban en un 70% de confluencia, de acuerdo a instrucciones del fabricante. Las células se mantuvieron en cultivo por 10 días con adición de medio cada 3 días, al cabo de los cuales sólo una pequeña población de ellas presentaba efecto citopático. Se seleccionaron los pocillos que presentaban mayor efecto citopático y se recolectaron los adenovirus mediante lisis celular a través de golpe térmico. Para ello, las células fueron raspadas y traspasadas a un tubo de 15 mL, congeladas en nitrógeno líquido y llevadas a 37°C en baño termoregulado hasta total descongelamiento, posteriormente se mezclaron por vortex y se repitió el procedimiento 2 veces. Los restos celulares fueron eliminados mediante centrifugación a 5000 g por 5 min y el sobrenadante fue filtrado, a través de un filtro de poro de 0.45  $\mu$ m y se agregó a placas de 6 pocillos (TrueLine®) con células HEK 293A a un 70% de confluencia, para ser amplificado. Al cabo de 1 semana todas las células de los pocillos presentaban efecto citopático y los virus fueron colectados y re-amplificados en placas de 100 mm. Posteriormente, fueron titulados en células HEK 293T de acuerdo al protocolo descrito para el kit Adeno-X Rapid Titer (Clontech), utilizando la expresión del gen reportero EGFP o tdTomato. Determinamos que los virus tenían una concentración aproximada de  $2 \times 10^9$  ifu/mL y que un título de  $5 \times 10^7$  ifu/mL, mostraba una buena expresión de EGFP y/o tdTomato y no producía efectos tóxicos en las células. Luego los virus se alicuotaron y almacenaron a -80°C para los posteriores análisis.



**Figura 6. Esquema del clonamiento de los shARN y de la producción de adenovirus por recombinación en las células HEK293A.**

**A:** Esquema del clonamiento de las secuencias shARN para MCT1, MCT4 y β-galactosidasa en el vector pDC311.2-OFF-EGFP. **B:** Esquema del clonamiento de las secuencias shARN para MCT4 en el vector pDC311.2-OFF-tdTomato. **C:** Co-transfección en células HEK 293A para la generación y amplificación adenoviral.

## **11. Utilización y evaluación de los adenovirus *in vitro* e *in vivo*.**

### **11.1. Transducción *in vitro*.**

La transducción se realizó incubando las células con  $5 \times 10^7$  ifu/mL del adenovirus control o inhibidor, diluido en medio de cultivo (MEM completo) por 24 h. Posteriormente, se realizó un cambio de medio y las células fueron mantenidas por 48, 72 y 96 h post-transducción, al cabo de las cuales fueron fijadas en PFA 4% p/v y montadas para ser analizadas por microscopía confocal. Finalizados los tiempos de post-transducción, se procedió a la extracción de ARN total (a los tres tiempos de incubación) y la extracción de proteínas totales sólo a las 96 h post-transducción. Estos análisis fueron realizados solamente con adenovirus que expresan el gen reportero EGFP. Los extractos fueron utilizados para analizar la capacidad de *knock down* del adenovirus inhibidor comparándolo con el control mediante qRT-PCR y *Western blot*. La intensidad de la señal de los *immunoblot* fue cuantificada con el programa ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) y normalizada con respecto a actina. Para los análisis funcionales, que incluyen los análisis de incorporación de L-lactato radioactivo, como los ensayos de liberación de lactato, fueron realizados sobre cultivos primarios de tanicitos transducidos con los adenovirus control e inhibidor durante 96 h.

### **11.2. Transducción *in vivo*.**

Las ratas fueron anestesiadas IP con una mezcla anestésica de ketamina (90 mg/Kg), xilacina (10 mg/Kg) y Pacifor (10 mg/Kg). Posteriormente, mediante estereotaxia se implantó una guía de canula de acero inoxidable ( $\varnothing$  28 gauss; Plastics One, Roanoke, VA) al 3V basal (bregma -3.14 mm anterior-posterior, lateralidad 0.0 mm, profundidad 9.2

mm), la que fue fijada al cráneo mediante tornillos de montaje de 3/32 mm yacrílico dental. Dentro de la guía de cánula, se implantó una cánula removible ( $\varnothing$  28 gauss; Plastics One, Roanoke, VA), cuya abertura anterior se mantuvo sellada a lo largo de los experimentos, excepto para realizar las inyecciones i.c.v. Las ratas fueron alojadas individualmente luego de la cirugía y se mantuvieron en recuperación durante 120 h. Durante este periodo los animales fueron inyectados sub-epidermalmente cada 12 horas con el analgésico tramal (2 mg/Kg), para reducir el dolor e incrementar la recuperación post-operatoria. Posteriormente, los animales fueron anestesiados con isofluorano gaseoso e inyectados i.c.v. con 30  $\mu$ L de los adenovirus control (Adsh $\beta$ gal) o inhibidor (AdshMCT1 y/o AdshMCT4) a una concentración de  $2 \times 10^9$  ifu/mL, utilizando una cánula ( $\varnothing$  28 gauss) que llegó a los 9.2 mm de profundidad. Luego de 96 h post-transducción los animales fueron sometidos a diferentes pruebas experimentales, detalladas a continuación.

### **11.3. Evaluación de la expresion de neuropéptidos hipotalámicos en respuesta a la inyección i.c.v. de glucosa.**

Para los análisis de expresión de neuropéptidos en respuesta a la inyección i.c.v. de glucosa se utilizaron animales transducidos con adenovirus control (Adsh $\beta$ Gal) e inhibidor (AdshMCT1 y/o AdshMCT4). Luego de 48 h post-transducción, los animales fueron sometidos a un ayuno de 48 h hasta completar las 96 h post-transducción. Posteriormente, los animales fueron anestesiados con isofluorano gaseoso y nuevamente inyectados i.c.v., a través de la guía de cánula, con tampón salino [NaCl 128 mM, KCl 3 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,3 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,0 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,3 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 21 mM, pH 7,4 y 320 mOsm] o glucosa 50 mM preparada en el mismo tampón [320 mOsm, pH 7,4].

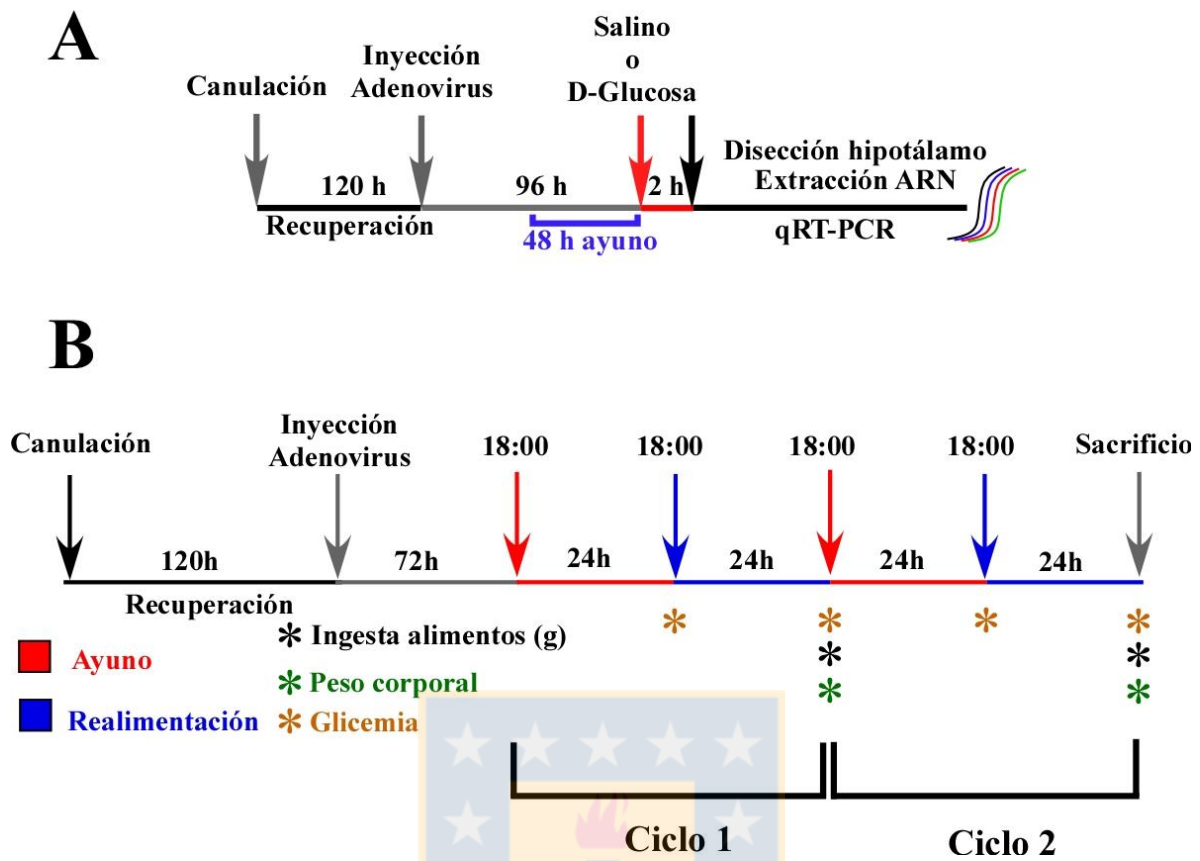
Dos horas post-estímulo los animales fueron anestesiados, y sacrificados por dislocación cervical, se disecó el hipotálamo y se extrajo ARN total para los análisis de qRT-PCR (Fig. 7A).

#### **11.4. Evaluación de la ingesta alimenticia en animales *knockdown*.**

Para la evaluación del comportamiento alimenticio, los animales fueron transducidos durante un periodo de 96 h y divididos en cuatro grupos experimentales (Adsh $\beta$ Gal, AdshMCT1, AdshMCT4 y AdshMCT1-AdshMCT4). Luego de las primeras 72 h post-transducción, los grupos experimentales fueron sometidos a dos ciclos de ayuno-realimentación (24 h de ayuno y 24h de alimentación). Posteriormente, se realizó la evaluación de las modificaciones en el comportamiento alimenticio, observando parámetros como la ingesta de alimentos, cambios en el peso corporal, frecuencia alimenticia y glicemia (Fig. 7B).

Para llevar a cabo estos experimentos, luego de la canulación, los animales fueron reubicados en jaulas de alimentación (VitalView, Mini Mitter, Philips Respironics), equipadas con un comedero que posee un sensor que detecta cada vez que el animal ingresa al comedero, al interrumpir la señal infrarroja. Estos datos fueron registrados computacionalmente, permitiendo determinar la frecuencia de alimentación en un intervalo de tiempo definido por el experimentador, y el tiempo de permanencia en el comedero. Para ello, durante las 24 h de alimentación (de cada ciclo), se les suministro 40 g de alimento para ratas, luego de los cuales se midió la cantidad ingerida durante ese periodo, la variación del peso corporal y la glicemia. La ingesta de alimentos fue expresada como g consumidos por cada 200 g de peso corporal (g/200 g peso corporal). Los eventos de alimentación registrados, fueron definidos como periodos de permanencia

dentro del comedero superiores a 5 s, separados entre si por periodos iguales o superiores a 10 min. Cuando el evento de alimentación excede los 30 min, fue considerado como dos eventos de alimentación de 15 min cada uno, y se consideró un tiempo de intervalo entre comidas de 0 min entre ellos (Vaughan et al., 2005; Vaughan and Rowland, 2003). Esta información nos permitió definir los siguientes parámetros de alimentación: Intervalo entre comidas (min), frecuencia de alimentación (número), frecuencia de alimentación acumulada (número), tamaño promedio de la comida (g/comida), duración promedio de la comida (g/min) y velocidad de alimentación (mg/min). El intervalo entre comidas es definido como el tiempo que existen entre el término de un evento de alimentación y el inicio del siguiente. La frecuencia de alimentación acumulada es definida como el número de eventos de alimentación en 24 h. El tamaño promedio de la comida fué definido como la ingesta total de alimentos (g) dividido por la frecuencia de alimentación (número). La duración promedio de la comida fué calculada dividiendo la duración total de los eventos de alimentación (min) por la frecuencia de alimentación (número) y la velocidad de alimentación, como la ingesta total de alimentos (mg) por la duración total de los eventos de alimentación (min).



**Figura 7. Procedimiento experimental diseñado para los estudios *in vivo*.**

**A:** Diseño experimental para la evaluación de la expresión de neuropéptidos orexígenos y anorexígenos mediante qRT-PCR. **B:** Diseño experimental para la evaluación de la ingesta alimenticia en animales inhibidos para MCT1, MCT4 y/o MCT1 y MCT4.

## **12. Determinación de la glicemia**

Se evaluó la concentración de glucosa en sangre al finalizar los periodos de ayuno y los periodos de alimentación, en animales control e inhibidos. A través de una punción de sangre de la vena de la cola. La glicemia fue determinada con el glucómetro Accu-Chek Go (Roche).

## **13. Análisis estadístico**

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



### III RESULTADOS

#### **Capítulo 1. Definir si la inhibición de MCT1 y MCT4 disminuye el transporte de lactato en tanicitos *in vitro*.**

Diversos hallazgos experimentales, han permitido postular que variaciones en la concentración de glucosa, podrían ser detectadas a través de un mecanismo de interacción entre las neuronas hipotalámicas y la glía circundante (Ainscow et al., 2002; Garcia et al., 2003; Garcia et al., 2001). Este modelo propone que, la glía detecta variaciones en los niveles de glucosa, transduciendo esta señal a los núcleos neuronales adyacentes, utilizando como mensajero intercelular el lactato. Hemos demostrado la presencia de MCT1 y MCT4, transportadores asociados a la liberación de monocarboxilatos, en cuerpos y procesos de tanicitos hipotalámicos (Cortes-Campos et al., 2011).

Para determinar *in vitro* si los monocarboxilatos participan en este mecanismo, modulando el comportamiento alimenticio, inhibimos la expresión de MCT1 y MCT4 en tanicitos en cultivo, utilizando adenovirus que expresan un shARN para cada uno de estos transportadores y evaluamos si esta inhibición altera la funcionalidad de estos transportadores.

#### **1.1. Los cultivos primarios de tanicitos conservan la expresión de MCT1 y MCT4.**

En una primera etapa caracterizamos los cultivos primarios de tanicitos a través de RT-PCR para diversos marcadores reportados en literatura (Cortes-Campos et al., 2011; Garcia et al., 2003; Garcia et al., 2001) y comparamos la expresión de estos con cultivos

primarios de astrocitos corticales. Nuestros resultados muestran que los tanicitos en cultivo expresan los ARNm de MCT1, MCT4, GLUT1, GLUT2 y GK, a diferencia de los cultivos primarios de astrocitos, en los cuales no detectamos la presencia de GLUT2 y GK en las condiciones experimentales establecidas (Fig. 8A).

A través de *Western blot* analizamos la expresión de MCT1 y MCT4 en cultivos de tanicitos, demostrando que los tanicitos expresan ambos transportadores (Fig. 8B, carril 2), como ha sido reportado tanto *in vitro* como *in situ* (Cortes-Campos et al., 2011). Los patrones de migración electroforéticas observados, tanto para RT-PCR como *Western blot*, son similares a los patrones de migración observados en los controles positivos utilizados para cada transportador, demostrando especificidad de los partidores y los anticuerpos utilizados (Fig. 8A, B, carril 1).

Posteriormente, los cultivos primarios de tanicitos fueron analizados mediante inmunocitoquímica, demostrando que el 100% de las células en cultivo son positivos para la proteína de filamentos intermedios vimentina (Fig. 8C), la fosfoproteína regulada por dopamina y AMPc (DARPP-32) (Fig. 8D), la subunidad Kir6.1 de los canales de potasio sensibles a ATP (Fig. 8E), conexina 43 (Cx43) (Fig. 8F), glucoquinasa (GK) (Fig. 8G), proteínas localizadas en estas células gliales *in situ* e *in vitro* (Garcia et al., 2003; Millan et al., 2010; Orellana et al., 2012; Salgado et al., 2014). Además, mostraron una escasa reactividad a GFAP, cercana al 5% (Fig. 8H), confirmando que los cultivos primarios estaban enriquecidos en tanicitos hipotalámicos. También evaluamos mediante inmunocitoquímica la localización celular de MCT1 (Fig. 8I-J) y MCT4 (Fig. 8K-L), detectándolos principalmente en compartimentos intracelulares y en la membrana plasmática de los tanicitos. Estos resultados confirman que los cultivos de tanicitos mantienen la expresión de MCT1 y MCT4.

## **1.2. Los cultivos primarios de tanicitos poseen una elevada velocidad glicolítica y capacidad de liberar lactato.**

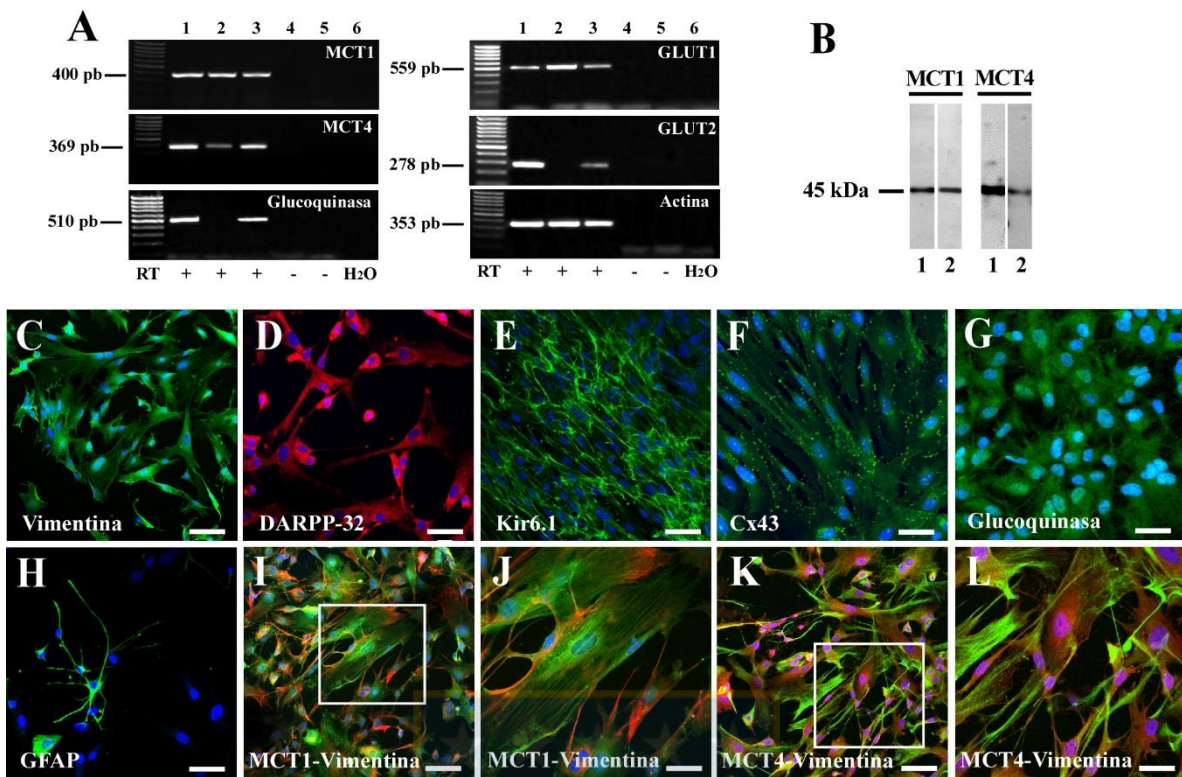
Posteriormente, evaluamos si los cultivos primarios de tanicitos son capaces de metabolizar eficientemente glucosa y liberar lactato en respuesta al incremento extracelular de glucosa. Para realizar el análisis funcional sobre la capacidad de metabolizar glucosa, se determinó la velocidad glicolítica de los cultivos primarios de tanicitos, al someter los cultivos primarios a una incubación de 1 h de duración con 5 mM glucosa tritiada. Esta determinación se realizó de forma comparativa, utilizando cultivos primarios de astrocitos corticales y la línea celular de neuronas hipotalámicas GT1-7 (Liposits et al., 1991; Mellon et al., 1990; Wetsel et al., 1991; Wetsel et al., 1992). Los datos corresponden a las c.p.m. detectadas del  $^3\text{H}_2\text{O}$  liberada por las células, en respuesta a la metabolización de 5 mM [3- $^3\text{H}$ ]-glucosa durante 60 min. Esto fue calculado como nmoles de  $^3\text{H}_2\text{O}$  liberada por millón de células y expresado en porcentaje relativo a la velocidad glicolítica detectada en cultivos de tanicitos.

Los resultados demuestran que la velocidad glicolítica en tanicitos es 27 veces mayor a la detectada en neuronas GT1-7 (Fig. 9A, barra gris) y 9 veces mayor a la velocidad glicolítica observada en los cultivos primarios de astrocitos (Fig. 9A, barra blanca). La velocidad glicolítica fue inhibida al utilizar 500  $\mu\text{M}$  aloxano (Fig. 9B, barra gris) o 1 mM iodoacetato (Fig. 9B, barra blanca), inhibidores de glucoquinasa y glucosa-3-fosfato deshidrogenasa, respectivamente.

Posteriormente, mediante HPLC, determinamos si los cultivos primarios de tanicitos liberan lactato en respuesta a glucosa. La cuantificación de lactato se realizó a 15, 30 y 60 min en células estimuladas con 5 mM de glucosa (Fig. 9C). A los 15 min de incubación

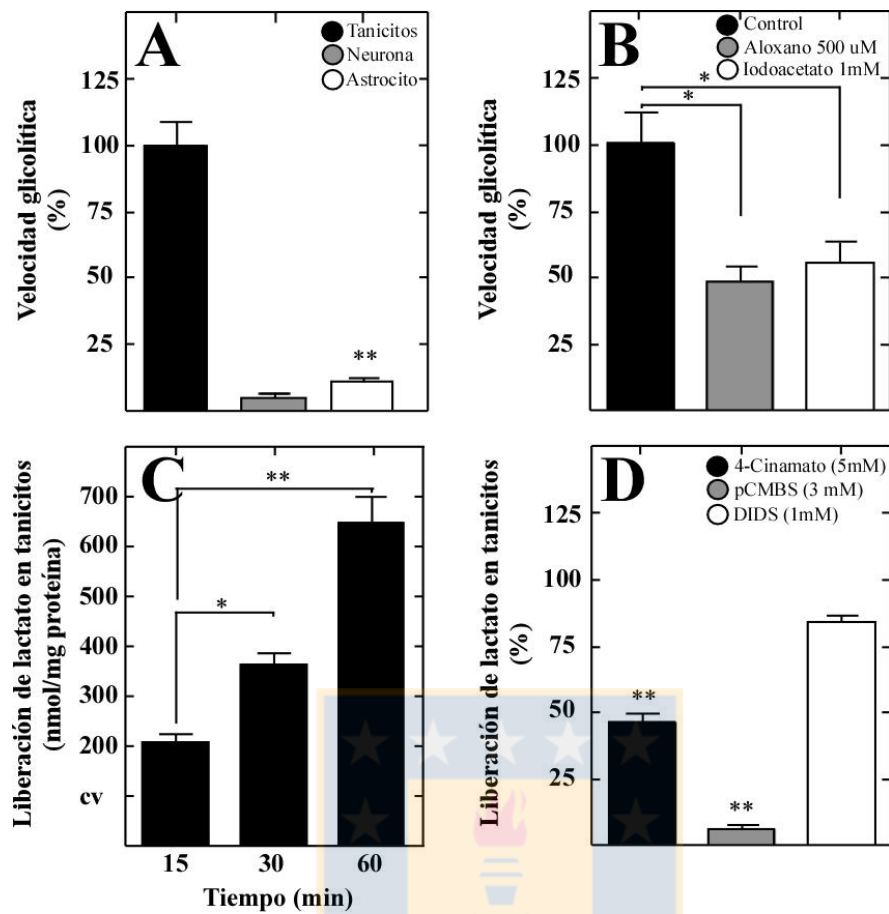
los tanicitos liberaron 150 nmol/mg proteína de lactato, incrementando significativamente a los 30 y 60 min (Fig. 9C). Estos resultados demuestran que los tanicitos liberan lactato en respuesta a glucosa. Para determinar si los MCTs participan en este proceso, tratamos a las células con inhibidores de los MCTs y evaluamos la liberación de lactato en presencia de 5 mM de glucosa a los 30 min de incubación (Fig. 9D). Los resultados muestran que la salida de lactato se reduce significativamente en presencia de 5 mM de 4-CIN (Fig. 9D, barra negra) o 3 mM de pCMBS (Fig. 9D, barra gris), pero sólo se genera inhibición del 25% cuando las células son tratadas con 1 mM DIDS (Fig. 9D, barra blanca), demostrando que el lactato es liberado desde los tanicitos a través de los MCTs.





**Figura 8. Caracterización de cultivos primarios de tanicitos obtenidos desde hipotálamo de rata.**

**A:** RT-PCR comparativo para marcadores gliales. Carril 1, hígado de rata; 2, astrocitos de rata; 3, tanicitos de rata; 4, RT negativo de astrocitos; 5, RT negativo de tanicitos; 6, control negativo de agua. **B:** *Western blot* para la expresión de MCT1. Extracto de proteínas de riñón de rata; 2, extracto de proteína de cultivos primarios de tanicitos. *Western blot* para la expresión de MCT4. Carril 1, Extracto de proteínas de músculo estriado esquelético de rata; 2, extracto de proteína de cultivos primarios de tanicitos. Se detectó la presencia de MCT1 y MCT4 (45kDa). **C-L:** Inmunocitoquímica en cultivos primarios de tanicitos, obtenidos mediante microscopía confocal utilizando anti-vimentina (C, I-L, verde), DARPP-32 (D, rojo), Kir6.1 (E, verde), Cx43 (F, verde), glucoquinasa (G, verde), GFAP (H, verde), MCT1 (I-J, rojo) y MCT4 (K-L, rojo). En todos los paneles se observa tinción nuclear con TOPRO-3 (azul). Tamaño barra 50  $\mu\text{m}$  (C-I, K); 25  $\mu\text{m}$  (J y L).



**Figura 9. Análisis de la velocidad glicolítica y liberación de lactato en tanicitos.**

**A:** Comparación de la velocidad glicolítica de cultivos primarios de tanicitos, la línea celular de neuronas hipotalámicas GT1-7 y cultivo primarios de astrocitos corticales en presencia de 5mM de glucosa tritiada. **B:** Análisis de la velocidad glicolítica en cultivos primarios de tanicitos frente a los inhibidores de la glicólisis aloxano y iodoacetato. **C:** Liberación de lactato en el tiempo, en respuesta a 5mM de glucosa en cultivos primarios de tanicitos. **D:** Liberación de lactato en tanicitos en respuesta a 5 mM de glucosa en presencia de inhibidores de MCTs preincubados por 15 min. Los datos fueron expresados en porcentaje de acuerdo a la velocidad promedio alcanzada por tanicitos. Los resultados representan el promedio  $\pm$  DE de tres experimentos independientes con un N:5.  $p < 0,05^*$ ;  $p < 0,01^{**}$  (t-test, no pareado).

### **1.3. Los adenovirus pueden ser titulados gracias a la presencia del gen reportero.**

Previamente, nuestro laboratorio generó y utilizó un adenovirus que expresa un shARN para MCT1 para inhibir la expresión y función *in vitro* de MCT1 y evaluar los efectos producidos por su inhibición *in vivo*, específicamente sobre la expresión de neuropéptidos en respuesta a la inducción de incrementos de la glucorraquia (Tesis doctoral Cristian Cortes-Campos, 2010).

En esta tesis, se diseñó y clonó el shARN para MCT4, en el vector bicistrónico pDC311.2-OFF-EGFP (presente en nuestro laboratorio) y en el vector pDC311.2-OFF-tdTomato generado en esta tesis. Estos plásmidos permiten la expresión de un shARN (short hairpin ARN) bajo el comando del promotor H1 y del gen reportero EGFP o tdTomato bajo el control del promotor de ubiquina humano. A través de esta aproximación se generaron 2 adenovirus; AdshMCT4-EGFP y AdshMCT4-tdTomato.

Inicialmente se corroboró la correcta construcción y funcionamiento de los vectores necesarios para generar los adenovirus, mediante secuenciación y transfección en células HEK 293T. Luego de 48 h post transfección, el gen reportero EGFP o tdTomato era expresado en las células transfectadas con el vector control pDC311.2- $\beta$ gal-EGFP (sh $\beta$ gal) e inhibidores pDC311.2-MCT1-EGFP (shMCT1-EGFP), pDC311.2-MCT4-EGFP (shMCT4-EGFP) y pDC311.2-MCT4-tdTomato (shMCT4-Tomato) (datos no mostrado), indicando el correcto funcionamiento de éstos.

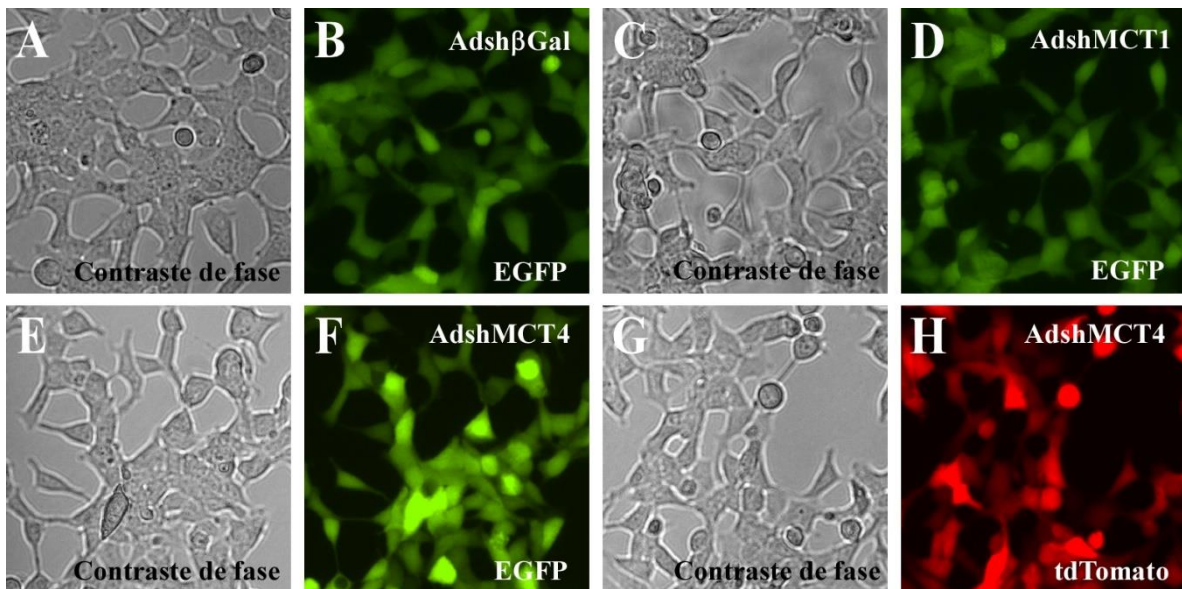
Posteriormente, se generaron partículas adenovirales, al co-transfectar los vectores pDC311.2-MCT4-EGFP y pDC311.2-MCT4-tdTomato con el vector genómico viral pBHGlox $\Delta$ E1,3Cre, en células HEK 293A, evidenciado por la expresión de EGFP o tdTomato para los diferentes adenovirus utilizados: Adsh $\beta$ Gal-EGFP (Fig. 10A-B) AdshMCT1-EGFP (Fig. 10C-D), AdshMCT4-EGFP (Fig. 10E-F) y AdshMCT4-tdTomato



(Fig. 10G-H). Las partículas adenovirales fueron cuantificadas y se evaluó el título óptimo para los ensayos de inhibición en células HEK 293T, considerando tanto la toxicidad de los virus sobre la viabilidad celular, como el porcentaje de infección adenoviral al evaluar la expresión del gen reportero. De esta forma, determinamos que un título de  $5 \times 10^7$  ifu/mL genera una transducción cercana al 100% y no produce efectos tóxicos en la células (datos no mostrados). Con estos datos abordamos el estudio del *knockdown* de MCT1 y/o MCT4 en cultivos primarios de tanicitos hipotalámicos.







**Figura 10. Producción de partículas adenovirales en células HEK293A para la expresión de sh $\beta$ gal, shMCT1 y shMCT4.**

**A-B:** Células HEK 293A transducidas con adenovirus para inhibir la  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli* (Adsh $\beta$ Gal-EGFP). **C-D:** Células HEK293A transducidas con el adenovirus para inhibir MCT1 (AdshMCT1-EGFP). **E-F:** Células HEK 293A transducidas con el adenovirus para inhibir MCT4 (AdshMCT4-EGFP). **G-H:** Células HEK 293A transducidas con el adenovirus para inhibir MCT4 (AdshMCT4-tdTomato). La expresión de EGFP es detectable en todas las células observadas, similar a lo observado con tdTomato, durante las primeras 48 h de transducción.

#### **1.4. Inhibición de la expresión endógena de MCT1 en tanicitos utilizando vectores adenovirales.**

El adenovirus previamente generado en nuestro laboratorio (AdshMCT1), fue utilizado para inhibir la expresión de MCT1 en cultivos primarios de tanicitos, evaluar la expresión de EGFP y el tiempo óptimo para realizar las determinaciones de *knockdown* en cultivos confluentes; en esta condición las células no se dividen y mantienen los genes episomales por mayor tiempo. Determinamos que la transducción adenoviral ocurre eficientemente a las 48 h y 72 h post-transducción, tanto para Adsh $\beta$ gal (Fig. 11A y B) como para AdshMCT1 (Fig. 11D y E), observando a las 48 h una expresión de EGFP de un 81,4%  $\pm$  7,4 para Adsh $\beta$ Gal y un 78,4 %  $\pm$  6,8 para AdshMCT1 y a las 72 h un 78,8 %  $\pm$  5,7 para Adsh $\beta$ gal y un 84,6 %  $\pm$  4,8 para AdshMCT1 (Fig. 11G). Sin embargo, la mayor cantidad de células reactivas a EGFP se observa a las 96 h post-transducción (Fig. 11 C y F) alcanzando un 88,9 %  $\pm$  3,3 para Adsh $\beta$ gal (Fig. 11 G, barra blanca) y un 91,7 %  $\pm$  6,3 para AdshMCT1 (Fig. 11 G, barra negra). Posteriormente analizamos la sobrevivencia celular a las 48, 72 y 96 h post-transducción, observando más de un 90% de viabilidad en todos los tiempos analizados (Fig. 11H).

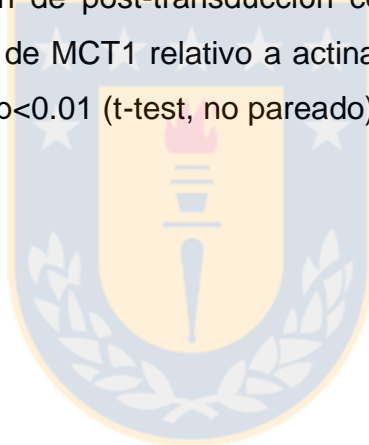
Mediante qRT-PCR, evaluamos la efectividad del AdshMCT1 para inhibir la expresión endógena de su gen blanco. Observamos que a las 48, 72 y 96 h post-transducción se redujo significativamente (aprox. 70% a 75%) la expresión del ARNm de MCT1 (Fig. 11I, barras negras), al comparar con el control de inhibición Adsh $\beta$ Gal (Fig. 11I, barras blancas). El análisis por *Western blot*, nos permitió observar una disminución significativa de los niveles proteicos luego de 96 h post-transducción, utilizando como control de transducción a EGFP y como control de carga a actina (Fig. 11J). Al comparar los extractos obtenidos de células tratadas con el adenovirus control (Fig. 11J, carriles 1-3)

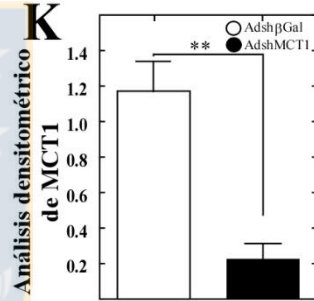
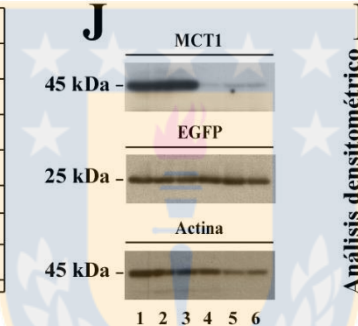
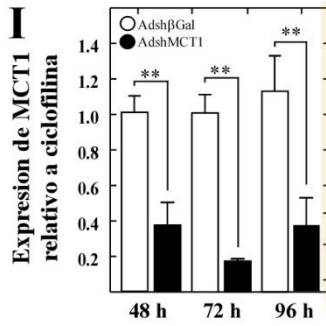
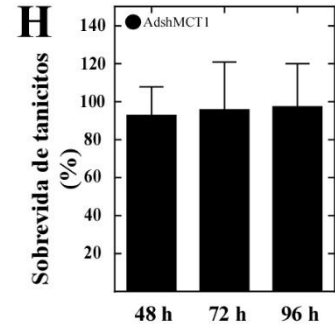
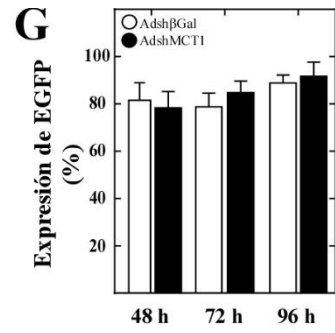
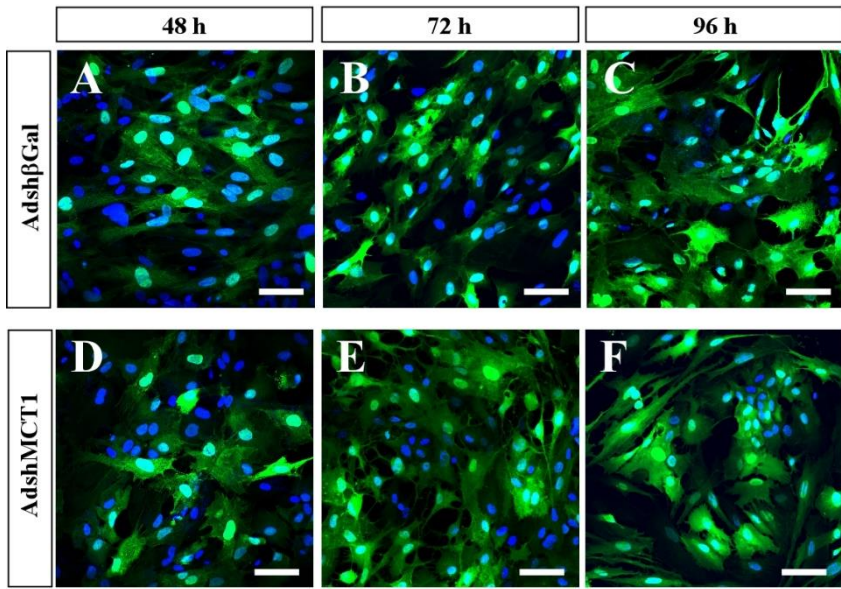
versus el adenovirus inhibidor (Fig. 11J, carriles 4-6), observamos una disminución de la intensidad de la banda de MCT1 en estos últimos, efecto que no se observó en la expresión de actina o EGFP, indicando una inhibición específica sobre MCT1 de  $80 \pm 7.4\%$ , respecto a actina y comparado con los niveles de expresión alcanzados con tanicitos transducidos con Adsh $\beta$ Gal (Fig. 11K).



**Figura 11. Knockdown de MCT1 en cultivos primarios de tanicitos hipotalámicos.**

**A-F:** Expresión temporal de EGFP en cultivos de tanicitos transducidos por 48, 72 y 96 h con Adsh $\beta$ Gal (A-C) o AdshMCT1 (D-F). Los núcleos fueron teñidos con la tinción nuclear TOPRO-3 (azul). **G:** Cuantificación de la expresión de EGFP normalizado al número total de células en cultivos de tanicitos transducidos con Adsh $\beta$ Gal (barras blancas) o AdshMCT1 (barras negras) a 48, 72 y 96 h post-transducción. **H:** Cuantificación de la sobrevivencia celular de cultivos de tanicitos transducidos con AdshMCT1 por 48, 72 and 96 h, expresado en porcentaje, en comparación a la sobrevivencia celular de cultivos de tanicitos transducidos con Adsh $\beta$ Gal. **I:** Análisis de qRT-PCR para MCT1 en tanicitos transducidos con Adsh $\beta$ Gal (barras blancas) o AdshMCT1 (barras negras) por 48, 72 and 96 h. **J:** Análisis de *Western blot* para MCT1, EGFP y Actina. Carril 1-3: Extractos totales de proteínas luego de 96 h con post-transducción con Adsh $\beta$ Gal; carril 4-6: extractos totales de proteínas luego de 96 h de post-transducción con AdshMCT1. **K:** Análisis semi-cuantitativo de la expresión de MCT1 relativo a actina. EGFP: Control de transducción. Actina: Control de carga. \*\*  $p < 0.01$  (t-test, no pareado). Tamaño de barra: 25  $\mu$ m.





### **1.5. Inhibición de la expresión endógena de MCT4 en tanicitos utilizando AdshMCT4 EGFP y AdshMCT4-tdTomato.**

Para evaluar la capacidad *knockdown* del shARN para el ARNm de MCT4, generamos dos adenovirus, uno que expresa el shARN para MCT4 y el gen reportero tdTomato, y un segundo adenovirus que expresa el mismo shARN para MCT4 y el gen reportero EGFP. La utilización de un gen reportero diferente al utilizado por el AdshMCT1 (EGFP), nos permitió evaluar *in vitro*, la transducción simultánea de ambos adenovirus. El adenovirus AdshMCT4-EGFP, fue utilizado en estudios *in vivo* (capítulo 2 y 3), ya que expresa el mismo gen reportero utilizado en la condición control (Adsh $\beta$ Gal-EGFP).

El análisis de la expresión de las proteínas reporteras EGFP y tdTomato en las células en cultivo transducidas, presentó una elevada capacidad de transducción viral al utilizar un título de  $5 \times 10^7$  ifu/mL. Luego de 48, 72 y 96 h de post-transducción, observamos que la mayoría de las células transducidas con el AdshMCT4-EGFP expresan la proteína EGFP (Fig. 12A-C), alcanzando un  $86,6\% \pm 3,1$  a las 48 h, un  $94,1\% \pm 1,7$  a las 72 h y un  $85,6\% \pm 5,2$  a las 96 h post-transducción (Fig. 12G, barras negras). No se observaron diferencias con el control Adsh $\beta$ Gal (Fig. 12G, barras blancas). La expresión de tdTomato luego de la transducción con el AdshMCT4-tdTomato (Fig. 12D-F), fue similar a la observada con el AdshMCT4-EGFP a los diversos tiempos utilizados, alcanzando un  $92,1\% \pm 2,3$  a las 48 h, un  $87,4\% \pm 1,4$  a las 72 h y un  $91,8\% \pm 1,4$  a las 96 h post-transducción (Fig. 12I, barras negras), no observándose diferencias significativas con el control Adsh $\beta$ Gal (Fig. 12I, barras blancas).

El análisis de sobrevivencia celular a los diferentes tiempos analizados (48, 72 y 96 h post-transducción), tampoco arrojó diferencias significativas entre el AdshMCT4-EGFP o el AdshMCT4-tdTomato con el control Adsh $\beta$ Gal, observándose en todos los casos sobre

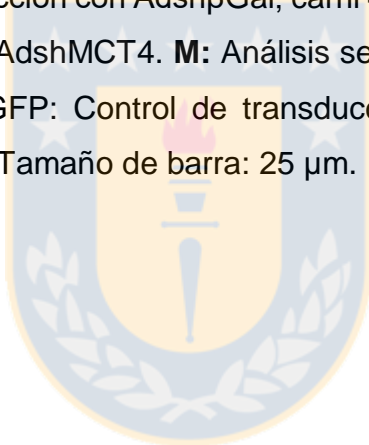
un 95% de células vivas, para ambos adenovirus (Fig. 12H y J).

Posteriormente, evaluamos la generación del *knockdown* de MCT4 a través de qRT-PCR y *Western blot*. Se observó una disminución significativa de la expresión del ARNm de MCT4, logrando a los diferentes tiempos analizados (48, 72 y 96 h post-transducción) sobre un 80% de inhibición (Fig. 12K, barras negras), comparado con células transducidas con Adsh $\beta$ Gal (Fig. 12K, barras blancas). A través de *Western blot*, determinamos que el *knockdown* de MCT4, también se refleja en una disminución significativa de los niveles proteicos luego de 96 h post-transducción, utilizando como control de transducción a EGFP y como control de carga a actina (Fig. 12L). El análisis densitométrico de las intensidades de bandas, indica que existe una inhibición de un  $82 \pm 5,7\%$  (Fig. 12M, barra negra) en la expresión proteica de MCT4, al comparar la intensidad de bandas obtenidas con los extractos proteicos de células tratadas con el Adsh $\beta$ Gal (Fig. 12L, carriles 1-3) y las células tratadas con el AdshMCT4 (Fig. 12L, carriles 4-6).

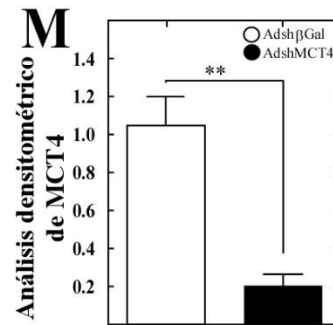
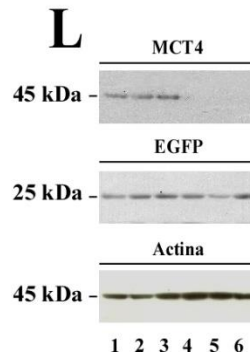
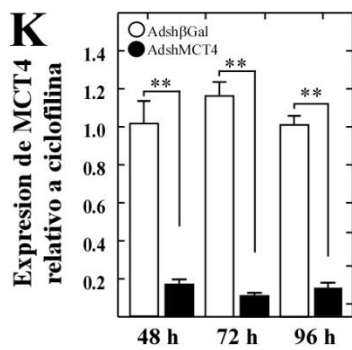
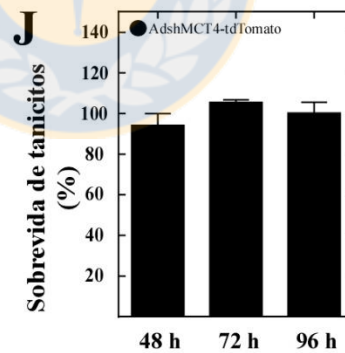
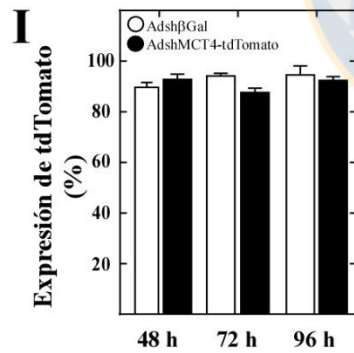
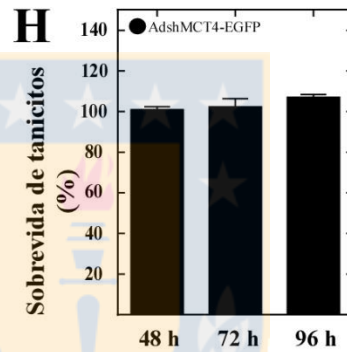
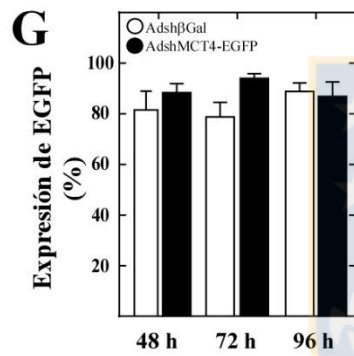
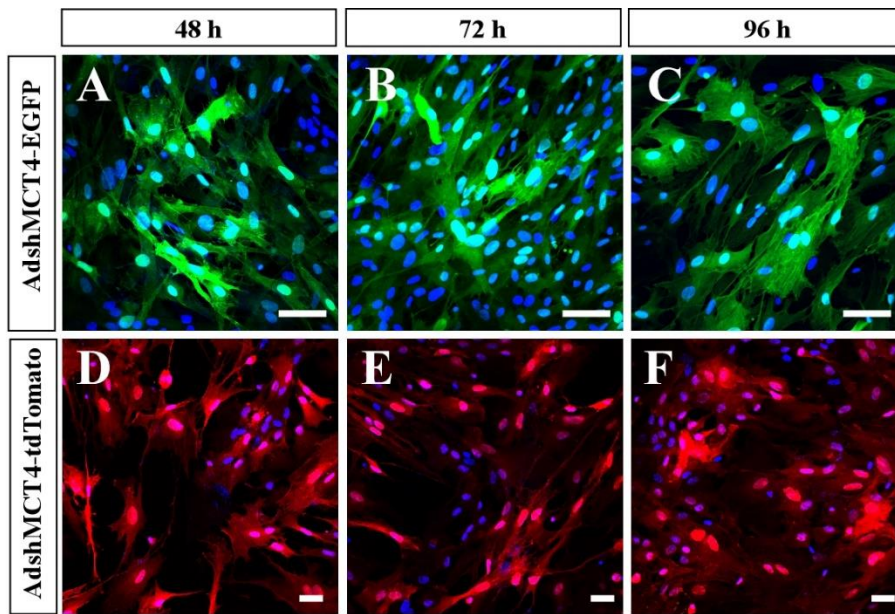


**Figura 12. Knockdown de MCT4 en cultivos primarios de tanicitos hipotalámicos.**

**A-F:** Expresión temporal de EGFP en cultivos de tanicitos transducidos por 48, 72 y 96 h con AdshMCT4-EGFP (A-C) o AdshMCT4-tdTomato (D-F). Los núcleos fueron teñidos con la tinción nuclear TOPRO-3 (azul). **G, I:** Cuantificación de la expresión de EGFP (G) o tdTomato (I) normalizado al número total de células en cultivos de tanicitos transducidos con Adsh $\beta$ Gal (barras blancas) o AdshMCT4 (barras negras) a 48, 72 y 96 h post-transducción. **H, J:** Cuantificación de la sobrevivida celular de cultivos de tanicitos transducidos con AdshMCT4-EGFP (H) o AdshMCT4-tdTomato (J) por 48, 72 and 96 h, expresado en porcentaje, en comparación a la sobrevivida celular de cultivos de tanicitos transducidos con Adsh $\beta$ Gal. **K:** Análisis de qRT-PCR para MCT4 en tanicitos transducidos con Adsh $\beta$ Gal (barras blancas) o AdshMCT4 (barras negras) por 48, 72 and 96 h. **L:** *Western blot* para MCT4, EGFP y actina. Carril 1-3: Extractos totales de proteínas, 96 h post-transducción con Adsh $\beta$ Gal; carril 4-6: extractos totales de proteínas, 96 h post-transducción con AdshMCT4. **M:** Análisis semi-cuantitativo de la expresión de MCT4 relativo a actina. EGFP: Control de transducción. Actina: control de carga. \*\*  $p < 0.01$  (t-test, no pareado). Tamaño de barra: 25  $\mu$ m.







## 1.6. Doble *knockdown* para la expresión MCT1 y MCT4 en tanicitos utilizando AdshMCT1-EGFP y AdshMCT4-tdTomato.

Comprobada la eficiencia en la capacidad *knockdown* del shARN para MCT4, realizamos la doble inhibición de la expresión de MCT1 y MCT4 en cultivos primarios de tanicitos. Para realizar el doble *knockdown*, utilizamos el AdshMCT1-EGFP y el AdshMCT4-tdTomato, adenovirus que expresan diferentes genes reporteros, para detectar la transducción de ambos adenovirus *in vitro*. La concentración final de adenovirus utilizado fue  $5 \times 10^7$  ifu/mL.

Se evaluó la transducción de los reporteros EGFP y tdTomato durante 96 h post-transducción (Fig. 13A-C), observando una elevada eficiencia de transducción, que alcanzó el  $97,6\% \pm 2,2$  en las primeras 48 h, un  $91,5\% \pm 4,4$  a las 72 h y un  $93,5\% \pm 5,3$  a las 96 h post-transducción (Fig. 13D, barras negras), sin diferencias significativas con el control Adsh $\beta$ Gal (Fig. 13D, barras blancas). No se observaron diferencias significativas en la sobrevivencia celular a los diferentes tiempos analizados (48, 72 y 96 h post-transducción), en comparación con la viabilidad observada en células transducidas con el adenovirus control Adsh $\beta$ Gal, alcanzando una viabilidad cercana al 100% (Fig. 13E).

El análisis de qRT-PCR para la expresión de MCT1 y MCT4, demostró una significativa reducción en los niveles de sus ARNm a los diferentes tiempos analizados (48, 72 y 96 h post-transducción), produciendo un *knockdown* cercano al 70% para ambos transportadores (Fig. 13F-G). En paralelo, observamos que el *knockdown* de MCT1 y MCT4, luego de 96 h post-transducción, es capaz de reducir los niveles de expresión proteica, tanto para MCT1 (Fig. 13H, carriles 4-6) como para MCT4 (Fig. 13H, carriles 4-6) en comparación con los extractos proteicos de células transducidas con Adsh $\beta$ Gal (Fig.

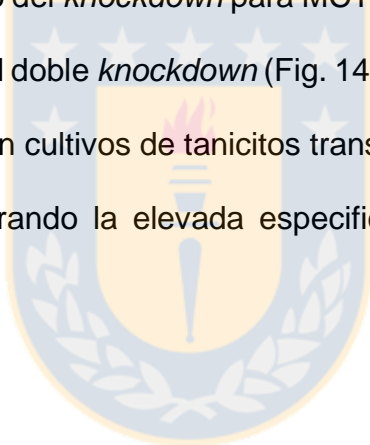
13H, carriles 1-3). El análisis densitométrico para las bandas de MCT1, muestra una inhibición de un  $61,1 \pm 9,7\%$  (Fig. 13I, barra negra) en la expresión proteica, en comparación con los extractos proteicos de células tratadas con el Adsh $\beta$ Gal (Fig. 13I, barra blanca), mientras que el *knockdown* de MCT4 produce una reducción de un  $53,3 \pm 0,8\%$  (Fig. 13J, barra negra), en comparación con los extractos proteicos de células tratadas con el Adsh $\beta$ Gal (Fig. 13J, barra blanca).

### **1.7 El *knockdown in vitro* de MCT1 y MCT4 disminuye la expresión del ARNm de MCT2.**

Previamente, en la tesis doctoral del Dr. Christian Cortes-Campos realizada en nuestro laboratorio, se demostró que los cultivos primarios de tanicitos inducen la expresión del transportador neuronal MCT2 (Tesis doctoral 2010), ya que *in situ*, la expresión se encuentra restringida a neuronas hipotalámicas y no se encuentra presente en tanicitos (Cortes-Campos et al., 2013). *In vitro*, MCT2 es detectable tanto a nivel de ARNm como a nivel proteico, observación que también es inducida en cultivos primarios de astrocitos corticales de rata (Tesis de magíster Roberto Elizondo 2010). Con estos antecedentes, decidimos evaluar la especificidad del *knockdown* de MCT1 y/o MCT4 sobre la expresión de MCT2. En una primera instancia, evaluamos si nuestros cultivos primarios inducen la expresión de MCT2. Mediante RT-PCR, *Western blot* e inmunocitoquímica, demostramos la inhibición de la expresión de MCT2 en cultivos primarios de tanicitos. Utilizando partidores específicos para MCT2, detectamos una banda de 416 pb, correspondiente al tamaño esperado de amplificación para MCT2 (Fig. 14A, carril 3) como de proteína (Fig. 14B, carril 2). El patrón de migración electroforético alcanzado en las muestras de tanicitos, es similar a los patrones de migración observados en los controles positivos de

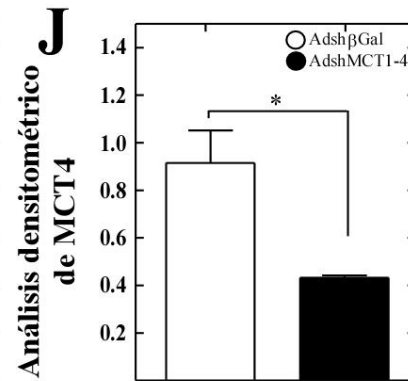
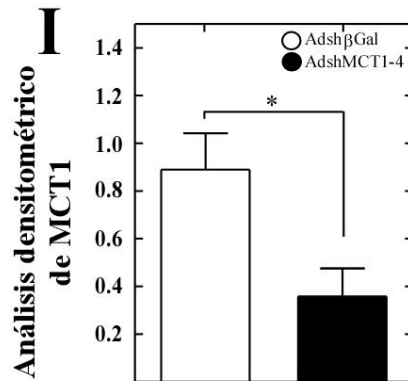
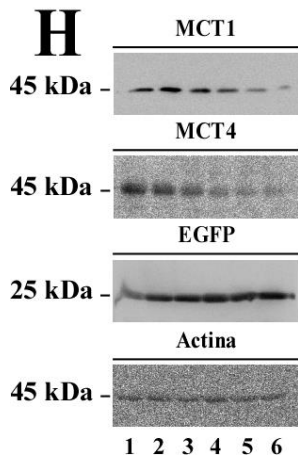
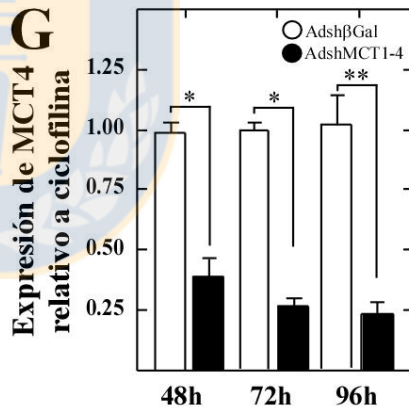
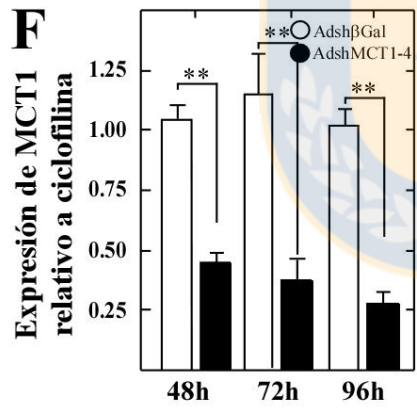
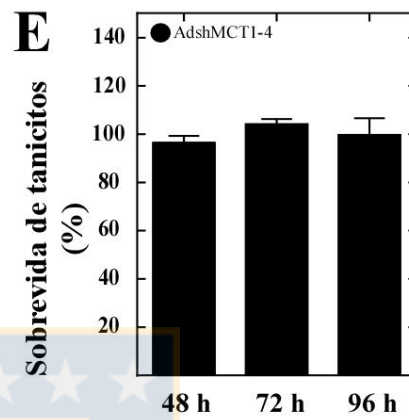
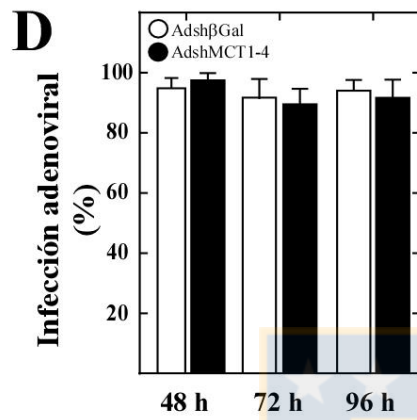
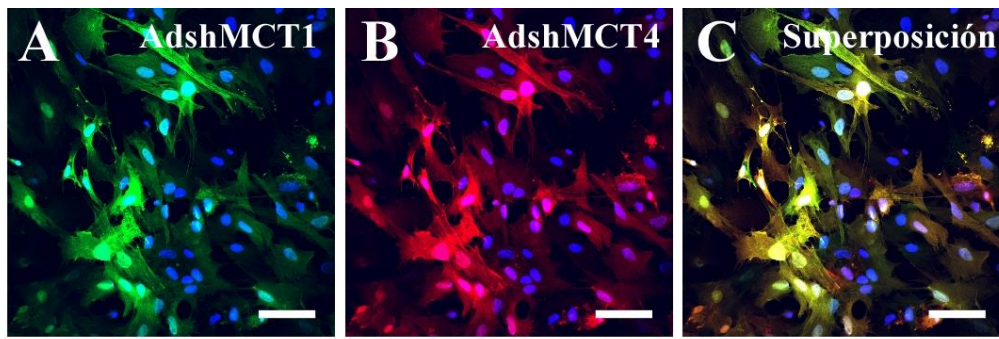
hígado de rata (Fig. 14A, carril 1), cultivo primario de astrocitos (Fig. 14A, carril 2) o extracto de proteínas de hipotálamo de rata (Fig. 14B, carril 1), demostrando la especificidad de partidores y anticuerpos utilizados. Mediante inmunocitoquímica evaluamos la distribución celular de MCT2, la que presenta una escasa reactividad en las células en cultivo (Fig. 14C, flechas), con solo un 20% de ellas positivas para transportador.

Posteriormente, mediante qRT-PCR, determinamos que el *knockdown* de MCT1 y/o MCT4 no afecta la expresión de MCT2 a 48, 72 y 96 h post-transducción. Nuestros resultados mostraron que los niveles de ARNm de MCT2 no son alterados en ninguno de los tiempos analizados luego del *knockdown* para MCT1 (Fig. 14D, barras negras), MCT4 (Fig. 14E, barras negras) o el doble *knockdown* (Fig. 14F, barras negras), en comparación con la expresión de MCT2 en cultivos de tanicitos transducidos con Adsh $\beta$ Gal (Fig. 14D-F, barras blancas), demostrando la elevada especificidad de los shARN para MCT1 y MCT4.

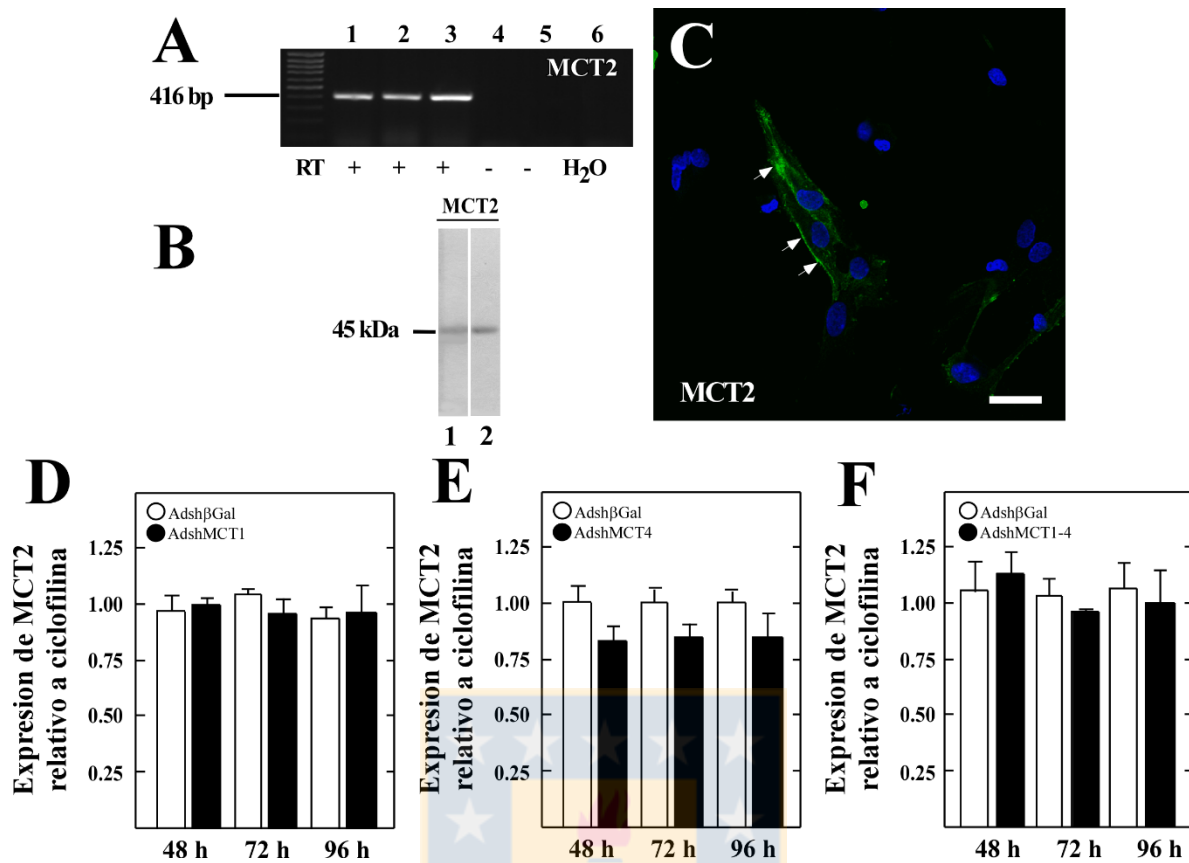


**Figura 13. Knockdown de MCT1 y MCT4 en cultivos primarios de tanicitos hipotalámicos.**

**A-C:** Análisis de la expresión de EGFP y tdTomato en cultivos de tanicitos transducidos por 96 h con AdshMCT1 (A, verde) y AdshMCT4 (B, rojo). Los núcleos fueron teñidos con la tinción nuclear TOPRO-3 (azul). **D:** Cuantificación de la expresión de EGFP y tdTomato normalizado al número total de células en cultivos de tanicitos transducidos con Adsh $\beta$ Gal (barras blancas) o AdshMCT1-4 (barras negras) a 48, 72 y 96 h post-transducción. **E:** Cuantificación de la sobrevivencia celular de cultivos de tanicitos transducidos con AdshMCT1-4 por 48, 72 and 96 h, expresado en porcentaje, en comparación a la sobrevivencia celular de cultivos de tanicitos transducidos con Adsh $\beta$ Gal. **F-G:** Análisis de qRT-PCR para MCT1 (F) y MCT4 (G) en tanicitos infectados con Adsh $\beta$ Gal (barras blancas) o AdshMCT1-4 (barras negras) por 48, 72 and 96 h. **H:** Análisis de *Western blot* para MCT1, MCT4, EGFP y Actina. Carril 1-3: Extractos totales de proteínas luego de 96 h con post-transducción con Adsh $\beta$ Gal; carril 4-6: extractos totales de proteínas luego de 96 h de post-transducción con AdshMCT1-4. **I-J:** Análisis semi-cuantitativo de la expresión de MCT1 (I, barra negra) y MCT4 (J, barra negra) relativo a actina. EGFP: control de transducción. Actina: control de carga. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  (t-test, no pareado). Tamaño de barra: 25  $\mu$ m.







**Figura 14. Análisis de la expresión de MCT2 en cultivos primarios de tanicitos hipotalámicos transducidos con AdshMCT1 y/o AdshMCT4.**

**A:** RT-PCR para MCT2 en tanicitos hipotalámicos. Carril 1, hígado de rata; 2, astrocitos de rata; 3, tanicitos de rata; 4, RT negativo de astrocitos; 5, RT negativo de tanicitos; 6, control negativo de agua. **B:** Análisis de *Western blot* para MCT2. Carril 1, Extracto de proteínas total de hipotálamo de rata; carril 2, extracto de proteínas totales de cultivos primarios de tanicitos. **C:** Inmunocitoquímica para MCT2 (verde), mediante microscopia confocal. Tinción nuclear TOPO-3 (azul). **D-F:** Análisis de qRT-PCR para MCT2 en tanicitos transducidos con AdshMCT1 (D, barras negras), AdshMCT4 (E, barras negras) y la mezcla de AdshMCT1 y AdshMCT4 (F, barras negras) por 48, 72 y 96 h, comparados con la expresión de MCT2 en cultivos transducidos con AdshβGal (D-F, barras blancas). Los datos representan el promedio ± la DE de tres experimentos independientes con un N=4. (t-test, no pareado). Escala barra: 30 μm.

### **1.8. En cultivos primarios de tanicitos, el doble *knockdown* de MCT1 y MCT4 afecta la incorporación y liberación de lactato.**

Para determinar si la transducción adenoviral es capaz de afectar funcionalmente a MCT1 y MCT4, en una primera instancia evaluamos la capacidad de incorporación de L-lactato radioactivo en cultivos primarios de tanicitos transducidos con el AdshMCT1 y/o AdshMCT4. Esto se realizó al incubar cultivos de tanicitos, transducidos durante 96 h, en soluciones que contienen L-lactato 0,1 mM o 25 mM durante 5 min a 4°C. La menor concentración, se utilizó para evaluar principalmente la capacidad de incorporación a través de MCT1 cuya Km, reportada para L-lactato es 5 mM (Cortes-Campos et al., 2011), y la mayor concentración para evaluar el transporte a través de MCT4 cuya Km para L-lactato, ha sido reportada en 34 mM (Cortes-Campos et al., 2011).

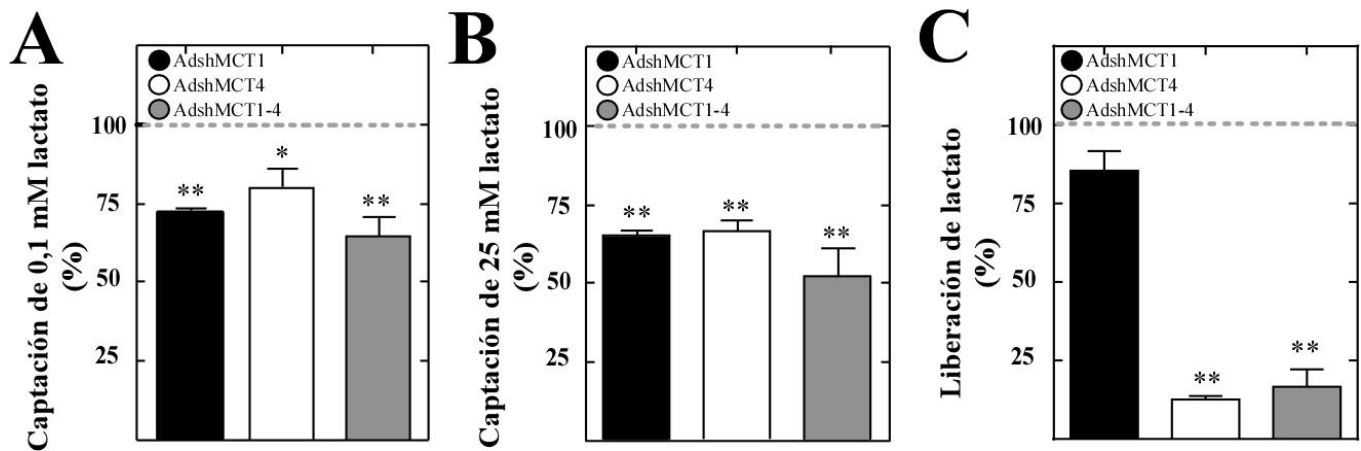
Nuestros resultados, indican que el *knockdown* de MCT1, es capaz de reducir significativamente la incorporación de L-lactato 0,1 mM en un 28,2% (Fig. 15A, barra negra), mientras que el *knockdown* de MCT4 reduce su incorporación en un 19,7% (Fig. 15A, barra blanca). La doble inhibición de MCT1 y MCT4 fue capaz de reducir en un mayor porcentaje la incorporación de L-lactato 0,1 mM, alcanzando un 35,2% de inhibición (Fig. 15A, barra gris). De igual manera, la utilización 25 mM de L-lactato fue reducida significativamente en un 34,7% luego de inhibir MCT1 (Fig. 15B, barra negra), en un 33,2% al inhibir MCT4 (Fig. 15B, barra blanca) y en un 47,5% al inhibir ambos transportadores (Fig. 15B, barra gris), en comparación con la incorporación de L-lactato en cultivos de tanicitos transducidos con el adenovirus control AdshβGal.

Posteriormente, evaluamos la capacidad de liberación de lactato en respuesta a 5mM de glucosa durante 30 min, en cultivos primarios de tanicitos transducidos durante 96 h con el AdshMCT1 y/o AdshMCT4. Al analizar la concentración de lactato presente en el



sobrenadante a través de HPLC, observamos que el *knockdown* para MCT1, reduce la liberación de lactato en un  $14,1 \pm 9,4\%$  (Fig. 15C, barra negra), mientras que la inhibición de MCT4, es capaz de reducir significativamente la liberación de lactato en un  $88,3 \pm 1,8\%$  (Fig. 15C, barra blanca). Esta significativa reducción en la liberación de lactato, se mantiene cuando ambos transportadores son inhibidos, alcanzando una reducción en la liberación de un  $83,4 \pm 7,5\%$  (Fig. 15C, barra gris).





**Figura 15. Captación y liberación de lactato en cultivos primarios de tanicitos hipotalámicos *knockdown* para MCT1 y/o MCT4.**

**A-B:** Captación de  $^{14}\text{C}$ -L-lactato en cultivos de tanicitos transducidos con AdshMCT1 (barras negras), AdshMCT4 (barras blancas) o AdshMCT1 y AdshMCT4 (barras grises), normalizados a la captación obtenida por tanicitos transducidos con Adsh $\beta$ Gal durante 96 h post-transducción. La captación se realizó a 0,1 mM (A) y 25 mM (B) de  $^{14}\text{C}$ -L-lactato durante 5 min a 4°C. **C:** Liberación de lactato en respuesta a un estímulo de glucosa 5 mM durante 30 min de incubación a temperatura ambiente, cuantificado mediante HPLC. La liberación de lactato disminuye significativamente al inhibir la expresión de MCT4 y cuando ambos transportadores son inhibidos. N=5 de tres experimentos independientes, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  (t-test, no pareado).

**Capítulo 2. Demostrar que la inhibición *in vivo* de MCT1 y MCT4 en el hipotálamo, afecta la función glucosensora que controla la ingesta alimenticia durante aumentos de la glucorraquia.**

Nuestro grupo de investigación, en paralelo a otros grupos, ha demostrado que *in vitro* e *in situ* los tanicitos son capaces de responder a incrementos en la concentración de glucosa extracelular, generando ondas de calcio que permiten la liberación de ATP al medio extracelular a través de HC-Cx43 (Frayling et al., 2011; Orellana et al., 2012). Además, se ha demostrado que ratones *knockout* para GLUT2 (transportador expresado en tanicitos), poseen alteraciones en el control de la ingesta de alimentos a nivel central, provocando un aumento de la ingesta alimenticia y una desregulación de la expresión de neuropéptidos orexígenos y anorexígenos en la transición ayuno-alimentación (Bady et al., 2006).

Para aportar antecedentes en el mecanismo sensor de glucosa hipotalámico basado en una interacción tanicito-neurona vía lactato, y debido al escaso conocimiento que existe de los mecanismos que controlan a las neuronas orexígenas, las cuales se encuentran en un estrecho contacto con tanicitos  $\beta 1v$  (positivos para MCT1), y anorexigénicas, las que son contactadas por procesos de tanicitos  $\beta 1d$  (positivos para MCT4) (Cortes-Campos et al., 2011), decidimos evaluar el efecto del *knockdown in vivo* de MCT1 y/o MCT4 sobre las respuestas de neuronas hipotalámicas frente al incremento de glucosa ventricular.

## **2.1. Evaluación en el tiempo de la expresión de EGFP, al inyectar i.c.v. el AdshMCT1 en el tercer ventrículo.**

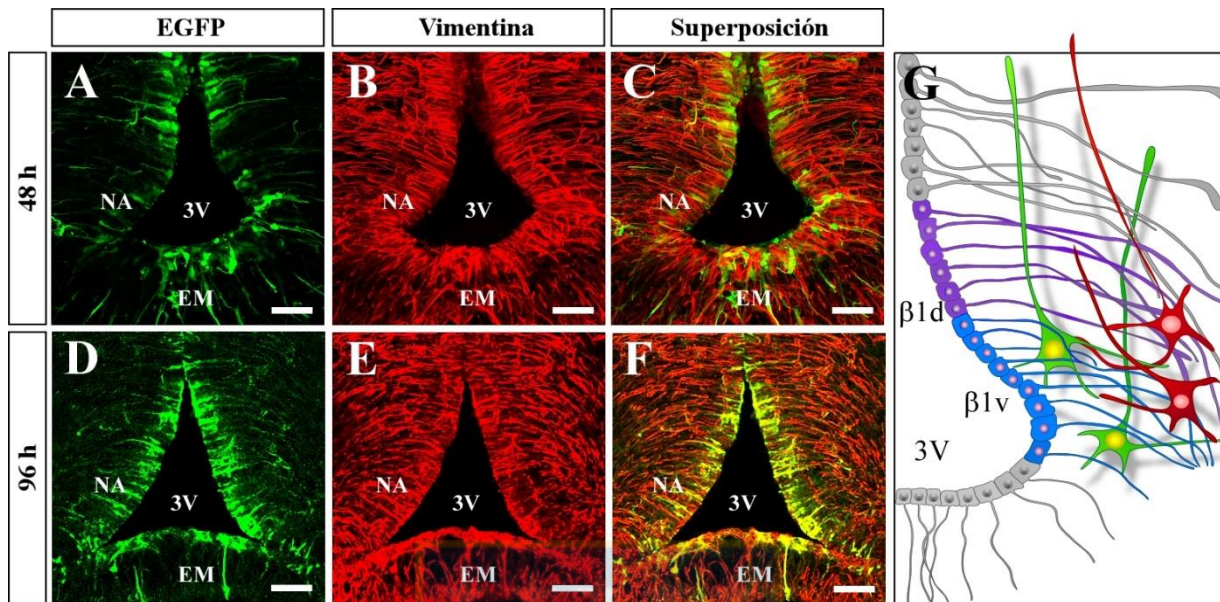
Inicialmente, decidimos evaluar el tiempo de transducción adenoviral necesario para generar los animales *knockdown*, utilizando como marcador a la proteína reportero EGFP. Esto fue llevado a cabo al inyectar 30  $\mu$ L del AdshMCT1 i.c.v. en el 3V de ratas macho adultas, mediante procedimientos esteroráxicos. Luego de 48 y 96 h de post-transducción, se procedió a evaluar la expresión de EGFP en cortes frontales de cerebro mediante microscopía confocal. En paralelo, los cortes fueron caracterizados mediante inmunohistoquímica para la expresión de la proteína de filamentos intermedios vimentina, expresada por tanicitos.

El análisis de la expresión de EGFP y vimentina, indican que a 48 h post-transducción, es posible observar la expresión de EGFP localizada en somas y procesos celulares provenientes de las paredes del 3V, los que penetran dentro del parénquima cerebral tomando contacto con la región del NA (Fig. 16A). En paralelo, una intensa inmunoreacción fue detectada en esta región para vimentina, tanto a las 48 h como a las 96 h post-transducción (Fig. 16B y C). Al comparar la expresión de EGFP y vimentina, es posible detectar co-localización entre ambas proteínas, tanto a las 48 como a las 96 h post-transducción, en los paneles donde se superpone la fluorescencia para ambas proteínas (Fig. 16C y F). Por lo tanto, ya sea a través de la morfología de las células positivas para EGFP, como a través de la co-localización con vimentina, las células transducidas corresponden a endimocitos, tanicitos  $\alpha$  y  $\beta$ , procesos de tanicitos que toman contacto con neuronas orexigénicas y anorexigénicas (Cortes-Campos et al., 2013; Cortes-Campos et al., 2011) (Fig. 16G). Interesantemente, la expresión de EGFP, se intensifica a las 96 h post-transducción, observándose una intensa fluorescencia en

un mayor número de células de tipo tanicitos  $\beta$  (Fig. 16D), como también en endimocitos (datos no mostrados). La expresión de EGFP a las 96 h post-transducción muestra una elevada co-localización con somas y procesos de tanicitos, lo que puede observarse gracias a la intensa inmunoreacción para vimentina (Fig. 16F). Por lo tanto, escogimos las 96 h post-transducción, como el tiempo necesario para realizar los estudios de inhibición *in vivo*.

## **2.2. El AdshMCT1 inyectado en el 3V transduce tanicitos *in vivo*.**

Debido a la complejidad celular de la región hipotalámica basal, la que además de tanicitos posee una banda subependimaria de astrocitos localizados principalmente en la región parenquimal, decidimos evaluar mediante inmunohistoquímica la co-expresión de EGFP, el marcador de astrocitos GFAP (rojo), el marcador de tanicitos vimentina (rojo) y el marcaje nuclear con Hoechst (blanco), en animales inyectados i.c.v. con el AdshMCT1 y transducidos durante 96 h. Esto se realizó utilizando microscopía confocal-espectral, lo que permite el análisis de múltiple marcaje, además se utilizó un análisis de *tile-scan* y reconstrucción 3D para la proyección de máxima intensidad, para evaluar toda la región basal hipotalámica con una elevada resolución y la distribución de las marcas fluorescentes, lugar donde se encuentran presentes los tanicitos  $\alpha$  (Fig. 17) y tanicitos  $\beta$  (Fig. 18).



**Figura 16. Identificación de las células transducidas en el 3V con el AdshMCT1, mediante microscopía confocal.**

**A-F:** Expresión temporal de EGFP luego de 48 h (A-C) y 96 h (D-F) post-transducción cortes frontales de hipotálamo basal. Los tanicitos fueron identificados utilizando anti-vimentina (rojo). **G:** Esquema de la región, mostrando la localización de los tanicitos  $\beta 1v$  (azul) y  $\beta 1d$  (morado), células que se encuentran preferentemente transducidas luego de la inyección i.c.v. de AdshMCT1. NA, núcleo arqueado; 3V, tercer ventrículo; EM, eminencia media;  $\beta 1v$ , tanicitos  $\beta 1$  ventrales;  $\beta 1d$ , tanicitos  $\beta 1$  dorsales. Tamaño barra: 150  $\mu m$ .

La expresión de EGFP fue detectada en las células ventriculares que presentan largos procesos celulares, que debido a su localización, son tanicitos  $\alpha$  (Fig. 17A-B, verde). Además, fue posible detectar la expresión de GFAP (Fig. 17C, rojo) y vimentina (Fig. 17D, rojo), donde claramente se observa una distribución diferente de ambas proteínas. Al evaluar la co-expresión de EGFP con vimentina en la reconstrucción 3D para la proyección de máxima intensidad, es posible observar la co-expresión de ambas proteínas (Fig. 17E), siendo más evidente a una mayor magnificación utilizando sólo un plano focal, en la región proximal (Fig. 17G, punta de flecha) y los procesos (Fig. 17G, punta de flechas) de tanicitos  $\alpha$ . La cuantificación de células vimentina-EGFP positivas en la región alcanzo un valor de 92,1%. Sin embargo, no se detectó co-expresión de EGFP con GFAP en astrocitos de la región al evaluar la reconstrucción 3D para la proyección de máxima intensidad (Fig. 17F), como puede observarse con una magnificación en un plano focal (Fig. 17H, punta de flechas). La localización de EGFP también se observó en las células de la región basal del 3V, localizándose en la región proximal y en procesos de células que por morfología y localización son tanicitos  $\beta 1$  y  $\beta 2$  (Fig. 18 A-B), siendo expresada por un 95,5% de las células vimentina positivas. También es posible detectar la expresión de GFAP, principalmente en la región subependimaria de la EM (Fig. 18C) y de vimentina en la región apical de las células ventriculares como en los procesos que se extienden hasta la región palisádica de la EM (Fig. 18D). Al evaluar la co-expresión de EGFP con vimentina (Fig. 18E) y con GFAP (Fig. 18F), es posible observar nuevamente co-localización con tanicitos  $\beta 1$  (Fig. 18G, puntas de flechas) y tanicitos  $\beta 2$  (Fig. 18H, puntas de flechas), siendo detectada en el 94,7% de las células vimentina positivas, mientras que no es posible detectar co-localización entre EGFP y astrocitos, tanto en la región correspondiente al NA lateral (Fig. 18I, flechas),

como en la región de la EM (Fig. 18J, flechas), cuando observamos un plano focal de fluorescencia. Además, la expresión de EGFP no fue detectada en cuerpos neuronales en ninguna de estas áreas, lo que fue demostrado a través de la inmunodetección del marcador neuronal HuC (Fig. 19A-E, rojo), demostrando que las partículas adenovirales transducen selectivamente a tanicitos.

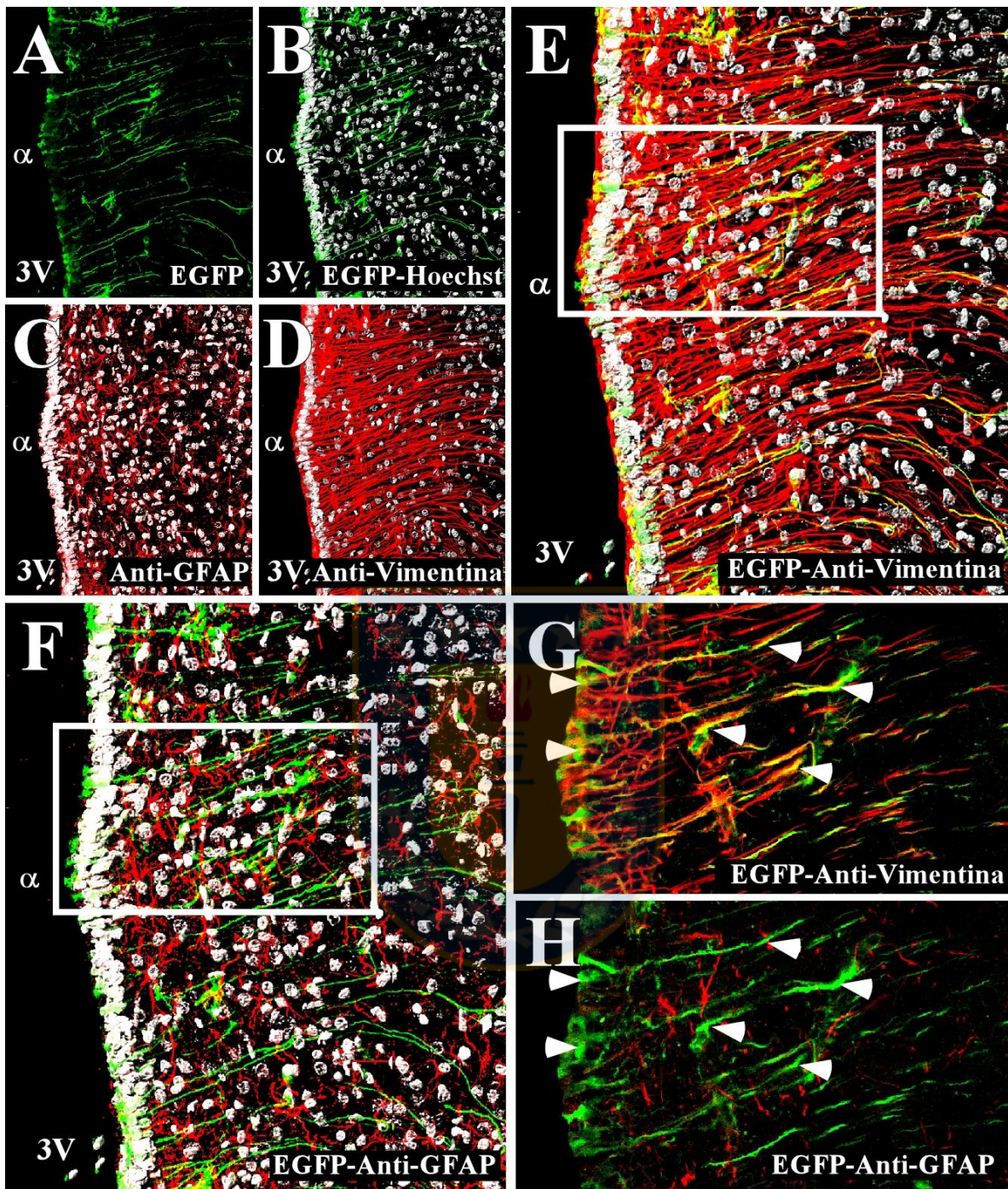




**Figura 17. Co-distribución de EGFP y marcadores gliales en tanicitos  $\alpha$  del hipotálamo basal transducidos con AdshMCT1.**

Análisis inmunohistoquímico utilizando microscopia confocal-espectral para el marcador de tanicitos vimentina (rojo), para el marcador de astrocitos GFAP (rojo) y fluorescencia de EGFP (verde) luego de 96 h post inyección i.c.v. del AdshMCT1. Se utilizó el marcador nuclear Hoechst (blanco). **A-D:** Magnificación menor de la reconstrucción 3D en la proyección de máxima intensidad para la expresión de EGFP (A-B, verde), GFAP (C, rojo) y vimentina (D, rojo). **E,F:** Reconstrucción 3D para la proyección de máxima intensidad para evaluar la co-distribución de EGFP con vimentina (E) y GFAP (F). **G,H:** Magnificación mayor en un plano focal para evaluar la co-distribución de EGFP con vimentina (G) y GFAP (H). EGFP es detectada en células que tapizan el 3V, co-localizando con vimentina, pero no se observa co-localización en células que expresan GFAP.  $\alpha$ , tanicitos  $\alpha$ ; 3V, tercer ventrículo. Tamaño de barra: G,H: 50  $\mu$ m; A-F: 150  $\mu$ m.



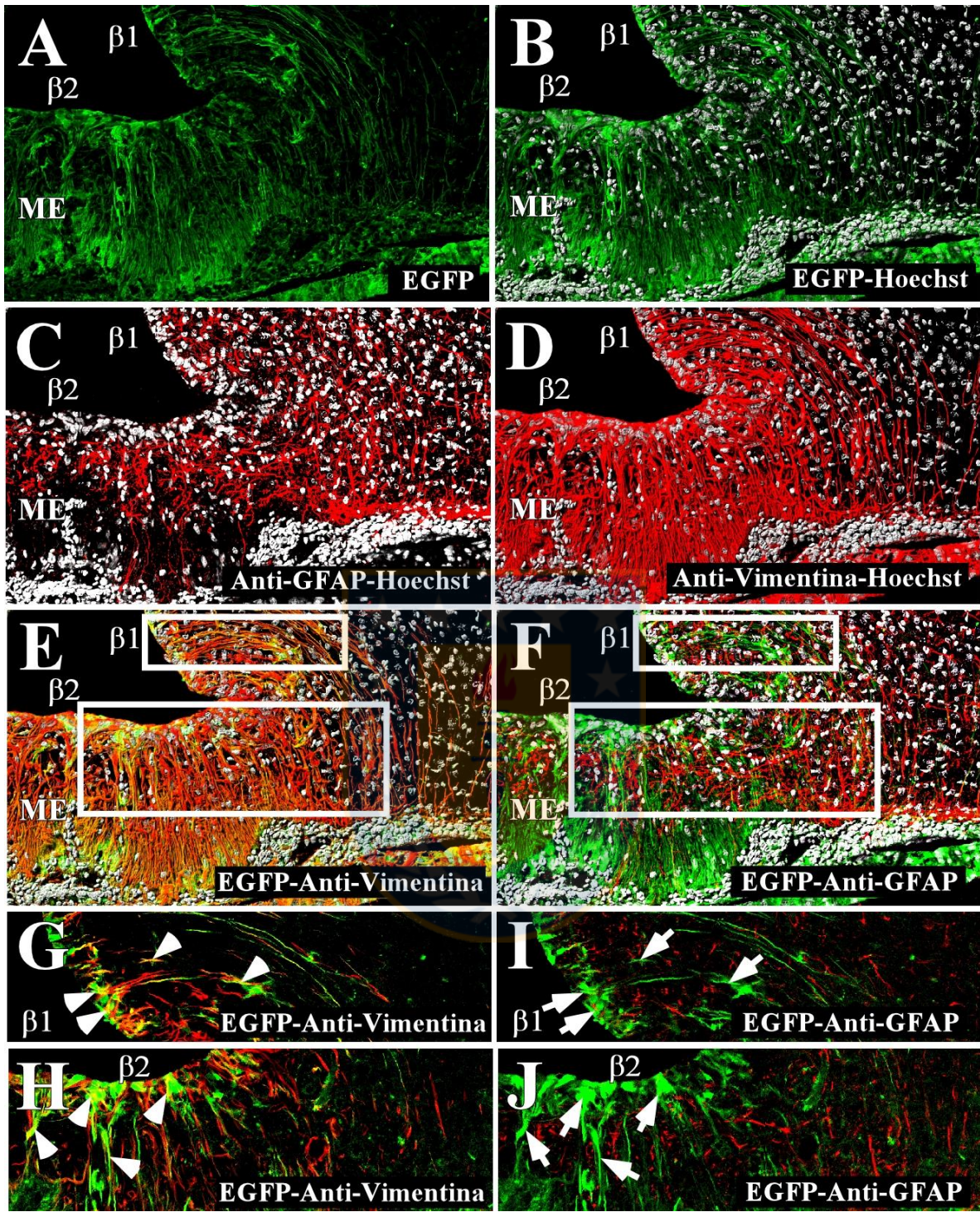


**Figura 18. Co-distribución de EGFP y marcadores gliales en tanicitos  $\beta$  del hipotálamo basal transducidos con AdshMCT1.**

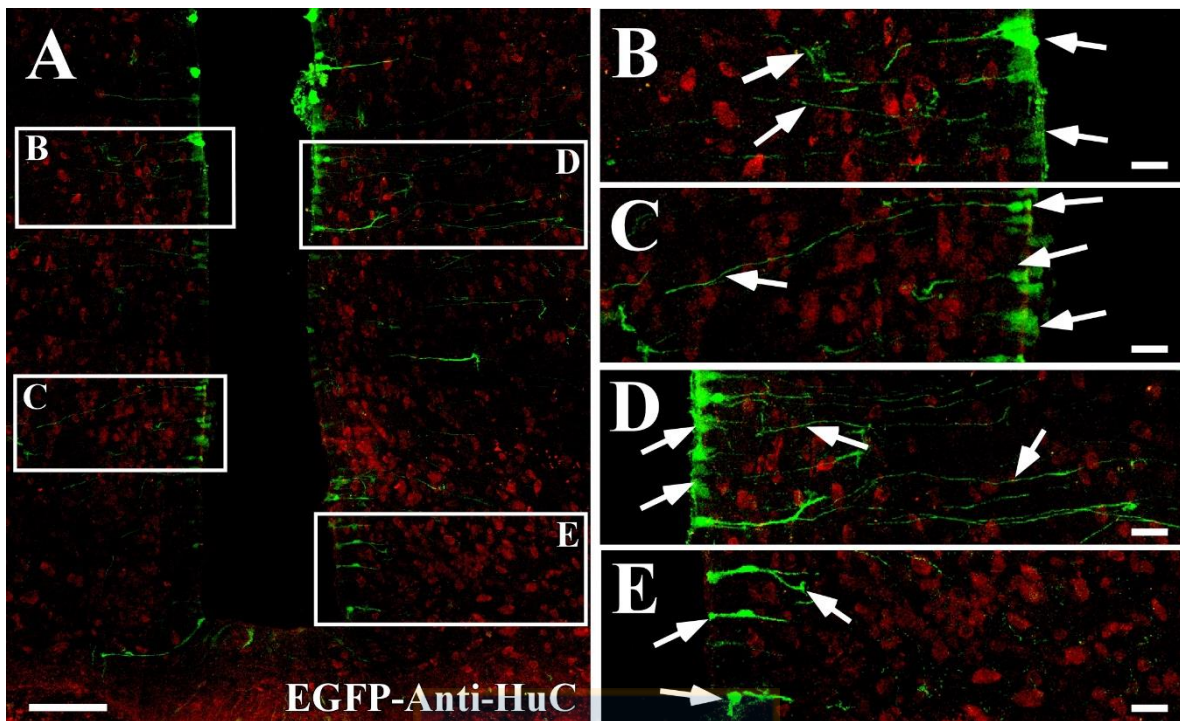
Análisis inmunohistoquímico utilizando microscopia confocal-espectral para el marcador de tanicitos vimentina (rojo), el marcador de astrocitos GFAP (rojo) y fluorescencia de EGFP (verde) luego de 96 h post inyección i.c.v. del AdshMCT1. Se utilizó el marcador nuclear Hoechst (blanco). **A-D:** Magnificación menor de la reconstrucción 3D en la proyección de máxima intensidad para la expresión de EGFP (A-B, verde), GFAP (C, rojo) y vimentina (D, rojo) en tanicitos  $\beta$ 1 y  $\beta$ 2. **E,F:** Reconstrucción 3D para la proyección de máxima intensidad para evaluar la co-distribución de EGFP con vimentina (E) y GFAP (F) en tanicitos  $\beta$ 1 y  $\beta$ 2. **G-J:** Magnificación mayor en un plano focal en tanicitos  $\beta$ 1 (G, I) y  $\beta$ 2 (H, J) para evaluar la co-distribución de EGFP con vimentina (G, H) y GFAP (I, J). EGFP es expresado en tanicitos  $\beta$ 1 y  $\beta$ 2, colocalizando con vimentina (G y H, punta de flechas), pero no se observa colocalización en astrocitos que expresan GFAP (I y J, flechas).  $\beta$ 1, tanicitos  $\beta$ 1;  $\beta$ 2, tanicitos  $\beta$ 2; 3V, tercer ventrículo; EM, eminencia media. Tamaño de barras: G-I: 50  $\mu$ m; A-E: 150  $\mu$ m.











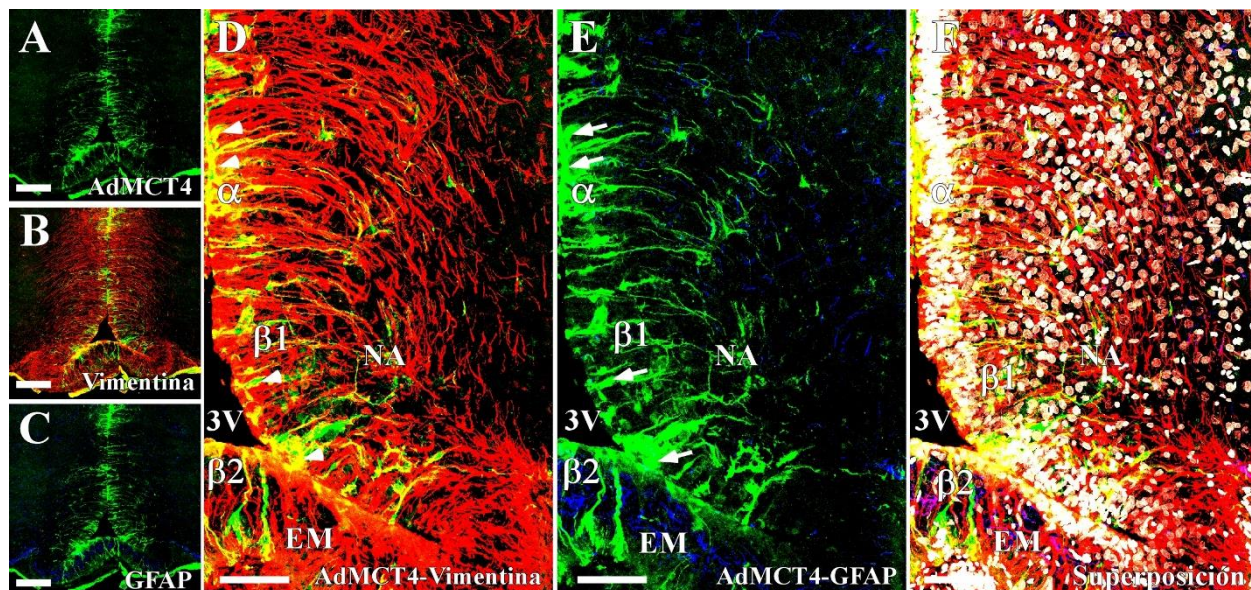
**Figura 19. Co-distribución de EGFP y el marcador neuronal HuC en el hipotálamo basal.**

Análisis inmunohistoquímico utilizando microscopia confocal-espectral para el marcador neuronal HuC (rojo), fluorescencia de EGFP (verde) luego de 96 h post inyección i.c.v. del AdshMCT1. **A:** Magnificación menor para la expresión de EGFP (verde) a las 96 h post-transducción y la expresión de HuC (rojo). **B-E:** Magnificación mayor en tanicitos para evaluar la co-distribución de EGFP con HuC. EGFP es expresado en las paredes ventriculares y en procesos de tanicitos, pero no se observa colocalización con HuC (flechas). Tamaño de barras: 150  $\mu\text{m}$ .

### **2.3. Evaluación de la expresión de EGFP frente a la inyección i.c.v. del AdshMCT4.**

Decidimos evaluar si la inyección i.c.v. del AdshMCT4, es capaz de transducir con la misma selectividad celular que el AdshMCT1. Para ello, mediante inmunohistoquímica evaluamos la co-expresión de EGFP y los marcadores gliales GFAP y vimentina en animales inyectados i.c.v. con 30  $\mu$ L del AdshMCT4 y transducidos durante 96 h.

Utilizando microscopía confocal-espectral y múltiple marcaje, pudimos observar que la expresión de EGFP se encuentra localizada preferentemente en los cuerpos y procesos de las células que forman parte de la pared ventricular (Fig. 20A), distribución similar a la observada al transducir con el AdshMCT1. Al observar la expresión de vimentina (Fig. 20B) y GFAP (Fig. 20C), nuevamente se observa una co-expresión de GFAP y vimentina, lo que se detecta más claramente al observar con una mayor magnificación, localizándose en tanicitos  $\alpha$ ,  $\beta$ 1 y  $\beta$ 2 (Fig. 20D, puntas de flechas), detectando EGFP en el 96,8% de las células vimentina positivas. Por el contrario, EGFP no fue detectado en células positivas para GFAP del NA o de la EM (Fig. 18E, flechas). Queda de manifiesto, que en la región hipotalámica basal, existe una elevada densidad de células vimentina positivas (Fig.20F) en comparación con células GFAP positivas, las que poseen un mayor predominio en la región de la EM, siendo estas últimas negativas para EGFP, lo que demuestra el AdshMCT4, al igual que el AdshMCT1, transduce preferencialmente a tanicitos.



**Figura 20. Co-distribución de EGFP y marcadores gliales del hipotálamo basal en animales *knockdown* para MCT4.**

Análisis inmunohistoquímico utilizando microscopia confocal-espectral para el marcador de tanicitos vimentina (rojo), el marcador de astrocitos GFAP (azul) y fluorescencia de EGFP (verde) luego de 96 h post inyección i.c.v. del AdshMCT4. Se utilizó el marcador nuclear Hoechst (F, blanco). **A-C:** Magnificación menor para la expresión de EGFP (A-C, verde), vimentina (B, rojo) y GFAP (C, azul) en hipotálamo basal. **D-F:** Magnificación para evaluar la co-distribución de EGFP con vimentina (D), GFAP (E) y superposición (F). La expresión de EGFP es observada en células que tapizan el 3V, colocalizando con vimentina (D, punta de flecha) en tanicitos  $\alpha$  y  $\beta$ , pero no se observa colocalización en células que expresan GFAP (E, flecha).  $\alpha$ , tanicitos  $\alpha$ ;  $\beta 1$ , tanicitos  $\beta 1$ ;  $\beta 2$ , tanicitos  $\beta 2$ ; 3V, tercer ventrículo; EM, eminencia media. Tamaño de barra: 150  $\mu\text{m}$ .

#### **2.4. Análisis de la capacidad de *knockdown in vivo* del AdshMCT4 y su efecto sobre la expresión de MCT1.**

Hemos demostrado que el AdshMCT1, es capaz de reducir *in vivo*, la expresión del transcrito de MCT1, sin afectar la expresión de MCT4 (Elizondo-Vega et al., 2016). Para verificar que el AdshMCT4, es capaz de realizar un *knockdown* de su gen blanco *in vivo*, analizamos la expresión de MCT4 mediante qRT-PCR en ratas inyectadas al 3V con el adenovirus control (Adsh $\beta$ Gal) e inhibidor (AdshMCT4). Inicialmente, evaluamos si la expresión de MCT1 se ve alterada al realizar un *knockdown* para MCT4. La cuantificación de la expresión del transcrito para MCT1, demostró que no existen diferencias significativas en la expresión, entre los grupos controles (Fig. 21A, barra blanca) y el grupo inhibido (Fig. 21A, barra negra), demostrando la especificidad del shARN contra MCT4. Posteriormente, evaluamos la expresión de MCT4 luego de 96 h post-transducción, y determinamos que la expresión de MCT4 se reduce significativamente en un  $56,9 \pm 14,9\%$  (Fig. 21B, barra negra), respecto a su control (Fig. 21B, barra blanca).

#### **2.5. Análisis de la capacidad del doble *knockdown in vivo* para MCT1 y MCT4.**

Para determinar que la utilización de ambos adenovirus, son capaces de producir el *knockdown* de sus respectivos genes blanco *in vivo*, evaluamos mediante qRT-PCR la expresión de MCT1 y MCT4 en ratas inyectadas al 3V con una mezcla de los adenovirus inhibidores de MCT1 y MCT4, y comparamos con la expresión de grupos controles inyectados con el Adsh $\beta$ Gal. El doble *knockdown* redujo significativamente la expresión de MCT1 y MCT4, alcanzando un  $46,8 \pm 11,4\%$  de inhibición para MCT1 (Fig. 22A, barra negra) y un  $47,4 \pm 13,5\%$  de inhibición para MCT4 (Fig. 22B, barra negra), en comparación con el grupo control (Fig. 22A-B, barras blancas).



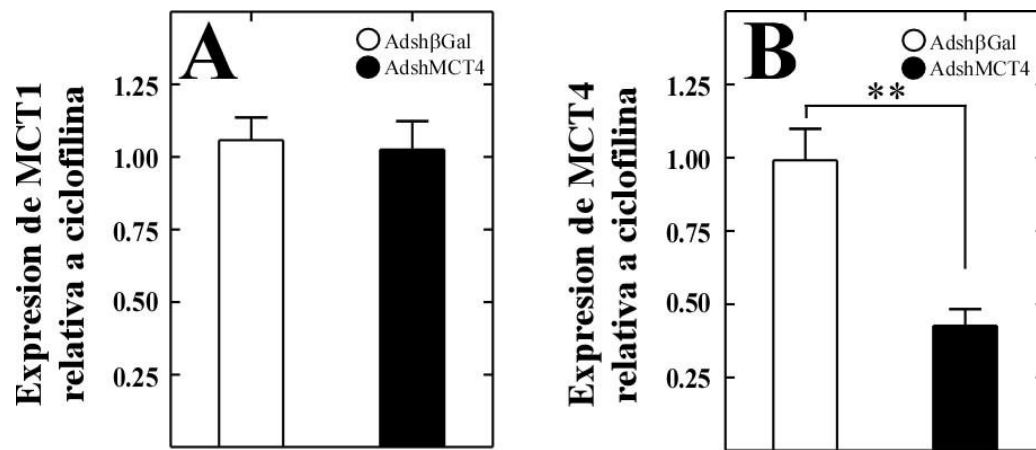
## **2.6. Efecto del *knockdown in vivo* de MCT4 y del doble *knockdown* de MCT1 y MCT4 sobre la expresión de MCT2.**

MCT2 se localiza en las neuronas hipotalámicas y su expresión se encuentra alterada en animales cuando los niveles de lactato extracelular disminuyen (Matsuyama et al 2009).

De acuerdo a esta observación, hemos demostrado que el *knockdown* de MCT1 produce una disminución del 50% en la expresión del ARNm de MCT2, sugiriendo que la disminución de la liberación de lactato hacia el medio extracelular, podría generar la disminución de la expresión del transportador MCT2 (Elizondo-Vega et al 2016).

En consecuencia, decidimos evaluar si la inhibición de la expresión del ARNm del transportador MCT4 o la doble inhibición de MCT1 y MCT4, produce un efecto similar.

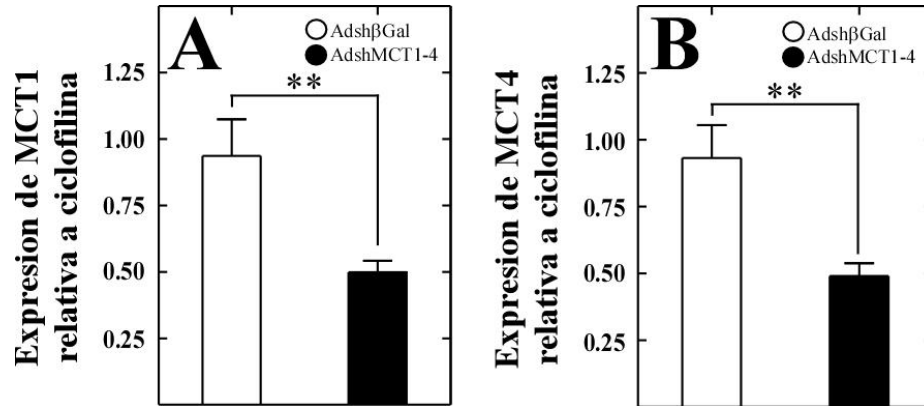
Nuestros resultados indican que los niveles de ARNm de MCT2 disminuyen significativamente en un  $34,3 \pm 12,4\%$  en los animales *knockdown* para MCT4 (Fig. 23A, barra negra) comparados con los controles (Fig. 23A, barra blanca), sugiriendo que la inhibición de la expresión de MCT4 en tanicitos, altera la expresión del transportador MCT2. En animales doble *knockdown* para MCT1 y MCT4, nuevamente observamos una disminución significativa en la expresión del ARNm de MCT2, alcanzando un  $53,4 \pm 15,0\%$  de inhibición (Fig. 23B, barra negra) al ser comparados con los controles (Fig. 23B, barra blanca), corroborando que el *knockdown* de MCT1 y MCT4, disminuye la expresión neuronal de MCT2.



**Figura 21. Análisis de la expresión de MCT1 y MCT4 en ratas transducidas con el adenovirus que codifica para shMCT4.**

**A-B:** Cuantificación de los niveles de ARNm mediante qRT-PCR, de las muestras de hipotálamo de ratas inyectadas i.c.v. con el adenovirus control (Adshβgal) o inhibidor (AdshMCT4) a las 96 h post-transducción. \*\*  $p < 0.01$  (t-test, no pareado).

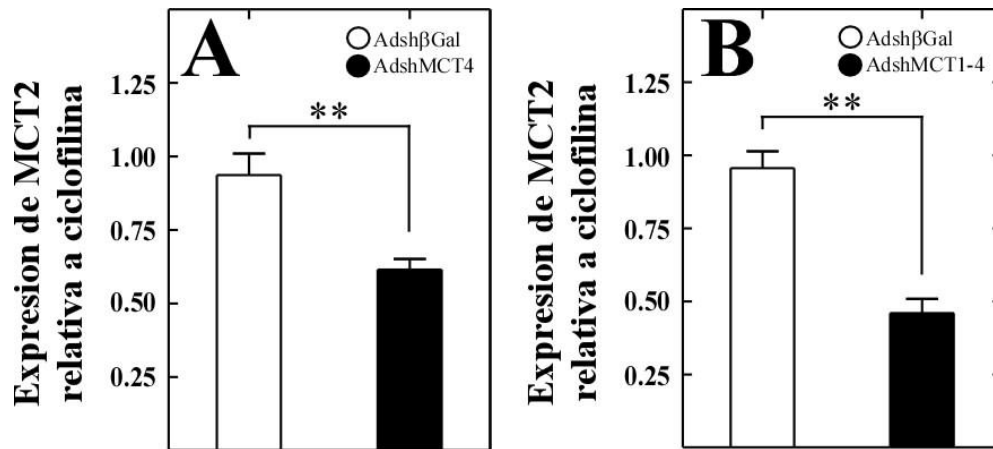




**Figura 22. Análisis de la expresión de MCT1 y MCT4 en ratas transducidas con los adenovirus que codifican para shMCT1 y shMCT4.**

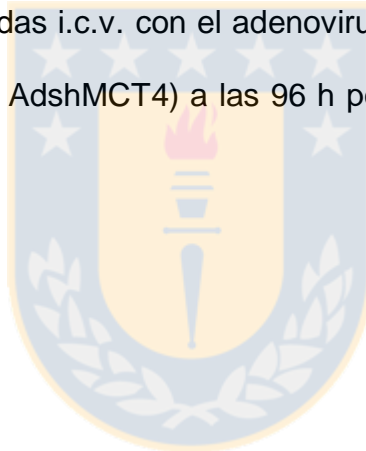
**A-B:** Cuantificación de los niveles de ARNm mediante qRT-PCR, de las muestras de hipotálamo de ratas inyectadas i.c.v. con el adenovirus control (Adshβgal) o inhibidores (AdshMCT1 y AdshMCT4) a las 96 h post-transducción. \*\*  $p < 0.01$  (t-test, no pareado).





**Figura 23. Análisis de la expresión de MCT2 en ratas *knockdown* para MCT4 y MCT1-MCT4.**

**A-B:** Cuantificación de los niveles de ARNm mediante qRT-PCR, de las muestras de hipotálamo de ratas inyectadas i.c.v. con el adenovirus control (Adshβgal) o inhibidores (AdshMCT4 o AdshMCT1 y AdshMCT4) a las 96 h post-transducción. \*\*  $p < 0.01$  (t-test, no pareado).



## **2.7. Análisis del efecto de la glucosa i.c.v. en animales *knockdown* para MCT4, sobre la expresión de neuropéptidos orexígenos.**

Previamente hemos reportado que procesos de tanicitos  $\beta 1v$  que expresan MCT1 contactan a neuronas orexígenas (NPY y AgRP), localizadas en la región proximal del NA (Cortes-Campos et al., 2011), mientras que los proceso de tanicitos  $\beta 1d$  que expresan MCT4, contactan a neuronas anorexigénicas (POMC y CART), localizadas en la región lateral del NA (Cortes-Campos et al., 2011).

Hemos demostrado que la inhibición de la expresión de MCT1 en tanicitos, produce una alteración en la expresión de NPY y AgRP frente a un incremento de la concentración de glucosa ventricular. En condiciones normales, la glucosa disminuye la expresión de neuropéptidos orexígenos, sin embargo en los animales *knockdown* para MCT1, no se produce esta respuesta (Elizondo-Vega et al., 2016).

Para determinar el rol de MCT4 sobre la expresión de neuropéptidos, se utilizaron ratas machos adultas a las cuales se les insertó una guía de cánula mediante esterotaxia y se dejaron recuperar de la cirugía por 120 h. Pasado este tiempo fueron inyectadas al 3V basal con los adenovirus control o inhibidor con una velocidad de 0,5  $\mu$ L por seg. A las 96 h post-transducción los animales fueron nuevamente inyectados i.c.v. con 10  $\mu$ L de glucosa 50 mM o tampón salino, previo a un ayuno de 48 h. Dos horas post-estímulo las ratas fueron sacrificadas, se disecó el hipotálamo y se extrajo ARN total.

Al analizar los resultados de qRT-PCR en los animales tratados con el adenovirus control (Adsh $\beta$ Gal), muestran que el incremento en la concentración de glucosa ventricular, produce una inhibición de un 52% en la expresión de NPY (Fig. 24A, barra negra) y de un 64,4 % en la expresión de AgRP (Fig. 24B, barra negra) con respecto al salino (Fig. 24A-B, barras blancas), resultados concordantes con lo reportado en literatura (Bady et

al., 2006). En los animales *knockdown* para MCT4, la expresión de NPY y AgRP frente a un aumento de la concentración de glucosa ventricular, disminuyeron aproximadamente en un 50% tanto para NPY como para AgRP (Fig 24A-B, barras negras). Estos resultados indican que el *knockdown* de MCT4, no altera la respuesta de las neuronas orexígenas frente a hiperglicemia. Sin embargo, en los animales *knockdown* para MCT4, ayunados por 48 h, los ARNm de ambos neuropéptidos se encuentran más bajos que en los animales controles (Fig. 24A-B, barras blancas), sugiriendo que existe una alteración en la respuesta a hipoglicemia de las neuronas orexígenas.

## **2.8. Análisis del efecto de la inyección i.c.v. de glucosa en animales *knockdown* para MCT4 sobre la expresión de neuropéptidos anorexígenos.**

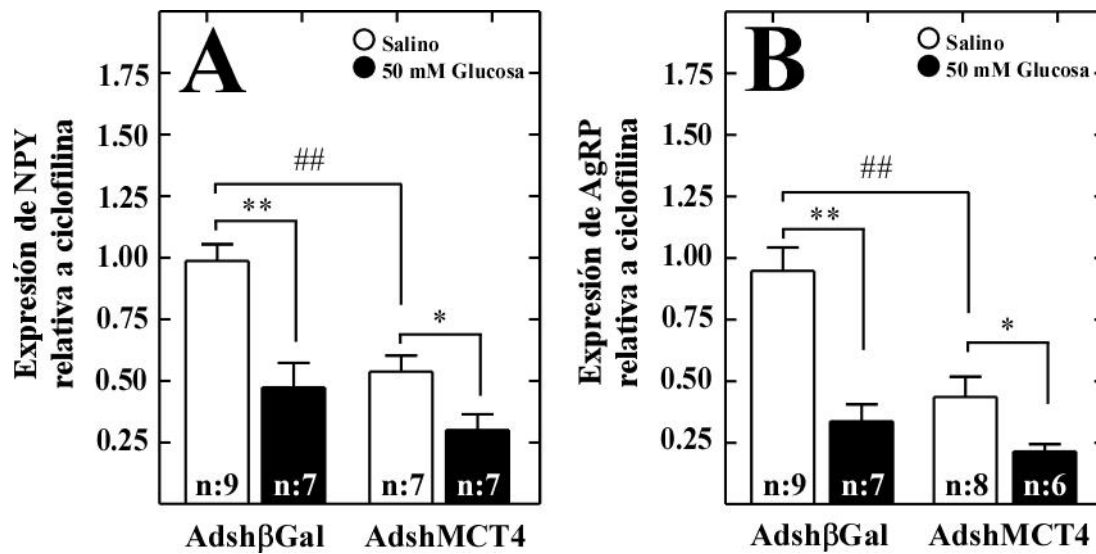
Antecedentes de nuestro laboratorio indican que los animales *knockdown* para MCT1 responden a glucosa, disminuyendo los niveles de expresión de los neuropéptidos anorexigénicos, es decir responden normalmente a la hiperglucoraquia. Sin embargo, presentan una respuesta anómala a la hipoglicemia generada por el ayuno (Elizondo-Vega et al., 2016).

Debido a que los procesos de tanicitos MCT4 positivos contactan a neuronas anorexígenicas, evaluamos si la inhibición glial de MCT4 altera la respuesta de estas neuronas. Para ello utilizamos el mismo abordaje experimental descrito anteriormente y analizamos mediante qRT-PCR la expresión de neuropéptidos anorexígenos.

La inyección i.c.v. de glucosa en animales controles, produce un incremento de 42,9% (Fig. 25A, barra negra) de la expresión de POMC y un incremento de 60,8% de CART (Fig. 25B, barra negra) en comparación con los animales tratados con solución salina (Fig. 25A-B, barras blancas), de acuerdo a lo esperado para neuropéptidos que producen

saciedad. Interesantemente, la expresión de neuropéptidos anorexigénicos en animales *knockdown* para MCT4, en hipoglicemia, son iguales al control para POMC (Fig. 25A, barra blanca) y CART (Fig. 25B, barra blanca). Sin embargo, la respuesta a la inyección i.c.v. a glucosa es contraria a lo observada en la condición control. Se detectó una disminución de un 61,6% para POMC y de un 66,7% para CART. Los resultados sugieren que la glucosa i.c.v. no produce el incremento en la expresión de estos neuropéptidos, indicando que el *knockdown* de MCT4 altera las respuestas de las neuronas anorexígenas frente a hiperglicemia.

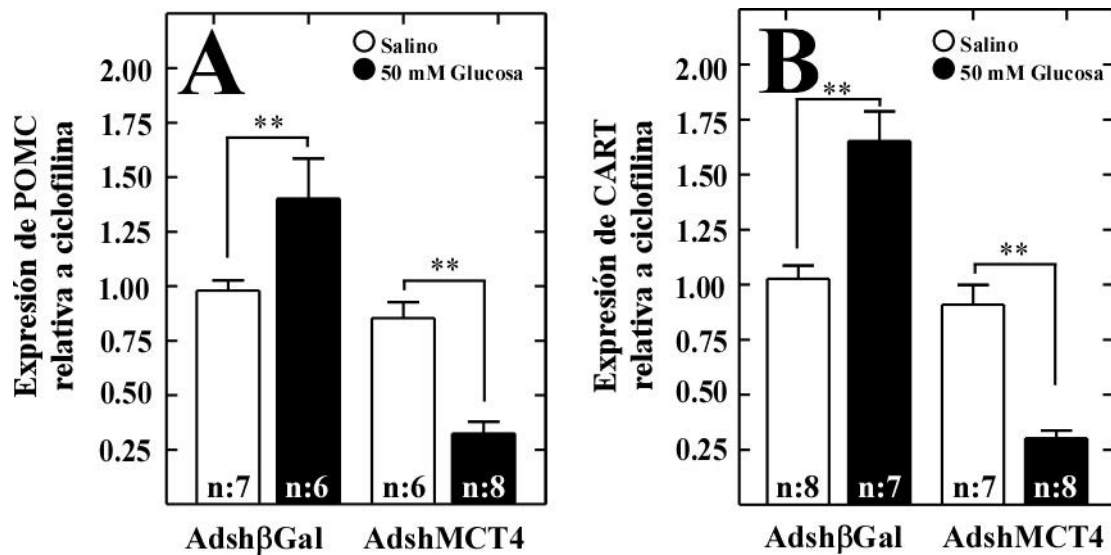




**Figura 24. Expresión de neuropéptidos orexígenos, en respuesta a glucosa inyectada i.c.v. en animales *knockdown* para MCT4.**

**A-B:** Análisis de la expresión de los neuropéptidos orexígenos mediante qRT-PCR 2 h post-inyección de 10  $\mu$ L de salino (barras blancas) o 10  $\mu$ L de glucosa 50 mM (barras negras) al 3V en ratas transducidas por 96 h con Adsh $\beta$ Gal (control) o AdshMCT4 (inhibidor). \*\*,## p<0.01, \* p<0.05 (t-test, no pareado).





**Figura 25. Expresión de neuropéptidos anorexígenos, en respuesta a glucosa inyectada i.c.v. en animales *knockdown* para MCT4.**

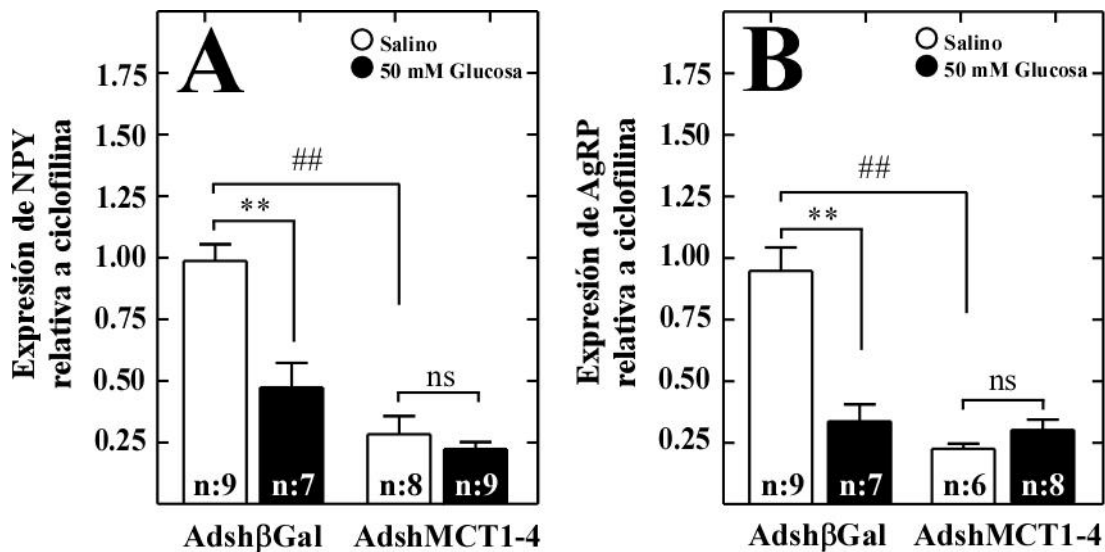
**A-B:** Análisis de la expresión de los neuropéptidos anorexígenos mediante qRT-PCR 2 h post-inyección de 10  $\mu$ L salino (barras blancas) o 10  $\mu$ L de glucosa 50 mM (barras negras) al 3V en ratas transducidas por 96 h con Adsh $\beta$ Gal (control) o AdshMCT4 (inhibidor). \*\*,# p<0.01, \* p<0.05 (t-test, no pareado).

## **2.9. Análisis del efecto de la inyección i.c.v. de glucosa, en animales doble *knockdown* de MCT1 y MCT4, sobre la expresión de neuropéptidos orexígenos.**

Los antecedentes previos, indican que la inhibición de la expresión de MCT1 en tanicitos, produce una alteración en la expresión de neuropéptidos orexígenos (frente a un incremento en la concentración de glucosa). Los resultados de este trabajo de tesis indican que la inhibición de la expresión de MCT4 en tanicitos, no afecta la capacidad de responder a la inyección i.c.v. de glucosa. Sin embargo, presentan una respuesta anormal al ayuno

Estos antecedentes nos llevan a plantear si esta desregulación, mediada por la inhibición de MCT1 o MCT4 en forma separada, puede potenciarse en animales con una inhibición de ambos transportadores.

Al analizar los niveles de expresión de NPY y AgRP en el doble *knockdown*, en la condición de hipoglicemia generada por el ayuno (salino), son significativamente menores que las observadas en animales controles, disminuyendo aproximadamente un 75% tanto para NPY como para AgRP (Fig. 26A-B, barras blancas), resultados que se asemejan al inhibir solo MCT4 (Fig. 24). Interesantemente, la expresión de NPY y AgRP al aumentar la concentración de glucosa ventricular, es similar a la que presentan los animales controles (Fig. 26A-B, barras negras). Estos resultados indican que el *knockdown* de MCT1 y MCT4, presenta una alteración en respuesta a hipoglicemia.

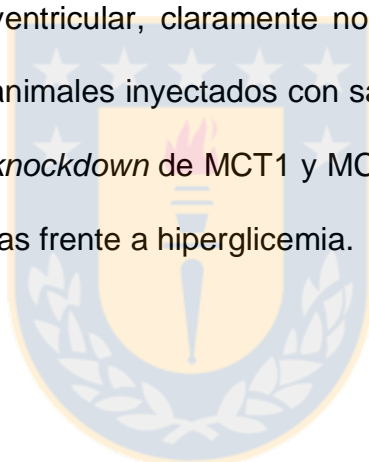


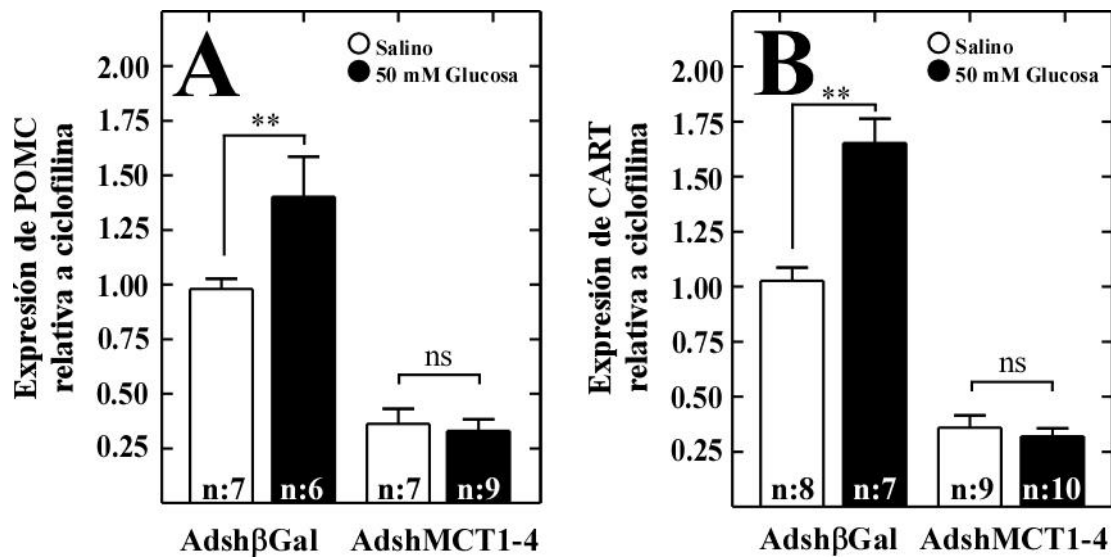
**Figura 26. Expresión de neuropéptidos orexígenos, en respuesta a glucosa inyectada i.c.v. en animales *knockdown* para MCT1 y MCT4.**

**A-B:** Análisis de la expresión de los neuropéptidos orexígenos mediante qRT-PCR 2 h post-inyección de 10  $\mu$ L de salino (barras blancas) o 10  $\mu$ L de glucosa 50 mM (barras negras) al 3V en ratas transducidas por 96 h con Adsh $\beta$ Gal (control) o AdshMCT1 y AdshMCT4 (inhibidores). \*\*,##  $p < 0.01$ ; ns, no significativo (t-test, no pareado).

## **2.10. Análisis del efecto de la inyección i.c.v. de glucosa, en animales doble *knockdown* para MCT1 y MCT4, sobre la expresión de neuropéptidos anorexígenos.**

Es necesario recordar que el incremento de glucosa i.c.v., no afecta los niveles de expresión de POMC y CART en animales *knockdown* para MCT1 (Elizondo-Vega et al., 2016), y que resultados de este trabajo muestran que los animales *knockdown* para MCT4 poseen una respuesta inversa, presentando alteraciones en la condición de ayuno. La expresión de los ARNm para POMC y CART en una condición de hipoglicemia generada por el ayuno, es un tercio menos que lo observado en animales controles (Fig. 27A-B, barras blancas). La expresión de POMC y CART frente a un aumento de la concentración de glucosa ventricular, claramente no incrementan (Fig. 27A-B, barras negras), siendo igual a los animales inyectados con salino (Fig. 27A-B, barras blancas), corroborando que el doble *knockdown* de MCT1 y MCT4, también altera las respuestas de las neuronas anorexígenas frente a hiperglicemia.





**Figura 27. Expresión de neuropéptidos anorexígenos, en respuesta a inyección de glucosa en animales *knockdown* para MCT1 y MCT4.**

**A-B:** Análisis de la expresión de los neuropéptidos mediante qRT-PCR 2 h post-inyección de 10  $\mu$ L de salino (barras blancas) o 10  $\mu$ L de glucosa 50 mM (barras negras) al 3V en ratas transducidas por 96 h con Adsh $\beta$ Gal (control) o AdshMCT1 y AdshMCT4 (inhibidores). \*\*,##  $p < 0.01$ ; ns, no significativo (t-test, no pareado).

### **Capítulo 3. Definir los cambios en la conducta alimenticia en animales *knockdown* para MCT1 y MCT4.**

Debido a que la inhibición de la expresión de los transportadores MCT1 y MCT4 en tanicitos, altera la producción de neuropéptidos orexígenos y anorexígenos en respuesta a incrementos i.c.v. de la concentración de glucosa, evaluamos si el *knockdown* de MCT1 y MCT4 produce alteraciones en los mecanismos asociados al hambre y saciedad.

Para evaluar el rol de MCTs sobre la ingesta alimenticia, un total de 50 ratas machos adultos fueron canulados al 3V. Luego de 120 h de recuperación estas fueron inyectadas i.c.v. durante 96 h con el adenovirus control (Adsh $\beta$ Gal) y los adenovirus inhibidores (AdshMCT1, AdshMCT4 y AdshMCT1-AdshMCT4). Luego de 72 h post-transducción, los animales fueron sometidos a dos ciclos de ayuno-realimentación de 24 h cada uno, para posteriormente evaluar el comportamiento alimenticio a través del uso de cajas de alimentación, que permiten el ingreso y el tiempo de permanencia en el comedero.

#### **3.1. Análisis del efecto del *knockdown* de MCT1 sobre la ingesta alimenticia.**

Inicialmente, se determinó la cantidad de alimento ingerido en un periodo de 24 h (realimentación) luego de un ayuno de 24 h. Dado que no fue posible obtener animales con el mismo peso, los datos fueron normalizados por cada 200 g de peso animal. Esto se realizó por dos ciclos consecutivos para determinar si las respuestas observadas son reproducibles en el mismo grupo animal en el tiempo.

Los resultados obtenidos demuestran que la inhibición de MCT1, produce un incremento

significativo de la ingesta de alimentos, tanto en el ciclo 1 como en el ciclo 2 (Fig. 28A). Los animales *knockdown* para MCT1 consumen 4,1 g por sobre la cantidad de alimentos consumidos por el grupo control (Fig. 28A, barra blanca) durante el ciclo 1 y 4,4 g más durante el ciclo 2 (Fig. 28A, barras negras).

Al evaluar si el incremento en la ingesta alimenticia se ve reflejado en un cambio en el peso corporal, observamos que el animal *knockdown* incrementa en un 5,6% su peso corporal durante el ciclo 1 y en un 2,2% durante el ciclo 2 (Fig. 28B, barras negras), comparados al grupo control (Fig. 28B, barras blancas). Además, evaluamos si la condición *knockdown* genera variaciones en la concentración de glucosa sistémica. La glicemia fue medida durante el período de ayuno de cada ciclo, no se detectaron diferencias con los grupos controles (Fig. 28C, barras blancas), manteniéndose en rangos de concentración normales para una condición de hipoglicemia (Fig. 28C, barras negras), sugiriendo que el *knockdown* de MCT1 en el hipotálamo, no afecta la concentración de glucosa periférica.

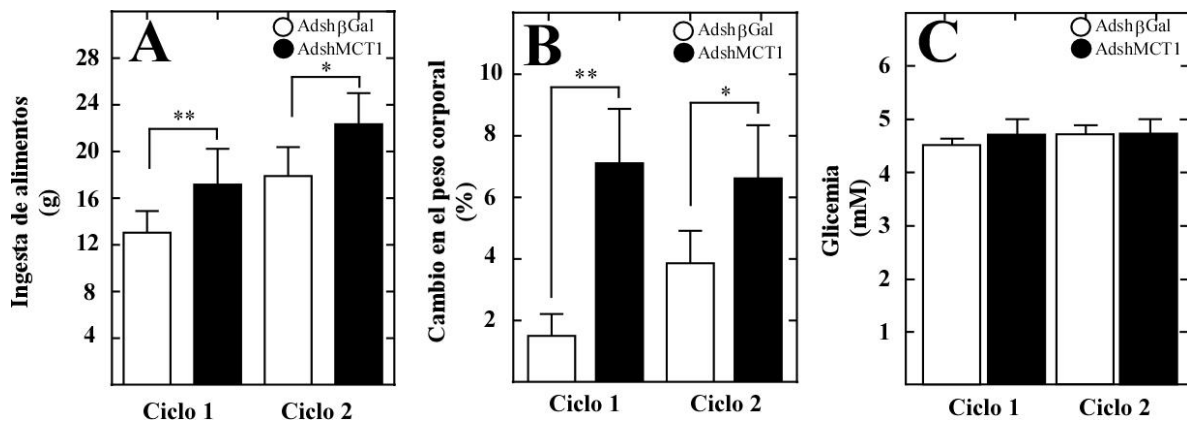
### **3.2. Evaluación de la inhibición de MCT1 sobre la frecuencia alimenticia.**

Debido a que los animales *knockdown* para MCT1 presentan una mayor ingesta de alimentos, evaluamos el número de eventos de alimentación (EA) durante las etapas de realimentación de los ciclos 1 y 2.

Los EA fueron definidos como periodos de permanencia en el comedero que superaron los 5 s, separados entre si por periodos iguales o superiores a 10 min. Cuando el EA excedió los 30 min, fue considerado como dos EA de 15 min cada uno, y fue considerado un tiempo de intervalo entre comidas de 0 min entre ellos. Los EA fueron graficados en un promedio de 24 h de cada ciclo de realimentación.

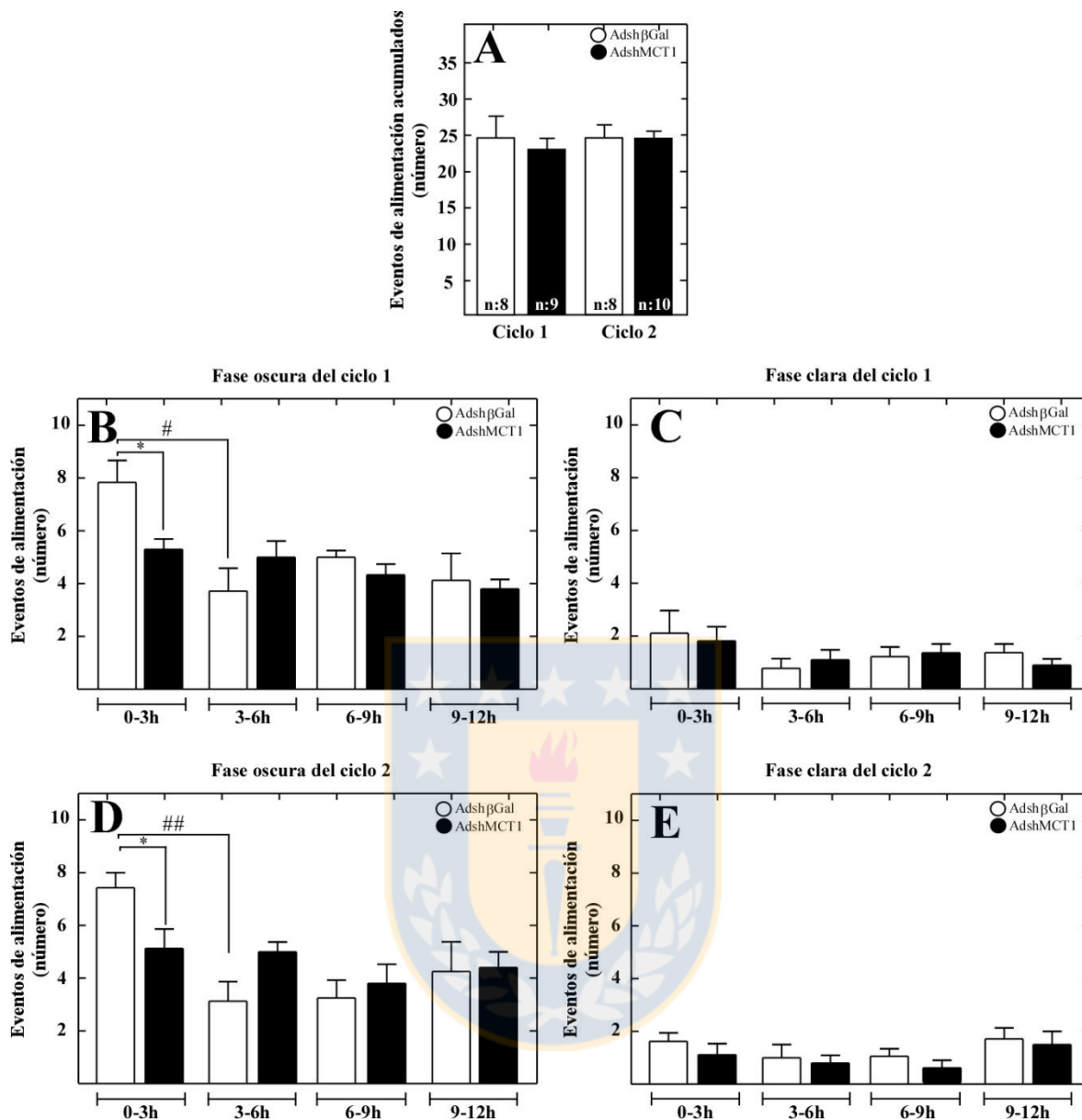


El número de los EA acumulados durante 24 h de realimentación, fue de aproximadamente 25 eventos y no se detectaron diferencias significativas entre los animales inhibidos para MCT1 (Fig. 29A, barras negras) y los animales controles (Fig. 29A, barras blancas), en ambos ciclos. Debido a que el equipo que utilizamos para evaluar la ingesta, monitorea de forma continua la frecuencia de alimentación, procedimos a realizar un análisis detallado graficando los EA en intervalos de tiempo de 3 h de duración, durante la fase oscura (entre las 19:00 p.m y las 7:00 a.m) y la fase clara de la alimentación (entre las 7:00 a.m y las 19:00 pm). Durante las primeras 3 h de la fase oscura, los animales *knockdown* para MCT1 realizaron aproximadamente 5 EA y los animales controles realizaron aproximadamente 8 EA, tanto en el ciclo 1 (Fig. 29B) como en el ciclo 2 (Fig. 29D). En los animales del grupo control, se observó que en el segundo intervalo de tiempo del ciclo 1 (3-6 h), los EA se reducen significativamente en un 50% (Fig. 29B, barras blancas), sin embargo, el número de EA de los animales inhibidos para MCT1, es igual al observado durante el primer intervalo de tiempo (Fig. 29B, barras negras). No fueron detectadas diferencias significativas entre el grupo control e inhibido, en los siguientes intervalos de tiempo analizados de la fase oscura. Estas diferencias son mantenidas durante el ciclo 2 (Fig. 29D). Interesantemente, los EA durante la fase oscura en animales inhibidos, no presentan diferencias significativas entre los diferentes intervalos de tiempo analizados, sugiriendo que estos se mantienen comiendo constantemente durante las primeras 12 h de alimentación, mientras que en el grupo control, los EA claramente se concentran durante las primeras 3 h de alimentación. No observamos diferencias de los EA entre el grupo control e inhibido, durante la etapa clara de alimentación del ciclo 1 (Fig. 29C) y ciclo 2 (Fig. 29E).



**Figura 28. Los animales *knockdown* para MCT1 presentan un incremento sostenido de la ingesta de alimentos y del peso corporal.**

**A:** Cuantificación de la ingesta de alimentos durante 24 h luego de realimentación en ciclos 1 y 2 en ratas transducidas por 96 h con Adsh $\beta$ Gal (barras blancas) o AdshMCT1 (barras negras), expresados en g por cada 200 g de peso animal. **B:** Cambio en el peso corporal durante 24 h luego de realimentación en ciclos 1 y 2, en ratas transducidas con Adsh $\beta$ Gal (barras blancas) o AdshMCT1 (barras negras), expresado en porcentaje (%) de variación del peso corporal en comparación al peso inicial de re-alimentación. **C:** Cuantificación de la glicemia después de la condición de ayuno en ciclo 1 y 2, en ratas transducidas con Adsh $\beta$ Gal (barras blancas) o AdshMCT1 (barras negras). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  (t-test, no pareado);  $n = 8$ .



**Figura 29. Los animales *knockdown* para MCT1 presentan una disminución de la frecuencia alimenticia al inicio de la etapa oscura.**

**A:** Análisis de la frecuencia alimenticia acumulada durante 24 h después de la realimentación en ciclos 1 y 2, en ratas transducidas con AdshβGal (barras blancas) o AdshMCT1 (barras negras). **B-C:** Análisis detallado de la frecuencia alimenticia en intervalos de 3 h de duración en la fase oscura (B) y clara (C) del ciclo 1. **D-E:** Análisis detallado de la frecuencia alimenticia en intervalos de 3 h de duración en la fase oscura (D) y clara (E) del ciclo 2. \*, #  $p < 0,05$ ; \*\*, ##  $p < 0,01$  (t-test, no pareado);  $n = 8$ .

### 3.3. Análisis del establecimiento de la saciedad en animales inhibidos para MCT1.

Entre los parámetros utilizados para evaluar comportamiento alimenticio, se encuentra el periodo de tiempo entre cada comida, definido como intervalo entre comidas (IEC). Este parámetro aumenta cuando los animales están saciados y disminuye cuando sienten hambre.

Al graficar la duración de los IEC, detectamos que durante las primeras 3 h de la realimentación, la duración de los intervalos es significativamente mayor en los animales inhibidos para MCT1, alcanzando una duración promedio de 19,6 min para los animales *knockdown* para MCT1 y 12,9 min en el grupo control (Fig. 30A). Este comportamiento es reproducible en el segundo ciclo de re-alimentación, alcanzando 24,1 min en el grupo *knockdown* para MCT1 y 7,6 min en el grupo control, durante el primer intervalo de tiempo del ciclo 2 (Fig. 30B). Durante el ciclo 1, también es posible observar un aumento significativo en la duración del IEC en los animales inhibidos para MCT1, específicamente durante el tercer intervalo de tiempo (Fig. 30A), sin embargo este incremento no es reproducible durante el segundo ciclo (Fig. 30B). A pesar de que no observamos diferencias significativas en los demás intervalos de tiempo analizados, es posible detectar un incremento sostenido en la duración de los intervalos entre comidas en el grupo control (Fig. 30A-B, barras blancas), incremento que no es evidente en los animales *knockdown* para MCT1 (Fig. 30A-B, barras negras).

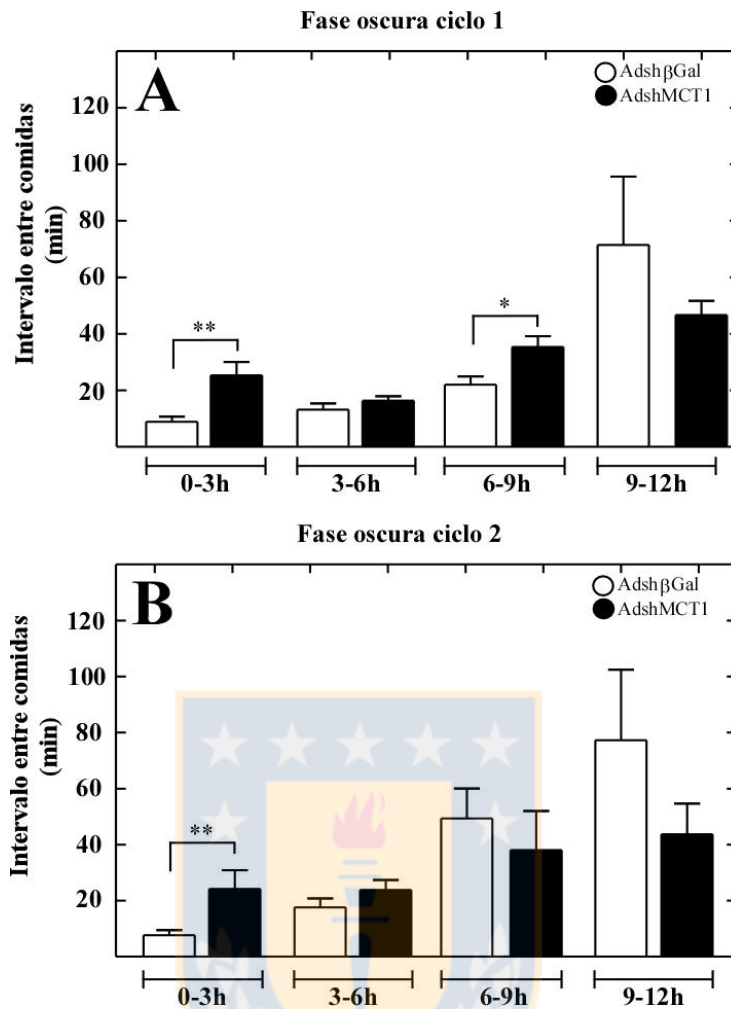
Interesantemente, los resultados muestran diferencias significativas en la duración de los intervalos entre comidas, en el mismo intervalo de tiempo que observamos diferencias en la frecuencia alimenticia, ambos parámetros utilizados para evaluar saciedad, lo que sugiere que la inhibición de MCT1 es capaz de alterar los mecanismos de regulación de la ingesta alimenticia, produciendo un retraso en la iniciación de una nueva comida,

reduciendo la frecuencia alimenticia durante las primeras 3 h de realimentación de ambos ciclos de alimentación.

En paralelo, utilizando los datos obtenidos para la evaluación de la ingesta alimenticia, fue posible determinar la velocidad de alimentación (mg/min), duración promedio de la comida (g/min) y el tamaño promedio de la comida (g/comida), durante los ciclos 1 y 2 de alimentación. Sin embargo, estos valores no pudieron ser detallados en intervalos de tiempo, debido a que las cajas de alimentación, carecen de un sistema de monitoreo que nos permita observar variaciones en la cantidad de alimentos en tiempo real, permitiéndonos hacer un análisis solo a tiempos finales de cada ciclo de alimentación.

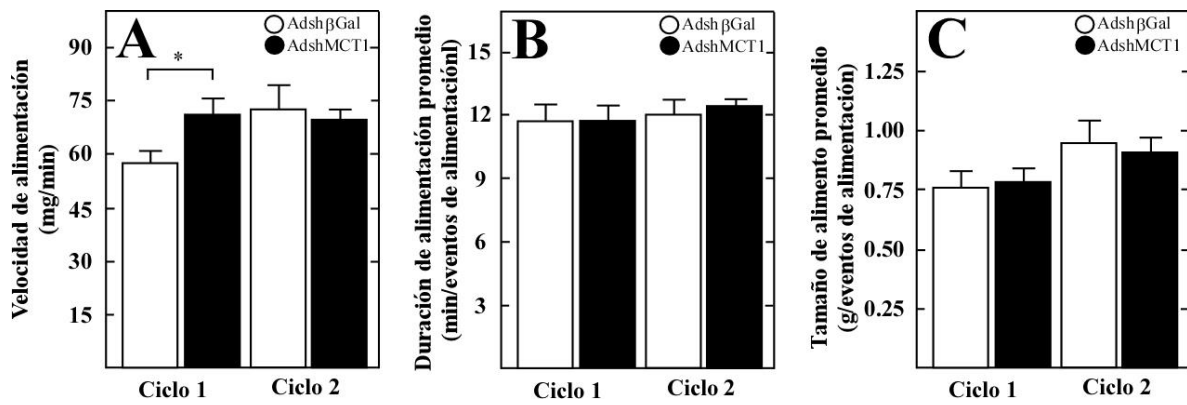
Detectamos que la velocidad de alimentación promedio de los animales *knockdown* para MCT1 es significativamente mayor durante el primer ciclo (Fig. 31A, barra negra ciclo 1) en comparación con el grupo control, correlacionándose al elevado y significativo incremento de la ingesta alimenticia, observado durante el primer ciclo de alimentación (Fig. 28A). Sin embargo, no detectamos diferencias en la velocidad de alimentación durante el segundo ciclo de alimentación (Fig. 31A, barra negra ciclo 2), periodo donde se observó un incremento en la ingesta alimenticia más discreto que durante el ciclo 1.

No detectamos diferencias significativas en parámetros asociados a saciedad entre entre los animales controles y los *knockdown* para MCT1, específicamente en la duración de la alimentación promedio (Fig. 31B) y en el tamaño promedio de los alimentos ingeridos (Fig. 31C).



**Figura 30. Los animales *knockdown* para MCT1 presentan una mayor saciedad.**

**A-B:** Cuantificación de los tiempos de duración de los intervalos entre las comidas, en ratas transducidas con AdshβGal (barras blancas) y AdshMCT1 (barras negras), ocurridos en intervalos de 3 h de duración de las fases oscuras de los ciclos 1 (A) y 2 (B). En la condición control (barras blancas), la duración de los tiempos entre las comidas aumenta a medida que transcurren las horas de la fase oscura, sin embargo en la condición *knockdown* para MCT1, los tiempos de duración de los intervalos permanecen constantes, sugiriendo una alteración en la señalización de saciedad. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$  (t-test, no pareado);  $n = 8$ .



**Figura 31. La velocidad alimenticia se encuentra aumentada en animales *knockdown* para MCT1.**

**A:** Determinación de la velocidad de alimentación durante el ciclo 1 y ciclo 2 en ratas transducidas con AdshβGal (barras blancas) y AdshMCT1 (barras negras). **B:** Análisis de la duración promedio de los eventos de alimentación en ratas transducidas con AdshβGal (barras blancas) y AdshMCT1 (barras negras) durante los ciclos 1 y 2. **C:** Determinación del tamaño promedio de la comida ingerida en los eventos de alimentación durante los ciclos 1 y 2, en ratas transducidas con AdshβGal (barras blancas) y AdshMCT1 (barras negras). \*,  $p < 0,05$  (t-test, no pareado);  $n=8$ .

### 3.4. Disminución de la ingesta alimenticia en animales *knockdown* para MCT4.

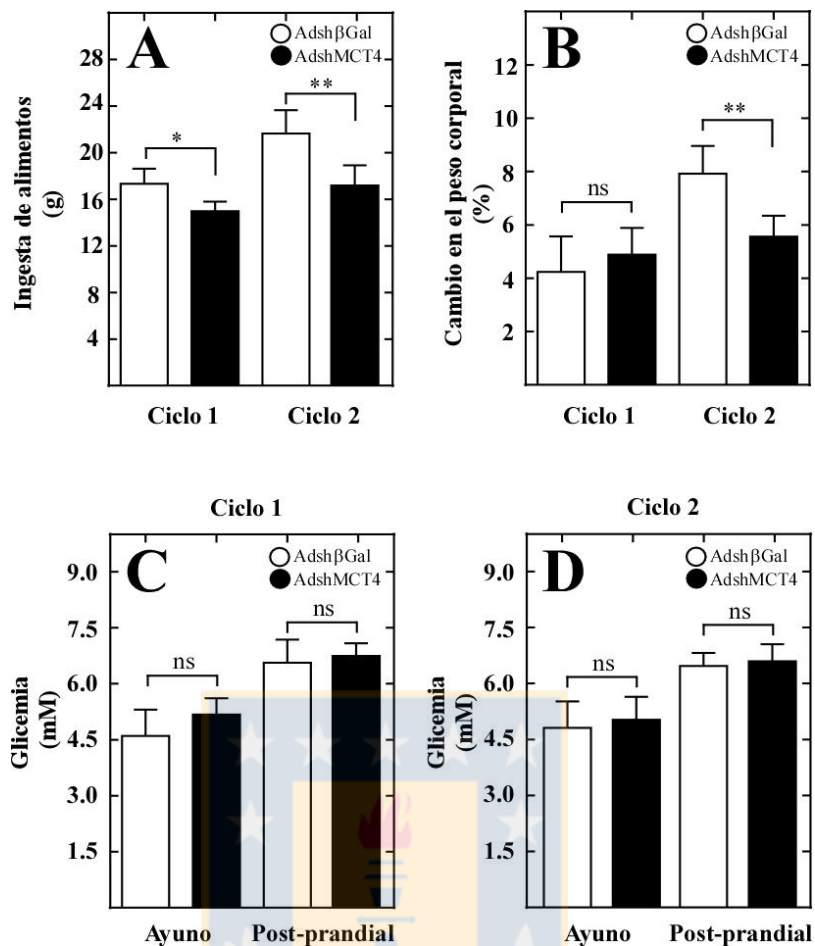
Los resultados obtenidos, indican que la inhibición de MCT1 produce un incremento en la ingesta alimenticia. Ya que los procesos de tanicitos MCT1 positivos, contactan principalmente a las neuronas orexigénicas, mientras que los procesos de tanicitos MCT4 positivos, contactan a neuronas anorexigénicas, decidimos evaluar si la ingesta alimenticia es alterada en animales *knockdown* para MCT4.

La inhibición de MCT4, generó una disminución significativa de la ingesta alimenticia en ambos ciclos (Fig. 32A-B). Los animales *knockdown* para MCT4 consumen 2,3 g por debajo la cantidad de alimentos consumidos por el grupo control (Fig. 32A, barra blanca) durante el ciclo 1 y 4,4 g menos durante el ciclo 2 (Fig. 32A, barras negras).

La disminución en la ingesta alimenticia no es capaz de producir cambios en el peso corporal durante el ciclo 1 (Fig. 32B, barra negra ciclo 1). Sin embargo, durante el ciclo 2, se observa una disminución en un 2,3% del peso corporal (Fig. 32B, barra negra ciclo 2) comparados al grupo control, lo cual se relaciona con una mayor disminución de la ingesta alimenticia en este ciclo (Fig. 32A, barra negra ciclo 2).

Decidimos evaluar si la condición *knockdown* para MCT4, genera variaciones en la concentración de glucosa sistémica en una condición de ayuno, es decir antes del inicio de la realimentación, y post-prandialmente, al finalizar la realimentación. No detectamos variaciones en la concentración de glucosa sanguínea en ninguna de las condiciones evaluadas, tanto en el ciclo 1 (Fig. 32C, barras negras) como en el ciclo 2 (Fig. 32D, barras negras) manteniéndose en rangos de concentración normales para una condición de hipoglicemia y normoglicemia, sugiriendo que el *knockdown* de MCT4, no afecta la concentración de glucosa periférica.





**Figura 32. El *knockdown* de MCT4 produce una disminución de la ingesta de alimentos.**

**A:** Cuantificación de la ingesta de alimentos durante 24 h luego de realimentación en ciclos 1 y 2 en ratas transducidas por 96 h con AdshβGal (barras blancas) o AdshMCT4 (barras negras), expresados en g por cada 200 g de peso animal. **B:** Cambio en el peso corporal durante 24 h luego de realimentación en ciclos 1 y 2, en ratas transducidas con AdshβGal (barras blancas) o AdshMCT4 (barras negras), expresado en porcentaje (%) del peso corporal. **C-D:** Cuantificación de la glicemia después de la condición de ayuno en ciclo 1 y 2 (C) y después de la realimentación de 24 h (D), en ratas transducidas con AdshβGal (barras blancas) o AdshMCT4 (barras negras). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  (t-test, no pareado);  $n = 8$ .

### 3.5. La frecuencia alimenticia aumenta en animales *knockdown* para MCT4.

Decidimos evaluar si la disminución en la ingesta alimenticia en animales *knockdown* para MCT4 se relaciona con una disminución de los eventos de alimentación de los ciclos 1 y 2. Sorprendentemente, los animales *knockdown* para MCT4 poseen 6 EA más que el grupo control durante el ciclo 1 (Fig. 33A, barra negra ciclo 1), diferencia que se mantiene durante el ciclo 2 (Fig. 33A, barra negra ciclo 2).

Al analizar los EA en intervalos de tiempo de 3 h de duración, observamos que durante las primeras 3 horas de realimentación de la fase oscura, tanto los animales *knockdown* para MCT4 como los animales controles realizaron 4 EA, número de eventos que es replicado durante las siguientes 3 h de realimentación (Fig. 33B, barras negras).

En los animales del grupo control, se observó que en el tercer intervalo de tiempo del ciclo 1 (6-9 h), los EA se reducen significativamente en un 50% (Fig. 33B, barras blancas), sin embargo, el número de EA de los animales inhibidos para MCT1, es igual al observado durante el primer y segundo intervalo de tiempo (Fig. 33B, barras negras). Esta diferencia de EA se mantiene en el cuarto y último intervalo de tiempo de la fase oscura. Las diferencias observadas durante la fase oscura del ciclo 1 son mantenidas durante el ciclo 2 (Fig. 33D). Interesantemente, al igual que lo observado en animales *knockdown* para MCT1, los EA durante la fase oscura en animales inhibidos, no presentan diferencias significativas entre los diferentes intervalos de tiempo analizados, sugiriendo que estos se mantienen comiendo constantemente durante las primeras 12 h de alimentación, mientras que en el grupo control, los EA se concentran durante las primeras 6 h de alimentación. No observamos diferencias de los EA entre el grupo control e inhibido, durante la etapa clara de alimentación del ciclo 1 (Fig. 33C) y ciclo 2 (Fig. 33E), de igual manera a lo observado en animales *knockdown* para MCT1.

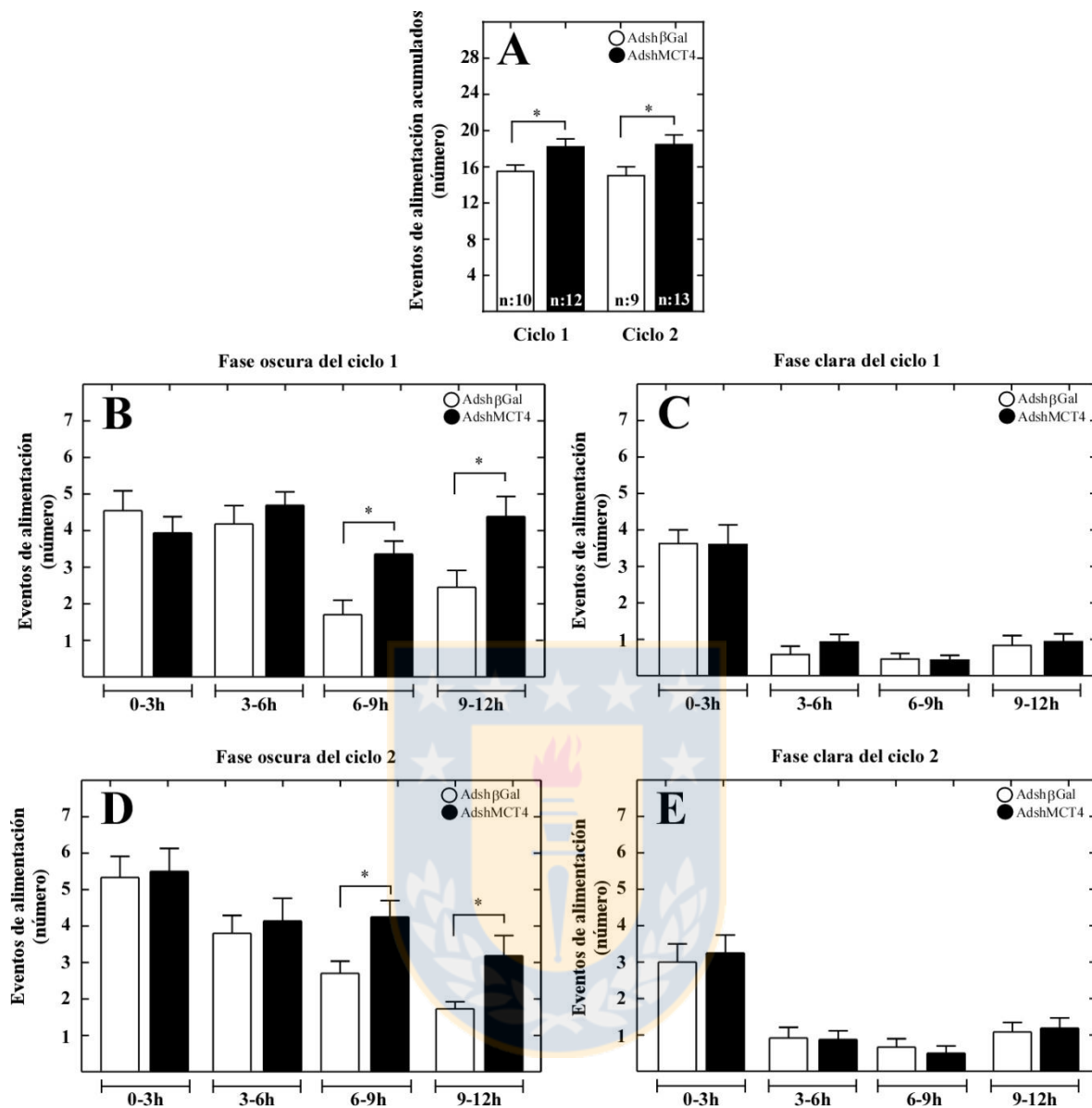
### **3.6. Los animales *knockdown* para MCT4 presentan problemas en el establecimiento de la saciedad.**

Posteriormente, evaluamos si las IEC sufren alteraciones en los animales inhibidos para MCT4. Al graficar la duración de los IEC, detectamos que durante las primeras 6 h de la realimentación, la duración de los intervalos en los animales *knockdown* para MCT4, es similar a la observada en los animales controles, alcanzando una duración promedio de 24,8 min para los animales *knockdown* para MCT1 y 22,9 min en el grupo control (Fig. 34A), similar a lo observado durante segundo ciclo de re-alimentación (Fig. 34B). Sin embargo, durante el tercer y cuarto intervalo de tiempo de la fase oscura, la duración de los intervalos es significativamente mayor en los animales inhibidos para MCT4, alcanzando una duración promedio de 27,2 min para los animales *knockdown* para MCT4 y 56,8 min en el grupo control (Fig. 34A). Este comportamiento es reproducible en el segundo ciclo de re-alimentación, alcanzando un promedio de 32,6 min en el grupo *knockdown* para MCT4 y 74,8 min en el grupo control, durante el primer tercer y cuarto intervalo de tiempo del ciclo 2 (Fig. 34B).

Interesantemente, fuimos capaces de observar un incremento sostenido en la duración de los intervalos entre comidas en el grupo control (Fig. 34A-B, barras blancas), mientras que este incremento que no es evidente en los animales *knockdown* para MCT4, similar a los resultados obtenidos en animales *knockdown* para MCT1 (Fig. 30A-B, barras negras). Las alteraciones observadas en los IEC, ocurren en los mismos intervalos de tiempo que observamos diferencias en la frecuencia alimenticia, sugiriendo que la inhibición de MCT4, al igual que MCT1, altera los mecanismos de regulación de la ingesta alimenticia. Sin embargo en los animales *knockdown* para MCT4, se produce una aceleración en la iniciación de una nueva comida, incrementado la frecuencia alimenticia

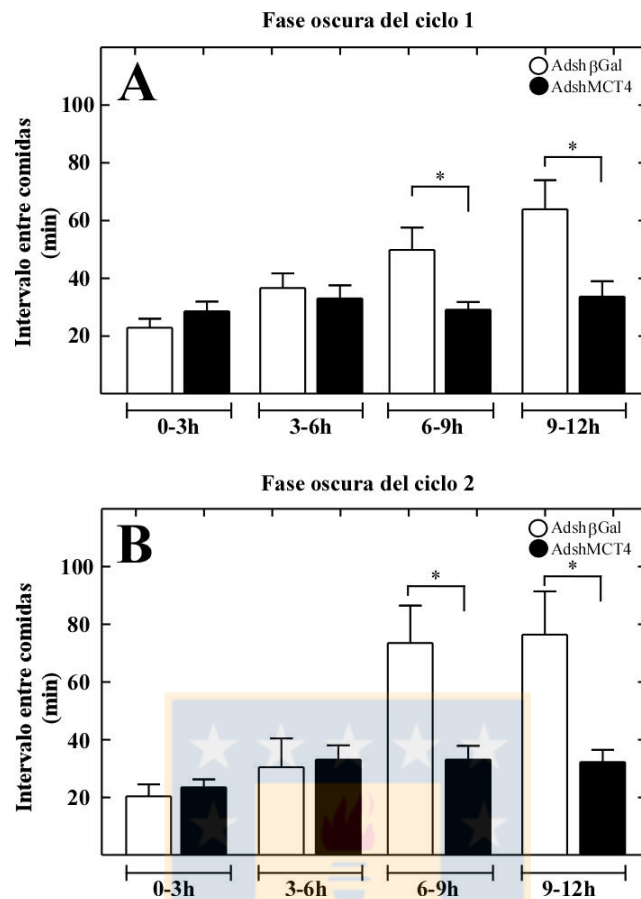
durante las últimas 6 h de realimentación de la fase oscura, de ambos ciclos de alimentación (Fig. 33B y D).

Interesantemente, al evaluar la velocidad de alimentación promedio de los animales *knockdown* para MCT4, detectamos una disminución significativa en la velocidad de alimentación durante el primer y segundo ciclo de realimentación (Fig. 35A) en comparación con el grupo control. La disminución en la velocidad de alimentación, se encuentra asociada a un incremento de la saciedad, directamente asociada a la disminución de la ingesta de alimentos observada en los animales inhibidos para MCT4, y con el tamaño promedio de los alimentos ingeridos, el cual es significativamente menor en animales *knockdown* para MCT4 comparados al grupo control (Fig. 35C). No detectamos diferencias significativas en la duración de la alimentación promedio (Fig. 35B). De tal forma que los animales inhibidos para MCT4, presentan un mayor número de EA, sin embargo se sacian rápidamente, al poseer una menor velocidad de alimentación, un menor tamaño de alimentos ingerido y una menor ingesta de alimentos.



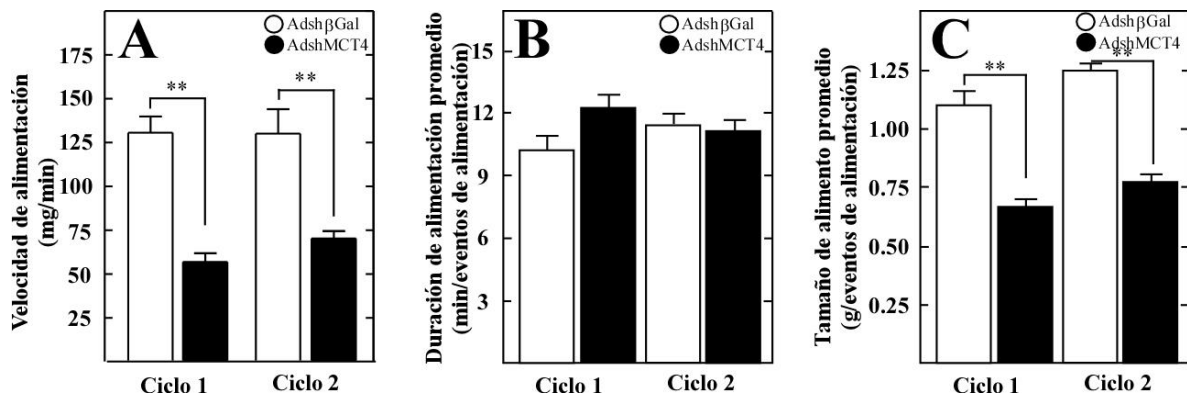
**Figura 33. Knockdown para MCT4 incrementa la frecuencia alimenticia al final de la etapa oscura.**

**A:** Análisis de la frecuencia alimenticia acumulada durante 24 h después de la realimentación en ciclos 1 y 2, en ratas transducidas con AdshβGal (barras blancas) o AdshMCT4 (barras negras). **B-C:** Análisis detallado de la frecuencia alimenticia en intervalos de 3 h de duración en la fase oscura (B) y clara (C) del ciclo 1. **D-E:** Análisis detallado de la frecuencia alimenticia en intervalos de 3 h de duración en la fase oscura (D) y clara (E) del ciclo 2. \*, #  $p < 0,05$ ; \*\*, ##  $p < 0,01$  (t-test, no pareado); n=9.



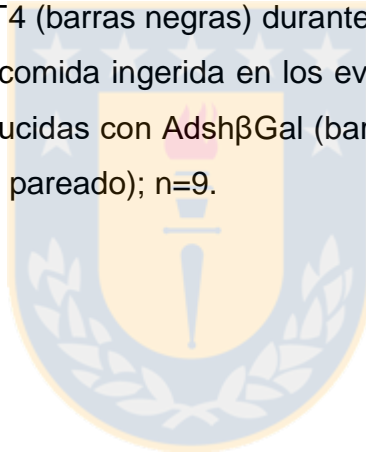
**Figura 34. El *knockdown* de MCT4 produce una disminución de la saciedad.**

**A-B:** Cuantificación de los tiempos de duración de los intervalos entre las comidas, en ratas transducidas con AdshβGal (barras blancas) y AdshMCT4 (barras negras), ocurridos en intervalos de 3 h de duración de las fases oscuras de los ciclos 1 (A) y 2 (B). En la condición control (barras blancas), la duración de los tiempos entre las comidas aumenta a medida que transcurren las horas de la fase oscura, sin embargo en la condición *knockdown* para MCT4, los tiempos de duración de los intervalos permanecen constantes, sugiriendo una alteración en la señalización de saciedad. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$  (t-test, no pareado);  $n=9$ .



**Figura 35. Los animales *knockdown* para MCT4 poseen una menor velocidad de alimentación y consumen un menor tamaño de alimento promedio.**

**A:** Determinación de la velocidad de alimentación durante el ciclo 1 y ciclo 2 en ratas transducidas con AdshβGal (barras blancas) y AdshMCT4 (barras negras). **B:** Análisis de la duración promedio de los eventos de alimentación en ratas transducidas con AdshβGal (barras blancas) y AdshMCT4 (barras negras) durante los ciclos 1 y 2. **C:** Determinación del tamaño promedio de la comida ingerida en los eventos de alimentación durante los ciclos 1 y 2, en ratas transducidas con AdshβGal (barras blancas) y AdshMCT4 (barras negras). \*,  $p < 0,05$  (t-test, no pareado);  $n=9$ .



### **3.7. Los animales doble *knockdown* para MCT1 y MCT4, presentan un incremento en su ingesta alimenticia.**

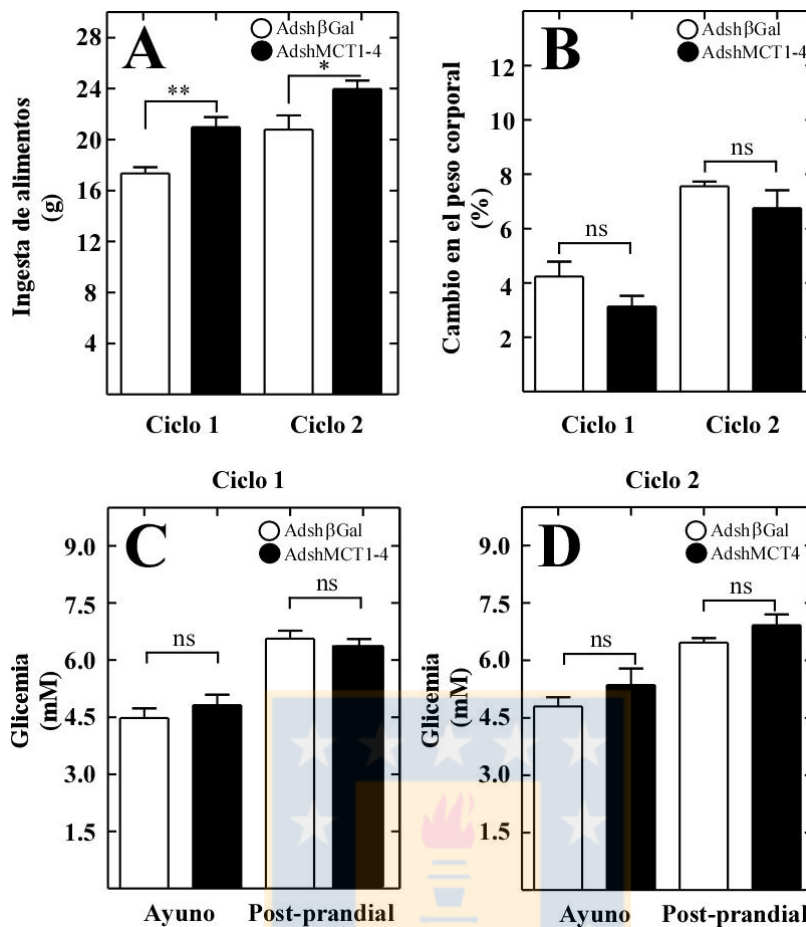
Interesantemente, la inhibición MCT1 y MCT4 por separado, poseen una alteración diferencial de la ingesta de alimentos. La inhibición de MCT1 produce un incremento en la ingesta de alimentos y un retraso de la saciedad, mientras que la inhibición de MCT4, produce una disminución de la ingesta de alimentos y una aceleración de la saciedad.

Evaluamos si la inhibición de ambos transportadores, es capaz de favorecer algunas de las observaciones vistas por separado.

Los resultados obtenidos demuestran que la inhibición de MCT1 y MCT4, produce un incremento significativo de la ingesta de alimentos, tanto en el ciclo 1 como en el ciclo 2 (Fig. 36A). Los animales doble *knockdown* para MCT1 y MCT4 consumen 2,9 g por sobre la cantidad de alimentos consumidos por el grupo control (Fig. 36A, barra negra ciclo 1) durante el ciclo 1 y 1,6 g más durante el ciclo 2 (Fig. 36A, barra negra ciclo 2). Sin embargo, el incremento de la ingesta de alimentos no generó cambios en el peso corporal, no detectando diferencias significativas con el grupo control, en ambos ciclos de alimentación (Fig. 36B, barras negras).

Los valores de glicemia en animales doble *knockdown* para MCT1 y MCT4, no presentaron diferencias significativas en comparación con los grupos controles, tanto en condiciones de ayuno como posterior a la realimentación del ciclo 1 (Fig. 36C, barra negra) y del ciclo 2 (Fig. 36D, barra negra), sugiriendo que el doble *knockdown* de MCT1 y MCT4, no altera la concentración de glucosa periférica.





**Figura 36. La inhibición de MCT1 y MCT4 produce incrementos de la ingesta de alimentos sin alterar el peso corporal y la glicemia.**

**A:** Cuantificación de la ingesta de alimentos durante 24 h luego de realimentación en ciclos 1 y 2 en ratas transducidas por 96 h con AdshβGal (barras blancas) o AdshMCT1 y AdshMCT4 (barras negras), expresados en g por cada 200 g de peso animal. **B:** Cambio en el peso corporal durante 24 h luego de realimentación en ciclos 1 y 2, en ratas transducidas con AdshβGal (barras blancas) o AdshMCT1 y AdshMCT4 (barras negras), expresado en porcentaje (%) del peso corporal. **C-D:** Cuantificación de la glicemia después de la condición de ayuno en ciclo 1 y 2 (C) y después de la realimentación de 24 h (D), en ratas transducidas con AdshβGal (barras blancas) o AdshMCT1 y AdshMCT4 (barras negras). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  (t-test, no pareado);  $n = 7$ .

### 3.8. La inhibición de MCT1 y MCT4, incrementa la frecuencia alimenticia.

Al evaluar el número de EA de los animales doble *knockdown* para MCT1 y MCT4, detectamos que estos poseen 4 EA más que el grupo control durante el ciclo 1 (Fig. 37A, barra negra ciclo 1), y 2 EA por sobre el grupo control durante el ciclo 2 (Fig. 37A, barra negra ciclo 2).

Al analizar los EA en intervalos de tiempo de 3 h de duración, observamos que durante el primer y segundo intervalo de la fase oscura del ciclo 1, los animales doble *knockdown* para MCT1 y MCT4 realizan aproximadamente 4 EA, al igual que el grupo control. Tampoco se observó diferencias en el tercer intervalo de tiempo, con un promedio de 3 EA (Fig. 37B). Sin embargo, en el cuarto intervalo de tiempo, los animales controles, disminuyen en un 50% el número de EA observados durante el primer y segundo intervalo, asociado a un establecimiento de la saciedad, pero los animales inhibidos para MCT1 y MCT4, mantienen los EA observados durante el primer y segundo intervalo de tiempo (Fig. 37B, barras negras). Observaciones similares, pueden ser detectadas durante el segundo ciclo de alimentación, en el cual los animales inhibidos para MCT1 y MCT4, presentan aproximadamente 4 EA, en los mismo intervalos de tiempo observados durante el primer ciclo (Fig. 37D, barras negras). Este comportamiento de frecuencia alimenticia, es similar al observado en los animales *knockdown* para MCT4, en la cual también se observa un incremento de la frecuencia alimenticia en el último intervalo de tiempo de la fase del ciclo 2 (Fig. 33D). Interesantemente, al igual que lo observado en animales inhibidos para MCT1 o inhibidos para MCT4, los EA en los animales doble *knockdown* para MCT1 y MCT4, mantienen constante el número de EA durante las primeras 12 h de alimentación, mientras que en el grupo control, los EA se concentran durante las primeras 6 h de alimentación. Al mismo tiempo, no observamos diferencias

de los EA entre el grupo control e inhibido, durante la etapa clara de alimentación del ciclo 1 (Fig. 37C) y ciclo 2 (Fig. 37E).

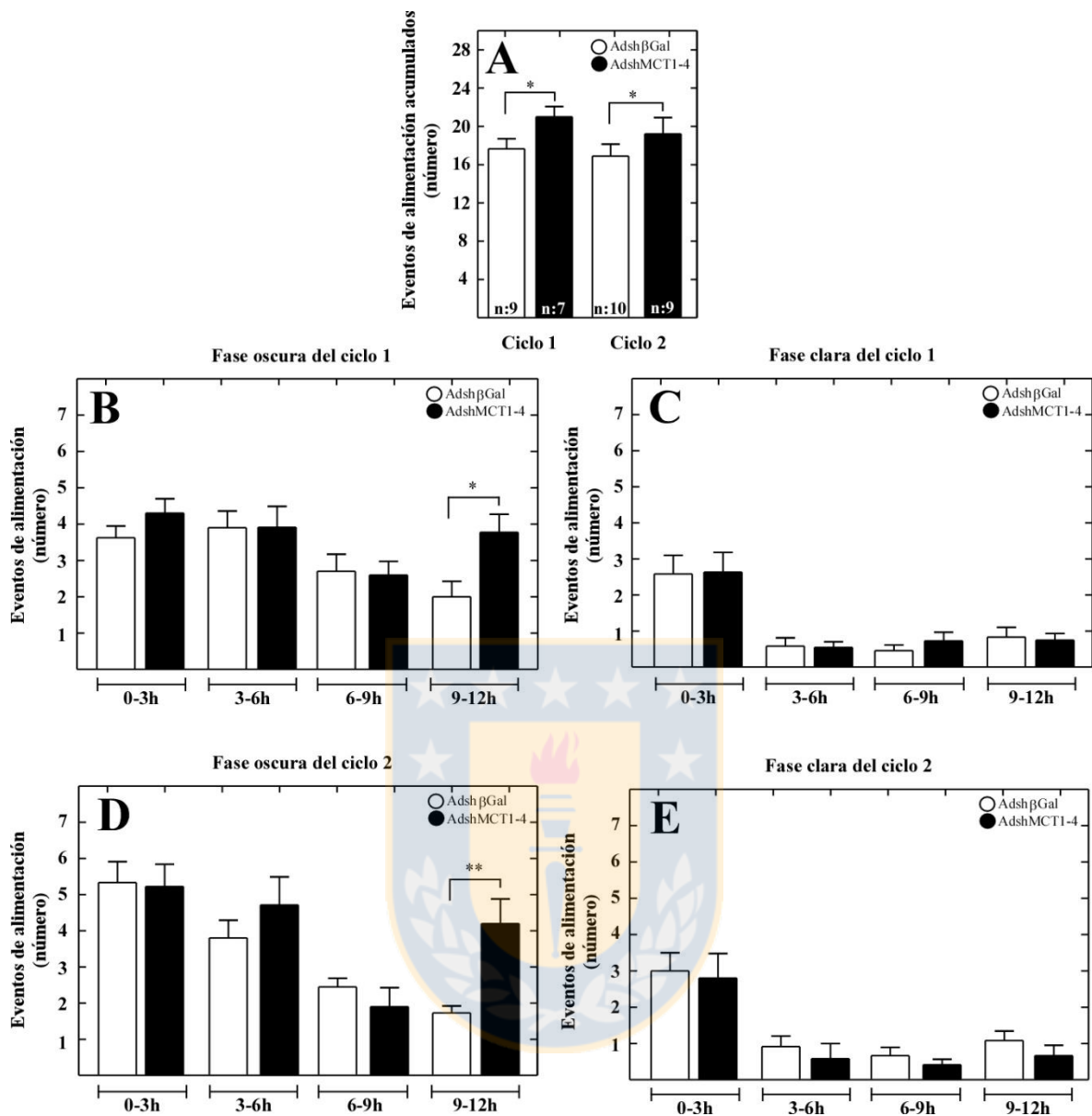
### **3.9. Los animales doble *knockdown* para MCT1 y MCT4, presentan alteración en el establecimiento de la saciedad.**

Al graficar la duración de los IEC, detectamos que durante las primeras 12 h de la realimentación del ciclo 1, la duración de los intervalos en los animales *knockdown* para MCT4 es similar en los diferentes intervalos de tiempo, alcanzando una duración promedio de 36,5 min para los animales *knockdown* para MCT1 y MCT4 (Fig 38A, barras negras). Sin embargo, en el grupo control es posible detectar un incremento paulatino de los tiempos de IEC, alcanzando una duración promedio de 74,5 min en el último intervalo de tiempo, marcando una diferencia significativa con los animales doble *knockdown* para MCT1 y MCT4 (Fig. 38A, barras blancas). Sorprendentemente, observamos diferencias en los IEC del ciclo 2 de realimentación. En este ciclo, detectamos que los IEC de los animales inhibidos para MCT1 y MCT4, incrementa sostenidamente durante las primeras 9 h de realimentación, similar a lo que ocurre en el grupo control (Fig. 38B, barras negras). Sin embargo, durante el cuarto intervalo de tiempo, el IEC disminuye en un 50% en los animales inhibidos para MCT1 y MCT4, mientras que el grupo control presenta un tiempo de IEC equivalente al doble del observado en la condición inhibida (Fig. 38B, barras negras).

El análisis de velocidad de ingesta alimenticia, indica que los animales inhibidos para MCT1 y MCT4 se alimentan a una menor velocidad que los animales control, en ambos ciclos de realimentación (Fig. 39A, barras negras). Sin embargo, la duración promedio de los EA es mayor para los animales *knockdown* para MCT1 y MCT4, superando por 2 min

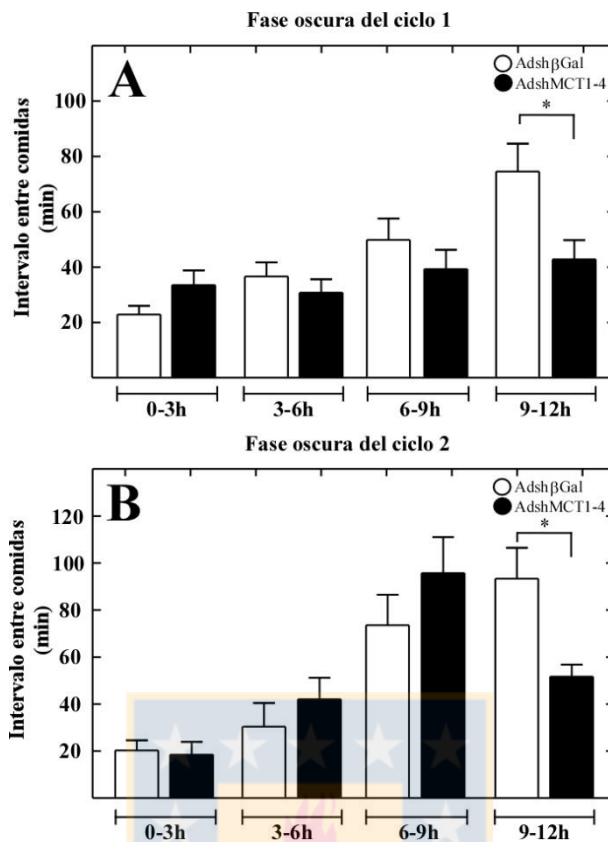
a la duración promedio de los EA del grupo control en ambos ciclos de realimentación (Fig. 39B, barras negras). No se detectaron diferencias en el tamaño promedio del alimento consumido con el grupo control (Fig. 39C). Interesantemente, los animales *knockdown* para MCT1 y MCT4, presentan una mayor ingesta alimenticia que grupos controles, la cual se caracteriza por poseer una menor velocidad de alimentación, pero sostenida en el tiempo, lo que queda de manifiesta por una mayor duración de los eventos de alimentación y una menor duración de los IEC, es decir una disminución de la saciedad.





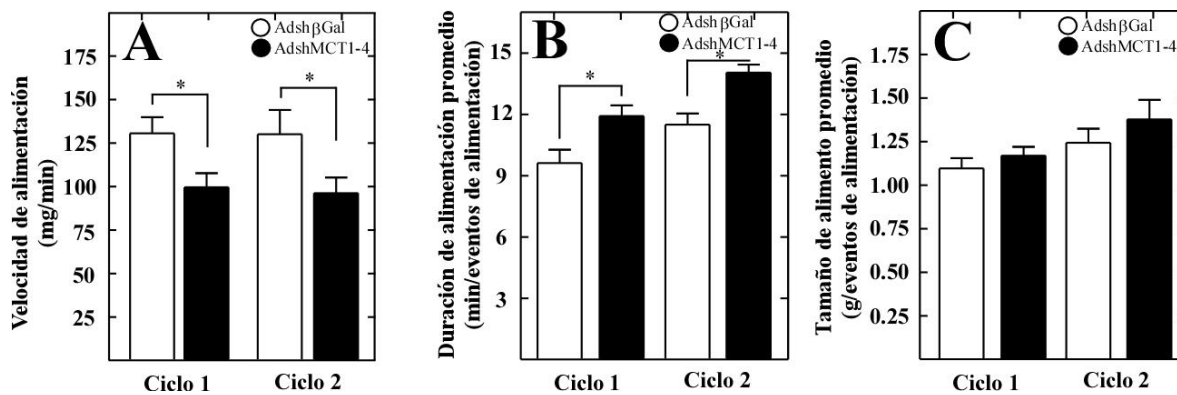
**Figura 37. El doble *knockdown* para MCT1 y MCT4 produce incrementos de la frecuencia alimenticia al final de la etapa oscura.**

**A:** Análisis de la frecuencia alimenticia acumulada durante 24 h después de la realimentación en ciclos 1 y 2, en ratas transducidas con AdshβGal (barras blancas) o AdshMCT4 (barras negras). **B-C:** Análisis detallado de la frecuencia alimenticia en intervalos de 3 h de duración en la fase oscura (B) y clara (C) del ciclo 1. **D-E:** Análisis detallado de la frecuencia alimenticia en intervalos de 3 h de duración en la fase oscura (D) y clara (E) del ciclo 2. \*, #  $p < 0,05$ ; \*\*, ##  $p < 0,01$  (t-test, no pareado); n=9.



**Figura 38. El doble *knockdown* de MCT1 y MCT4 produce una disminución de la saciedad.**

**A-B:** Cuantificación de los tiempos de duración de los intervalos entre las comidas, en ratas transducidas con AdshβGal (barras blancas) y AdshMCT4 (barras negras), ocurridos en intervalos de 3 h de duración de las fases oscuras de los ciclos 1 (A) y 2 (B). En la condición control (barras blancas), la duración de los tiempos entre las comidas aumenta a medida que transcurren las horas de la fase oscura, sin embargo en la condición *knockdown* para MCT1 y MCT4, los tiempos de duración de los intervalos permanecen constantes (A), sin embargo en el ciclo 2, a pesar de que el comportamiento de saciedad es similar al del control, se observa una disminución significativa en los tiempos de saciedad sugiriendo una alteración en esta señalización. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$  (t-test, no pareado);  $n=9$ .

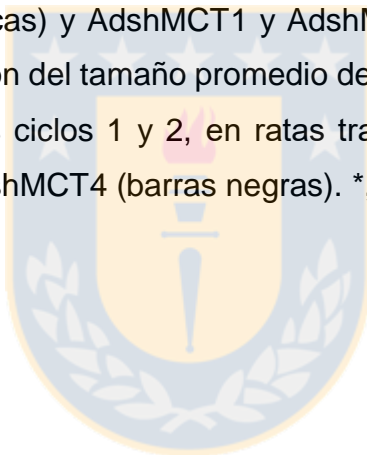


**Figura 39.** Los animales *knockdown* para MCT1 y MCT4 poseen una menor velocidad de alimentación y una mayor duración de la alimentación promedio.

**A:** Determinación de la velocidad de alimentación durante el ciclo 1 y ciclo 2 en ratas transducidas con AdshβGal (barras blancas) y AdshMCT1 y AdshMCT4 (barras negras).

**B:** Análisis de la duración promedio de los eventos de alimentación en ratas transducidas con AdshβGal (barras blancas) y AdshMCT1 y AdshMCT4 (barras negras) durante los ciclos 1 y 2.

**C:** Determinación del tamaño promedio de la comida ingerida en los eventos de alimentación durante los ciclos 1 y 2, en ratas transducidas con AdshβGal (barras blancas) y AdshMCT1 y AdshMCT4 (barras negras). \*,  $p < 0,05$  (t-test, no pareado);  $n=8$ .



## IV DISCUSIÓN

El acoplamiento glía-neurona regula importantes eventos fisiológicos y fisiopatológicos en diversas regiones cerebrales, incluyendo a la corteza, cerebelo e hipocampo. Estos eventos incluyen la sinaptogénesis (Cui et al., 2001), infarto cerebral, formación de memoria a largo plazo y funciones metabólicas (reciclamiento de glutamato, fijación de amonio, almacenamiento de glicógeno, mantención del metabolismo energético neuronal y detoxificación de radicales libres) (Pellerin et al., 1998; Ransom et al., 2003). Cada vez es más claro que el mecanismo glucosensor del hipotálamo es otro ejemplo de acoplamiento metabólico entre dos tipos celulares. En esta tesis, hemos generado una herramienta molecular eficiente, capaz de realizar una reducción en la expresión de MCT1 y MCT4, tanto *in vitro* como *in vivo*. Finalmente, hemos demostrado que la inhibición en tanicitos genera un cambio en la expresión de neuropéptidos hipotalámicos y una alteración del comportamiento alimenticio.

### **4.1. Rol de MCT1 en el acoplamiento metabólico tanicito-neurona como modelo para la detección de glucosa en el hipotálamo.**

Los animales *knockdown* para MCT1, presentan una evidente pérdida de respuesta a la inyección i.c.v. de glucosa, lo que queda de manifiesto al observar alteraciones en la expresión de neuropéptidos orexígenos y anorexígenos (Elizondo-Vega et al., 2016), y una alteración del comportamiento alimenticio. Estos datos apoyan el rol de MCT1 en el mecanismo glucosensor hipotalámico.

Recientemente, ha surgido evidencia, que sumado a nuestros hallazgos, indican que MCT1 regula el balance energético. Es así como se ha demostrado que los animales



*knockout* para MCT1 no son viables; sin embargo, los animales heterocigotos para MCT1<sup>+/-</sup> si lo son, los que presentan resistencia a desarrollar obesidad inducida por una dieta rica en grasas. Potenciado el rol de MCT1 en el comportamiento alimenticio, y convirtiéndolo en un posible blanco terapéutico para la obesidad (Lengacher et al., 2013). Sin embargo, para tener la certeza de que la inhibición de los transportadores de monocarboxilatos se produce solo en tanicitos, habría sido ideal contar con animales *knockout* inducibles de forma específica en tanicitos, o con un adenovirus que contenga un promotor específico para tanicitos en conjunto con la expresión de un shARN. Al respecto, elegir un promotor que se exprese específicamente en tanicitos es complejo, ya que GFAP se expresa en bajos niveles en las diferentes subpoblaciones de tanicitos y en elevados niveles en astrocitos localizados en la región subependimaria. Por otro lado vimentina, es la proteína de filamentos intermedios mayormente expresada en tanicitos, sin embargo también es expresada por células endoteliales que controlan la incorporación de monocarboxilatos a través de la barrera hematoencefálica (Cortes-Campos et al., 2011). Otro posible candidato es nestina, el cual es expresado en todas las poblaciones de tanicitos y no es expresado en astrocitos subependimarios (Robins et al., 2013). Por otro lado, nestina es expresado en células capaces de realizar neurogénesis, como recientemente ha sido demostrado para la subpoblación de tanicitos  $\alpha$  y  $\beta$  (Lee et al., 2012a), las que podrían encontrarse en etapas intermedias para la formación de nuevas neuronas; de todas formas sería un buen candidato, ya que la neurogenesis hipotalámica es de aproximadamente un 17% (Lee et al., 2012a).

En este trabajo de tesis, el adenovirus utilizado presenta un tropismo favorable hacia células gliales, lo que cual también ha sido descrito por otros autores (Aschauer et al., 2013; Duale et al., 2005). De acuerdo a la localización y características morfológicas de

las células EGFP positivas observadas *in situ*, en conjunto con la expresión de vimentina y GFAP, nuestros resultados muestran que las partículas adenovirales transducen preferencialmente a las células ependimarias que en la región basal corresponden a los tanicitos, y no a astrocitos o neuronas.

Estudios de inmunolocalización han demostrado que los MCTs poseen una distribución preferencial en la región basal del hipotálamo, de tal forma que MCT1 y MCT4 se localizan en los tanicitos (Cortes-Campos et al., 2011), mientras que MCT2 se localiza en las neuronas orexigénicas y anorexigénicas del NA (Cortes-Campos et al., 2013). En este contexto, la detección inmunohistoquímica o de *western blot* de MCT1 o MCT4, es particularmente compleja, debido a que requiere de la utilización de un gran número de animales para obtener cantidades de proteínas suficientes que permitan su detección. Con el objetivo de seguir los principios éticos para el uso de animales de laboratorio, intentamos reducir, reemplazar o refinar el uso de animales utilizados en la tesis y optar por un método más sensible para evaluar cambios en la expresión de MCT1 y/o MCT4. Esto fue conseguido al realizar un análisis de q-RT-PCR, los que se encuentran estrechamente asociados a cambios en la expresión proteica. De esta manera, hemos demostrado que el shARN para MCT1 produce una disminución significativa en la expresión del ARNm para MCT1, sin embargo, también es posible detectar una disminución en la expresión del ARNm para MCT2 (Elizondo-Vega et al., 2016). Esta reducción en la expresión de MCT2, no es producida por una baja especificidad del shARN utilizado, ya que, de acuerdo a su secuencia, no es capaz de hibridar con el ARNm de MCT2. Al respecto, ha sido demostrado que MCT2 es sobreexpresado por incrementos en la concentración extracelular de monocarboxilatos (Matsuyama et al., 2009), como también ha sido informado en cerebros neonatales, cuyos elevados niveles

de cuerpos cetónicos, provenientes de la oxidación hepática de lípidos de la leche materna, produce mayores niveles de expresión que en estadios adultos (Cremer, 1982; Dombrowski et al., 1989; Hawkins et al., 1971). Por lo tanto es posible sugerir que la inhibición de MCT1 produce una disminución en la liberación de monocarboxilatos lo que podría producir la disminución en la expresión de MCT2.

Los circuitos neuronales hipotalámicos, cumplen un importante rol en el control de la alimentación, la cual es regulada por una señalización mediada por hormonas y nutrientes (Elias et al., 1998; Fuente-Martin et al., 2016; Levin et al., 2004). Estas señales impactan a neuronas del NA, regulando la expresión y liberación de neuropéptidos orexigénicos y anorexigénicos (Lam et al., 2005; Nakazato et al., 2001; Schwartz et al., 2000). Ha sido demostrado que durante el ayuno, la expresión de NPY y AgRP aumenta, mientras que después de una inyección i.c.v. de glucosa, los niveles de POMC y CART aumentan (Archer et al., 2005; Bady et al., 2006). Nuestros resultados en animales controles (tratados con Adsh $\beta$ Gal), muestran el mismo patrón de expresión. Los animales tratados con el AdshMCT1 muestran niveles elevados de neuropéptidos orexigénicos luego de la inyección i.c.v. de glucosa, en comparación con animales controles tratados con salino, lo que sugiere que las neuronas orexigénicas no son inhibidas directamente por glucosa (Elizondo-Vega et al., 2016), sino por monocarboxilatos derivados de la metabolización de esta, como ha sido propuesto previamente (Cortes-Campos et al., 2011; Elizondo-Vega et al., 2015; Marty et al., 2007). La disminución de la expresión de MCT2, podría ser en parte responsable de los efectos observados luego de la inhibición *in vivo* de MCT1, reforzando los efectos del *knockdown* de MCT1. Por lo tanto, nuestros resultados apoyan el acoplamiento metabólico entre tanicitos y neuronas. Además, resultados similares han sido reportados en ratones *ripglut1:glut2<sup>-/-</sup>*, en los cuales la

inyección i.c.v. de 50 mM de glucosa no disminuye la expresión de los neuropéptidos orexígenos (Bady et al., 2006).

Varios estudios respaldan que las neuronas del NA son capaces de responder a glucosa; sin embargo estos estudios realizados en rebanadas cerebrales reportan que el 40% de las neuronas NPY son inhibidas por glucosa (Burdakov et al., 2005; Crowley et al., 1990; Higuchi et al., 2008; Muroya et al., 1999). Similarmente, ha sido reportado que existe una población de neuronas excitadas por glucosa, las cuales se despolarizan e incrementar su frecuencia de disparo en respuesta a incrementos en la concentración de glucosa extracelular, a través del cierre de canales de ATP sensibles a potasio (Parton et al., 2007). Además, la interrupción de la glucodetección en neuronas POMC excitadas por glucosa, a través de la expresión transgénica de la subunidad mutante de Kir6.2 del canal de potasio, impide el cierre de canales de ATP sensibles a potasio, suprimiendo la respuesta frente a un incremento sistémico de la concentración de glucosa, demostrando una función de las neuronas POMC en el control fisiológico de la concentración de glucosa sanguínea (Parton et al., 2007). Estos antecedentes demuestran una participación neuronal en el mecanismo glucosensor hipotalámico; sin embargo, no se contradicen con nuestros resultados, ya que tanto glucosa como lactato, podrían generar las respuestas mediadas por ATP en estas neuronas. Las neuronas del NA no se encuentran en contacto directo con la sangre o con el LCR (Elizondo-Vega et al., 2015; Langlet et al., 2013a; Langlet et al., 2013b), en cambio, la región proximal de las distintas poblaciones de los tanicitos contactan con el LCR, los procesos de los tanicitos  $\beta 2$ , contactan capilares fenestrados localizados en la EM, y los procesos de tanicitos  $\beta 1$ , contactan capilares fenestrados y no fenestrados localizados en la región lateral de la EM. Estos hechos hacen posible plantear la existencia de un mecanismo alternativo o en

paralelo que apoya a este proceso. Recientemente, se ha descrito que la EM puede sufrir modificaciones estructurales mediadas por tanicitos, en respuesta a una disminución de la concentración de glucosa sanguínea, incrementando la permeabilidad de nutrientes al NA (Langlet, 2014). Por lo tanto, no descartamos la posibilidad de la existencia de otros mecanismos de señalización que permitan la detección de nutrientes provenientes de la sangre a nivel hipotalámico, como ha sido descrito para la detección de ácidos grasos libres o la señalización hormonal proveniente del tracto gastrointestinal.

Por otro lado, hemos reportado que la inhibición de MCT1 también es capaz de alterar la expresión de neuropéptidos anorexígenos en condiciones de ayuno (Elizondo-Vega et al., 2016). Es posible que otros sustratos transportados a través de MCT1, sean capaces de disminuir la actividad de estas neuronas en esta condición metabólica. Los MCTs son una familia de transportadores, los cuales median la difusión facilitada de monocarboxilatos como lactato, piruvato y cuerpos cetónicos (Carneiro et al., 2016; Cortes-Campos et al., 2011; Dimmer et al., 2000). Recientemente, se ha demostrado que la inhibición de la producción hepática de  $\beta$ -hidroxibutirato, es capaz de inhibir un proceso conocido como “anticipación de la alimentación”, condición metabólica que precede al inicio de la alimentación, y que se caracteriza por dar inicio a los episodios de ingesta de alimentos (Chavan et al., 2016). El hecho de que  $\beta$ -hidroxibutirato producido hepáticamente genere una respuesta central, asociado a que los niveles de cuerpos cetónicos aumentan en una condición de ayuno (Carneiro et al., 2016), puede deberse a que la inhibición de MCT1 afecta además a los capilares de la región, los cuales se encuentran ampliamente expresados en las células endoteliales, impidiendo el ingreso de cuerpo cetónicos al hipotálamo. A través de estudios inmunohistoquímicos, se ha demostrado que los tanicitos presentan numerosas inclusiones lipídicas, además de

enzimas involucradas en el metabolismo lipídico (Akmayev and Popov, 1977), por lo que también es posible que su metabolización sea capaz de generar cuerpos cetónicos durante un ayuno prolongado. Apoyando a este último planteamiento, se ha reportado que cultivos primarios de astrocitos liberan cuerpos cetónicos, generados a partir del catabolismo de ácidos grasos (Blazquez et al., 1999). La expresión de POMC y CART en animales *knockdown* para MCT1, es similar a la observada en el grupo control inyectado con salino (Elizondo-Vega et al., 2016), lo que puede ocurrir debido a una pérdida parcial de la respuesta esperada para glucosa, ya que estas neuronas se encuentran en contacto con procesos de tanicitos que son mayoritariamente positivos para MCT4 y no para MCT1 (Cortes-Campos et al., 2011).

Apoyando el rol del lactato en el control de la ingesta, se ha demostrado que la inyección i.c.v. de 5 mM de lactato genera una reducción de un 58% la ingesta de alimentos y el peso corporal en ratas (Lam et al., 2008; Lam et al., 2005). Además, el incremento de lactato en el hipotálamo, luego de una inyección intracarotídea de este, gatilla la secreción de insulina (Allard et al., 2013). Estos resultados, en conjunto con los resultados obtenidos en esta tesis, apoyan la hipótesis de que el acoplamiento metabólico tanicito-neurona mediado por monocarboxilatos, tiene un rol fundamental en la ingesta de alimentos, debido a que los animales *knockdown* para MCT1 poseen una mayor ingesta alimenticia y un mayor peso corporal, cambios que se mantienen durante el primer y segundo ciclo de alimentación. Sin embargo, es importante recalcar que la ingesta de alimentos es un comportamiento regulado por una serie de diferentes factores, los que incluyen la disponibilidad de nutrientes, lo que podría explicar la ausencia de cambios en la frecuencia alimenticia acumulada durante la fase clara y oscura de la alimentación. Interesantemente, al analizar la frecuencia alimenticia a intervalos cortos de tiempo, nos

permitió detectar alteraciones en el comportamiento alimenticio. Durante las primeras 3 h de la fase oscura, los animales *knockdown* para MCT1 poseen una menor frecuencia alimenticia. Este resultado es interesante y se correlaciona con los antecedentes descritos en literatura, que señalan que el aumento en la concentración de cuerpos cetónicos es importante para que se produzca la anticipación de la alimentación, en respuesta al ritmo circadiano (Chavan et al., 2016). Al respecto se sabe que MCT1, posee una Km para  $\beta$ -hidroxibutirato del orden de 10 mM, por lo tanto la inhibición de MCT1 sería capaz de reducir el flujo de cuerpos cetónicos, impidiendo la anticipación de la ingesta de alimentos y produciendo un retraso de la alimentación durante las primeras 3 horas post-ayuno. Sin embargo, cuando se analizaron los datos totales obtenidos durante el primer ciclo de alimentación, observamos que los animales *knockdown* para MCT1 comen más y se alimentan más rápido que los animales controles. Esto sugiere, que los animales *knockdown* para MCT1 poseen una menor sensación de hambre solo en las primeras horas luego del ayuno, lo cual puede deberse, en parte, a la disminución de la disponibilidad de  $\beta$ -hidroxibutirato y también a los elevados niveles de neuropéptidos anorexigénicos que encontramos durante la condición de ayuno. La mayor ingesta observada en los animales *knockdown* con respecto al control se debe a que transcurridas 6 h del inicio de la alimentación, la frecuencia de alimentación en los animales *knockdown* para MCT1 se mantiene constante, en contraste con la disminución en la frecuencia de alimentación observada en el grupo control. Al mismo tiempo, se produce un acortamiento de los intervalos de tiempo entre las comidas, indicativo de una reducción en los niveles de saciedad. Esto es consistente con los datos de la expresión de neuropéptidos en respuesta a glucosa, los cuales sugieren que las neuronas orexigénicas no detectan incrementos en la concentración de glucosa cuando MCT1 se



encuentra inhibido. Los resultados después de las primera 3 primeras horas de ayuno, también indican que los animales *knockdown* para MCT1 poseen intervalos entre comidas más cortos, indicando que los animales comienzan a sentir hambre poco tiempo después de haberse alimentado. Debido a que nuestras jaulas de alimentación, no son capaces de detectar variaciones en el peso del alimento en tiempo real, los resultados de alimento consumido en cada evento de alimentación, corresponden a mediciones realizadas al final de cada ciclo de alimentación; por lo tanto, posibles incrementos de estos parámetros que miden saciación, pueden haber pasado desapercibidos.

El retraso en la iniciación de la ingesta alimenticia y en el establecimiento de la saciedad, muestran que la señalización hipotalámica mediada por MCT1 es importante tanto a bajas como altas concentraciones de glucosa. En ayuno o a bajas concentraciones de glucosa es posible que los tanicitos, en especial los tanicitos  $\beta$ 1, liberen un sustrato transportable por MCT1 distinto a lactato que inhiba a las neuronas que inducen saciedad. Al respecto se ha informado que los tanicitos almacenan glicógeno (Lima et al., 2010; Rodriguez et al., 2005) y que lo degradan a lactato en condiciones de ayuno (Dringen et al., 1993). Sin embargo, se ha demostrado que con un ayuno superior a 24 h, desaparecen la reservas de glicógeno del organismo (Brown and Ramson, 2007). Los MCTs transportan monocarboxilatos, en especial MCT1 ya que posee un Km que le permite transportar  $\beta$ -hidroxibutirato en condiciones fisiológicas. Por lo cual, es posible que en ayuno los tanicitos generen  $\beta$ -hidroxibutirato, el que puede ser liberado por MCT1 e impactar a las neuronas anorexigénicas inhibiéndolas (Fig. 40A). Recientemente, se ha demostrado que los astrocitos bajo ciertas condiciones generan cuerpos cetónicos a partir de ácidos grasos, por lo que es factible proponer que los tanicitos generen cuerpos cetónicos, ya que se sabe que una de las características morfológicas de estas células

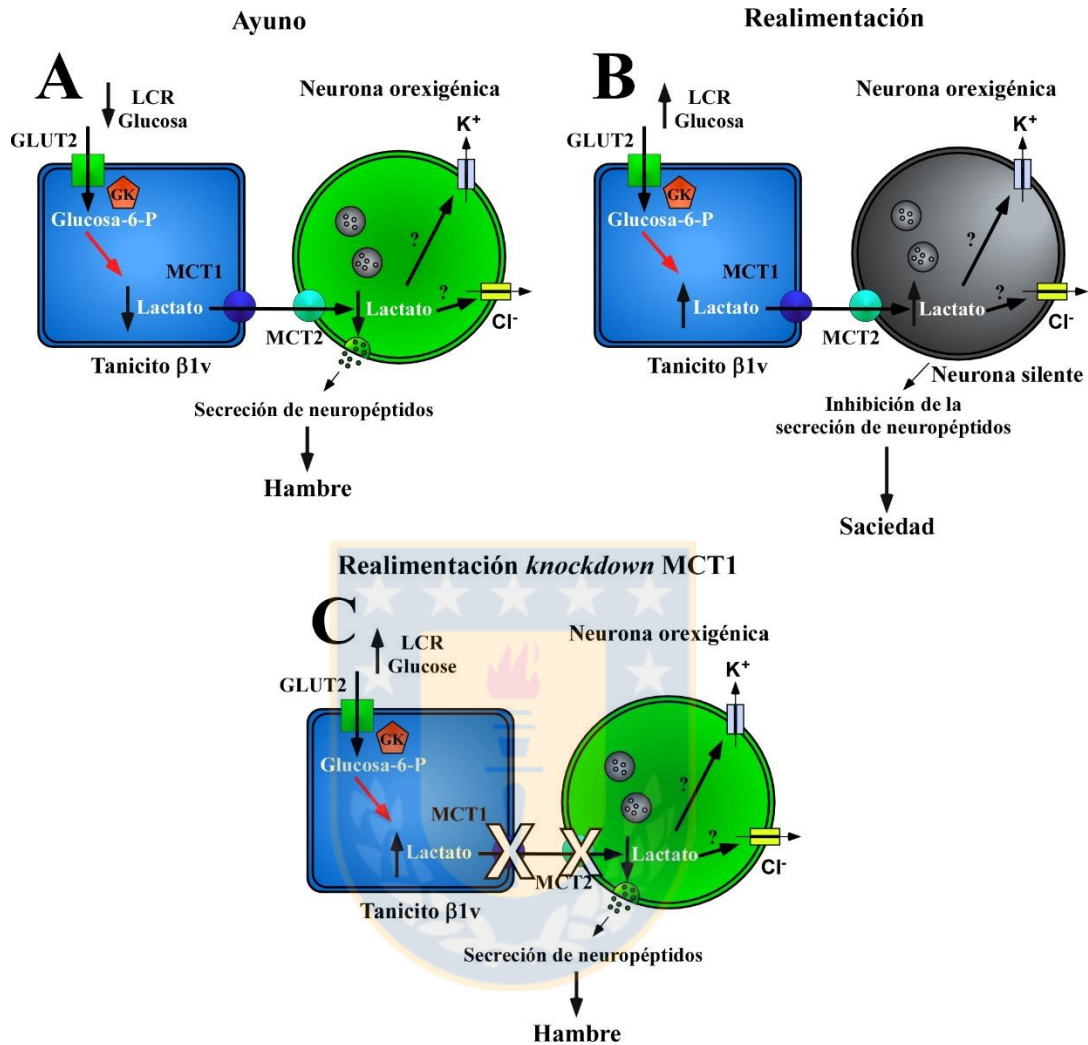


es la presencia de inclusiones lipídicas (Akmayev and Popov, 1977), siendo una posible señal metabólica utilizada por los tanicitos para mantener a las neuronas anorexígenas silentes en condiciones de hipoglicemia. Recientemente, ha sido postulado que los cuerpos cetónicos y lactato, son capaces de inhibir la actividad neuronal a través de receptores de ácidos hidroxicarboxílicos, los que se encuentran acoplados a proteína  $G_i$ , produciendo la inhibición de adenil ciclasa, el cierre de canales de potasio y la inhibición eléctrica de la neurona (Barros, 2013; Lovatt et al., 2012). De acuerdo a estos antecedentes, postulamos que en condiciones de ayuno o hipoglicemia, los tanicitos liberan monocarboxilatos a través de MCT1, los que a través de una señalización mediada por receptor acoplado a proteína  $G_i$ , permitiría la inhibición de neuronas anorexígenas. Alternativamente podríamos especular que las neuronas orexígenas tengan receptores de lactato, que al igual que los cuerpos cetónicos ejercen su acción vía una proteína  $G_i$ , sin embargo no existen estudios que analicen la expresión de estos receptores en el hipotálamo.

De acuerdo a antecedentes reportados en literatura, la expresión de neuropéptidos orexígenos en condiciones de ayuno aumenta, producto de una reducción en la incorporación neuronal de lactato y una consecuente disminución de la razón de ATP/ADP, lo cual podría producir un cierre de canales de  $Cl^-$  y/o  $K^+$ , produciendo la despolarización de la membrana, la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje y la liberación de vesículas con neuropéptidos orexígenos (Marty et al., 2005) (Fig. 40A). Al realimentar e incrementar las concentraciones de glucosa, los tanicitos incorporarían glucosa y liberarían lactato, como ha sido demostrado en tanicitos en cultivo (Cortés-campos 2013). El lactato podría ser incorporado por MCT2, que está altamente expresado en neuronas (Cortés campos 2013), se postula que en la neurona el lactato

produce hiperpolarización por medio de la apertura de canales de  $\text{Cl}^-$  y/o  $\text{K}^+$ , manteniendo a las neuronas silentes (Fioramonti et al., 2007) (Fig. 40B). Sin embargo, de acuerdo a nuestros resultados, la inhibición de MCT1 en tanicitos, reduciría el flujo de lactato hacia neuronas orexigénicas, emulando, en una condición de realimentación, una condición de ayuno, manteniendo a las neuronas orexigénicas activadas en presencia de glucosa (Fig. 40C).





**Figura 40. Modelo propuesto para el mecanismo sensor de glucosa mediado por la interacción entre tanicitos  $\beta 1v$  y neuronas orexigénicas del NA.**

**A.** Modelo de activación neuronal en respuesta a una disminución de la concentración de glucosa en condiciones de ayuno. Modificado de Marty et al., 2005 **B.** Modelo de inhibición neuronal en respuesta a alzas de la concentración de glucosa en condiciones de realimentación. **C.** Esquema resumen del modelo de interacción en base a lactato propuesto entre tanicitos  $\beta 1v$  y neuronas orexígenas, frente al aumento en la concentración de glucosa y la inhibición de la expresión de MCT1 en tanicitos en condiciones de realimentación.  $\beta 1v$ : tanicitos, GK: glucoquinasa.

## **4.2. Rol de MCT4 en el mecanismo de detección de glucosa hipotalámico a través del acoplamiento metabólico tanicito-neurona.**

Los animales *knockdown* para MCT4 presentaron una pérdida de respuesta de la expresión de neuropéptidos anorexígenos y una disminución de la ingesta de alimentos. De igual manera a lo observado para MCT1, nuestros estudios *in vitro* e *in vivo*, indican que la expresión de MCT4 disminuye significativamente a las 96 h post-transducción y que la transducción mediada por las partículas adenovirales utilizadas para inhibir MCT4, no presentan diferencias en el patrón de infección observado previamente para MCT1, transduciendo preferencialmente a los tanicitos.

Nuestros resultados muestran que tanto *in vitro* como *in vivo*, el shARN para MCT4 disminuye significativamente la expresión del ARNm de MCT4, sin alterar la expresión de MCT1. De acuerdo a su patrón de expresión en los distintos tejidos del organismo, tanto MCT1 como MCT4 han sido clasificados como transportadores asociados principalmente a la liberación de monocarboxilatos (Halestrap, 2013). Por lo tanto, la inhibición de MCT4, produciría una disminución en la liberación de monocarboxilatos, siendo esperable observar una disminución de la expresión neuronal de MCT2, similar a lo reportado para el *knockdown* de MCT1 (Elizondo-Vega et al., 2016). Nuestros resultados, indican que la inhibición de MCT4 es capaz de disminuir la expresión del ARNm de MCT2 *in vivo*, sugiriendo que al igual que MCT1, monocarboxilatos liberados a través de MCT4 pueden modular la expresión neuronal de MCT2, apoyando la existencia de un acoplamiento metabólico tanicito-neurona. Por otro lado, hemos demostrado que durante el ayuno, en una condición de hipoglicemia, los animales controles, inyectados con el Adsh $\beta$ Gal, incrementan la expresión de los neuropéptidos orexígenos NPY y AgRP, y al mismo tiempo presentan bajos niveles de expresión de los neuropéptidos anorexígenos POMC

y CART, como ha sido reportado previamente (Fig. 41A) (Archer et al., 2005; Bady et al., 2006; Elizondo-Vega et al., 2016).

Como hemos mencionado anteriormente, en el NA, existe una población de neuronas que depolarizan su membrana en respuesta a incrementos en la concentración de glucosa y de lactato extracelular (Yang et al., 1999). Ha sido postulado que las neuronas anorexigénicas corresponden a este tipo de neuronas y que pueden ser activadas por el lactato liberado por tanicitos en respuesta a incrementos en la concentración de glucosa (Fig. 41B) (Ainscow et al., 2002; Cortes-Campos et al., 2011; Elizondo-Vega et al., 2015; Lam et al., 2005); por lo tanto esperábamos que la inhibición de MCT4, impediría la activación de neuronas anorexigénicas inducida por glucosa. Nuestros resultados son congruentes con este postulado, en los cuales los niveles de POMC y CART, no solo no aumentan en respuesta a glucosa, sino que disminuyen, indicando que no son activadas directamente por glucosa (Fig. 41C).

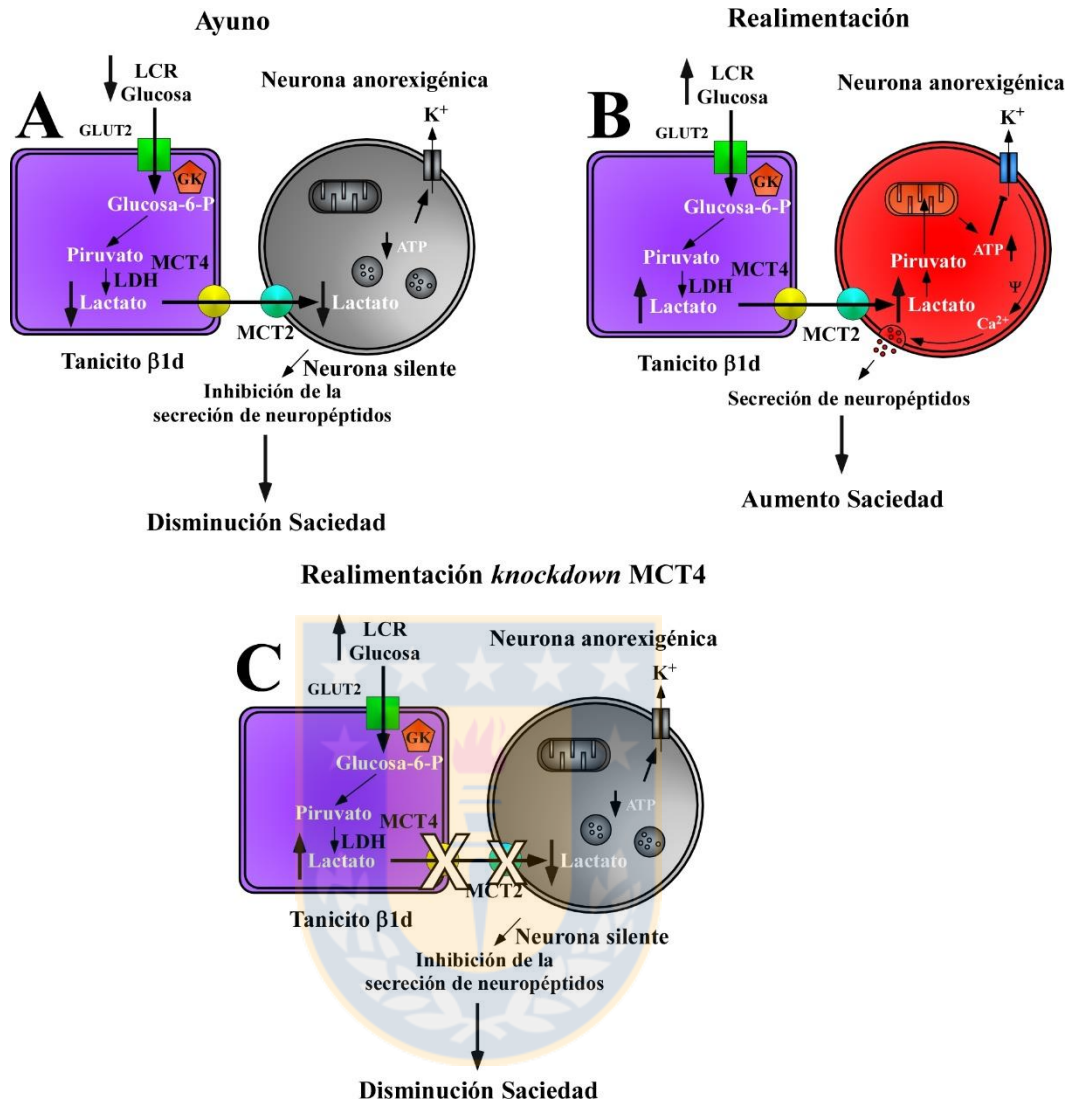
Por otro lado, la inhibición de la expresión de MCT4, no altera la respuesta a la inyección i.c.v. de glucosa por parte de las neuronas orexigénicas (las que se encuentran principalmente en contacto con procesos de tanicitos MCT1 positivos), observando una disminución de su expresión. Sin embargo, en la condición de ayuno, los ARNm de NPY y AgRP que deberían estar elevados, se encuentran más bajos que en los animales controles, sugiriendo que MCT4 o alternativamente MCT2 se requieren para la respuesta a hipoglicemia de las neuronas orexígenas. Al respecto, MCT4 posee una Km de incorporación de cuerpos cetónicos demasiado alta para suponer una respuesta mediada por estos (Bergensen et al., 2007), sin embargo, no se ha determinado la Km de salida de cuerpos cetónicos a través de MCT4.

En relación a la inhibición de MCT4 y la ingesta alimenticia, observamos que los animales

*knockdown* para MCT4 poseen una menor ingesta alimenticia, la cual se manifiesta en una reducción en el peso corporal, que es cuantificable durante el ciclo 2 de alimentación. Estos resultados se correlacionan con la disminución en la expresión de neuropéptidos orexígenos en una condición de hipoglicemia en comparación con los animales controles. Interesantemente, a pesar de producir una disminución en la ingesta de alimentos, pudimos detectar incrementos en la frecuencia alimenticia acumulada durante la fase clara y oscura de la alimentación, los que se observan durante el primer y segundo ciclo de alimentación. Esta alteración queda en evidencia en los últimos intervalos de tiempo de la fase oscura de la alimentación, al contrario de MCT1. Durante las últimas 6 h de la fase oscura, los animales *knockdown* para MCT4 poseen una mayor frecuencia alimenticia, lo que se correlaciona con un menor tiempo de espera en los intervalos de alimentación. Sin embargo, nuestros resultados indican que durante el primer y segundo ciclo de alimentación, a pesar de ingresar un mayor número de veces al comedero, los animales *knockdown* para MCT4 comen menos, se alimentan más lento y el tamaño promedio total es menor que los animales controles. Estos resultados sugieren que, los animales inhibidos para MCT4, inician su realimentación con la misma sensación de hambre que los animales controles, al contrario que la inhibición para MCT1 donde ocurre un retraso, sin embargo esta sensación de hambre se mantiene constante durante toda la fase oscura, mientras que los animales controles manifiestan una disminución de la sensación de hambre al finalizar las primeras 12 h de alimentación. Estos resultados apoyan los antecedentes reportados por Chavan et al (2016), los que indican que cuerpos cetónicos son capaces de producir un retraso en la alimentación. En este contexto, la inhibición de MCT4, que posee una baja Km para cuerpos cetónicos, no produce un retraso en la alimentación como si se observa al inhibir la expresión de MCT1 (Chavan et

al., 2016). Por otro lado, creemos que esta sensación de hambre puede mantenerse constante, debido a que la ingesta de alimentos y por ende, la elevación de los niveles de glicemia, producen en estos animales, una disminución en la expresión de neuropéptidos anorexigénicos y por ende una pérdida en la respuesta de saciedad. Esto se correlaciona con una duración constante de los tiempos de intervalos entre comidas observados para los animales *knockdown* para MCT4, mientras que en los animales controles, estos tiempos aumentan gradualmente a medida que transcurre la fase oscura de la alimentación, lo que es un indicador de la disminución de los niveles de saciedad. Estas alteraciones no explican porque los animales *knockdown* para MCT4 presentan una menor ingesta de alimentos. En relación a este punto, observamos que en los animales inhibidos para MCT4, los niveles de los neuropéptidos orexigénicos caen en respuesta a glucosa, a diferencia de lo observado al inhibir MCT1. Por lo tanto, la ingesta de alimentos produce la respuesta normal de las neuronas orexigénicas, que es mantenerse silentes, produciéndose una disminución de la expresión de NPY y AgRP, generando la disminución de la ingesta. Al mismo tiempo que una disminución de la saciedad, de tal manera que los animales comienzan a sentir hambre poco tiempo después de alimentarse para saciarse rápidamente. Por lo cual comen menos en cada evento de alimentación, lo que lamentablemente no podemos medir en nuestro sistema de registro. Por lo tanto, la señalización hipotalámica mediada por MCT4, parece tener un importante rol regulatorio de la ingesta alimenticia, apoyando el mecanismo sensor de glucosa hipotalámico mediado por monocarboxilatos en un acoplamiento metabólico entre tanicitos y neuronas.





**Figura 41. Modelo del mecanismo sensor de glucosa basado en una interacción entre tanicitos  $\beta$ 1d y neuronas anorexígenas.**

**A.** Modelo de inhibición neuronal en respuesta a una disminución de la concentración de glucosa en condiciones de ayuno. **B.** Modelo de activación neuronal en respuesta a alzas de la concentración de glucosa en condiciones de realimentación. **C.** Esquema resumen del modelo de interacción en base a lactato propuesto entre tanicitos  $\beta$ 1d y neuronas anorexígenas, frente al aumento en la concentración de glucosa y la inhibición de la expresión de MCT4 en tanicitos en condiciones de realimentación.  $\beta$ 1d: tanicitos, GK: glucoquinasa, LDH: láctico deshidrogenasa.



### **4.3. Función de MCT1 y MCT4 sobre la expresión de neuropéptidos y su participación en la regulación de la ingesta alimenticia.**

Los animales *knockdown* para MCT1 y MCT4, manifiestan una sostenida e importante pérdida de la respuesta a la inyección i.c.v. de glucosa, al presentar bajos niveles de expresión de neuropéptidos tanto en condiciones de ayuno como luego de la inyección i.c.v. de glucosa, además de una evidente alteración de la ingesta de alimentos. Los cambios observados sobre la ingesta alimenticia al inhibir la expresión de MCT1 o MCT4, como, como las alteraciones observadas al inhibir a ambos transportadores, nos permite establecer, que tanto MCT1 como MCT4 son importantes moduladores de la respuesta a glucosa y regulación de la ingesta alimenticia.

Nuestros estudios *in vitro* muestran que la expresión de MCT1 y MCT4 al utilizar los dos adenovirus inhibidores, disminuyen a las 96 h post-transducción, tanto a nivel de mensajero como de proteínas. Además, no observamos diferencias en la expresión de MCT2 *in vitro*. Sin embargo, como ya hemos discutido anteriormente, la inhibición de MCT1 (Elizondo-Vega et al., 2016) o MCT4, es capaz de producir una reducción en los niveles de ARNm para MCT2, observación que se repite al inhibir a ambos transportadores al mismo tiempo. Estos resultados nos permiten corroborar las observaciones realizadas previamente, sugiriendo que los monocarboxilatos liberados a través de MCT1 y MCT4 podrían modular los niveles de expresión de MCT2 a nivel neuronal. Estos resultados complementan los hallazgos reportados para MCT2, los cuales indican que incrementos en la concentración extracelular de lactato y cuerpos cetónicos, producen una sobreexpresión de MCT2 (Matsuyama et al., 2009; Pierre et al., 2007). Sin embargo, creemos importante la necesidad de evaluar la expresión de MCT2 *in vivo*, luego de realizar la doble inhibición de MCT1 y MCT4, para intentar determinar si

los cambios en su expresión pueden ser también responsables de los efectos detectados sobre la ingesta de alimentos.

En base a las observaciones individuales de la inhibición de MCT1 y MCT4, y acuerdo a lo discutido anteriormente, planteamos que el mecanismo *sensor* de glucosa que regula a las neuronas orexigénicas y anorexígenas ocurre a través de una interacción tanicito-neurona. La incorporación de glucosa por parte de tanicitos  $\beta 1v$  permitiría su metabolización hasta lactato, el cual sería liberado a través de MCT1 e incorporado a través de MCT2 en neuronas orexígenas, produciendo su silenciamiento. Por otro lado, la liberación de lactato por parte de tanicitos  $\beta 1d$  a través de MCT4, permitiría la activación de neuronas anorexigénicas. En consecuencia, frente a incrementos de glicemia post-prandialmente, se produciría un silenciamiento de las neuronas orexígenas (Fig.40A), y la activación de neuronas anorexigénicas, permitiendo la liberación de sus reservorios POMC y CART, produciendo la sensación de saciedad y por lo tanto la disminución de la ingesta alimenticia (Fig. 41).

Interesantemente, la expresión de neuropéptidos orexígenos en animales doble *knockdown* para MCT1 y MCT4, presenta una mezcla de las alteraciones observadas en los animales *knockdown* para MCT1 y los animales *knockdown* para MCT4, ya que la expresión de NPY y AgRP no disminuye en respuesta a la inyección i.c.v. de glucosa (similar a lo observado en el *knockdown* para MCT1) (Elizondo-Vega et al., 2016), pero además se observa una baja expresión de NPY y AgRP en la condición de ayuno en comparación con el control (similar a lo observado en el *knockdown* para MCT4). De tal forma que la doble inhibición de MCT1 y MCT4, presenta alteraciones en la expresión de neuropéptidos orexígenos frente a hiperglicemia e hipoglicemia (Fig. 42).

Interesantemente, el patrón de expresión para los neuropéptidos anorexígenos en

respuesta a la inyección i.c.v. de glucosa en relación al control, no produce el incremento esperado en la expresión de POMC o CART; sin embargo, detectamos menores niveles de expresión en comparación con la condición control (lo cual no es significativo), lo cual puede explicar las alteraciones asociadas al comportamiento alimenticio.

La ausencia de respuesta en estos animales, se correlaciona con estudios efectuados anteriormente por nuestro laboratorio en los que se demostró que la inhibición *in vivo* de GK en tanicitos (inyección i.c.v. de adenovirus que codifican un ARN interferente), genera un aumento de la ingesta alimenticia (Tesis doctoral Carola Millan 2008). Este efecto que también fue observado en ratones *knock-out* para GLUT2, que además alteran la expresión de NPY y POMC frente a una hiperglicemia ventricular, produciendo una disminución de su expresión y una pérdida de respuesta a la inyección i.c.v. de glucosa (Bady et al., 2006). Por otra parte, en estudios realizados en ratones *knock-out* para GLUT2 se demostró que existe una falta de respuesta periférica a la hipoglicemia ventricular, que es restituida por la reposición de la expresión de GLUT2 en células gliales pero no neuronales (Marty et al., 2005). Por lo tanto, los resultados obtenidos en esta tesis, permiten postular que los tanicitos son centrales en la respuesta a glucosa y entregan pruebas adicionales de la participación del lactato y de MCT1 y MCT4 en este proceso.

Como hemos observado en los resultados de estas tesis, la disminución de la expresión de MCT1 o MCT4 altera el comportamiento alimenticio. Por lo tanto, la expresión de los transportadores y su regulación, cumple un rol fundamental en la ingesta de alimentos. En este contexto, la doble inhibición de MCT1 y MCT4 se manifiesta en una mayor ingesta alimenticia, prevaleciendo las alteraciones observadas al inhibir MCT1; sin embargo, no detectamos diferencias en el peso corporal. Como describimos previamente, la inhibición

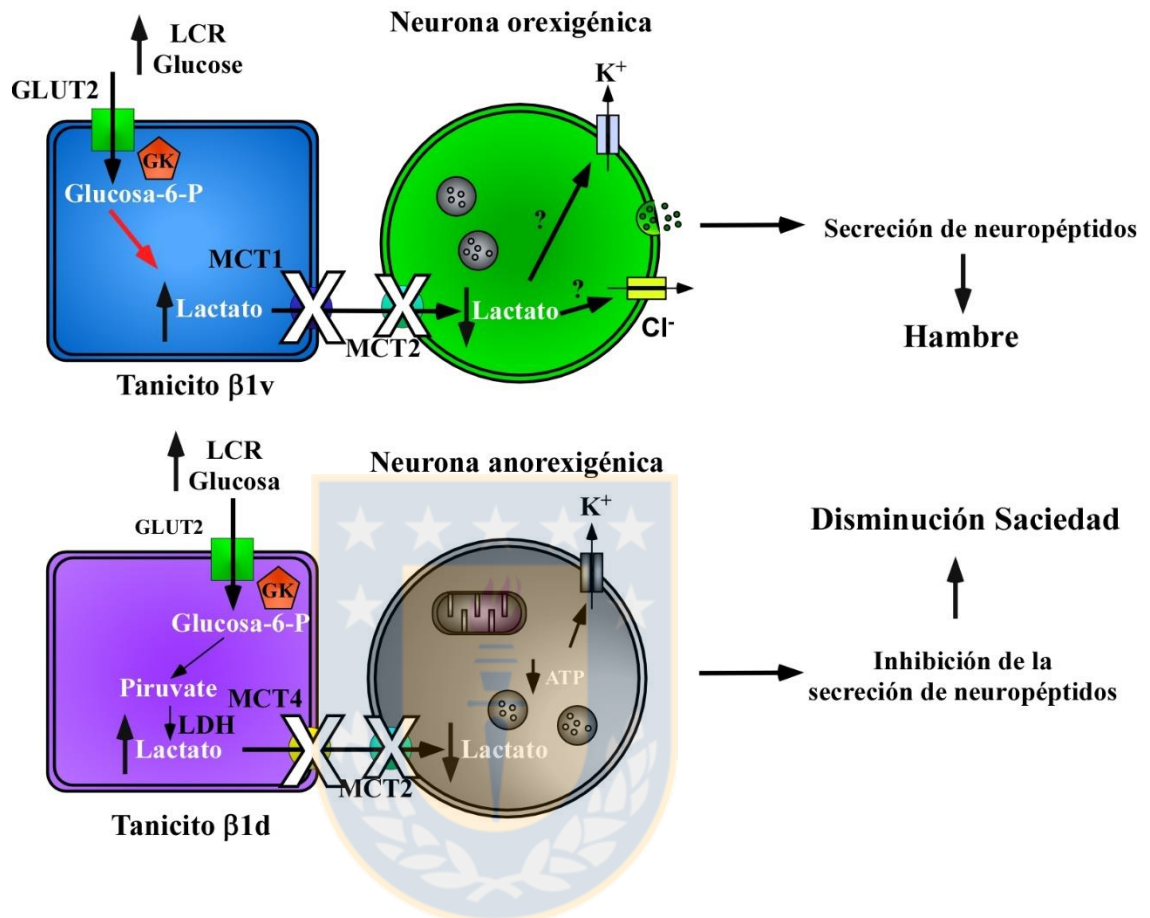
de MCT1 produce incrementos del peso corporal, mientras que la inhibición de MCT4 tiene el efecto contrario, produciendo una reducción del peso corporal. Al inhibir a ambos transportadores, no observamos diferencias en este parámetro, debido probablemente a un efecto compensatorio.

Al analizar la frecuencia alimenticia, nuevamente nos encontramos con una mezcla de alteraciones observadas de manera individual para MCT1 o MCT4, prevaleciendo en cierta medida, las observaciones detectadas al inhibir solo MCT4. Los resultados de frecuencia alimenticia en los animales doble *knockdown* para MCT1 y MCT4, muestran un incremento de los eventos de alimentación acumulados, los cuales ocurren durante las últimas 3 h de alimentación de la fase oscura (efecto similar al inhibir sólo MCT4), correlacionándose con un menor tiempo de espera en el mismo intervalo de alimentación. Sin embargo, contrario a lo observado al inhibir solo MCT4, los animales doble *knockdown* ingieren una mayor cantidad de alimentos durante el primer y segundo ciclo (efecto observable al inhibir solo MCT1), lo que realizan con una menor velocidad que los animales controles (similar a lo observado al inhibir solo MCT4). Interesantemente, a pesar de comer más lento, la duración promedio de los eventos de alimentación es más larga. Estos resultados sugieren que, los animales doble *knockdown*, inician su realimentación con la misma sensación de hambre que los animales controles, sin embargo esta sensación de hambre se mantiene constante durante toda la fase oscura, mientras que los animales controles manifiestan una disminución de la sensación de hambre al finalizar las primeras 12 h de alimentación, de similar manera a lo observado al inhibir solo MCT4. La incapacidad de reducir los niveles de expresión de neuropéptidos de tipo orexigénicos, como una carencia en producir un incremento en la expresión de neuropéptidos anorexigénicos, podría ser uno de los causantes de una alimentación

constante, más lenta, pero de mayor duración que los animales controles, observando una pérdida de la conducta de saciedad y una sensación de hambre constante. Sin embargo, es posible que las diferencias se deban también a que con el ensayo de neuropéptidos evaluamos la respuesta solo a glucosa, pero cuando evaluamos comportamiento alimenticio, utilizamos un alimento que además posee otros nutrientes. Al respecto es importante destacar que existen una importante línea de evidencias que apoyan la detección de lípidos en el hipotálamo (Lam et al., 2005).

En conclusión, en esta tesis planteamos el rol funcional de MCT1 y MCT4, como actores importante en la respuesta hipotalámica a los incrementos de glucosa i.c.v., función que se permitiría regular la expresión de neuropéptidos que modulan el comportamiento alimenticio. Debido a que ha sido demostrado que el metabolismo de lactato puede controlar las concentraciones plasmáticas de glucosa, como también los niveles de lípidos circulantes (Lam et al., 2008; Lam et al., 2005) Es de suma importancia poder establecer nuevas estrategias terapéuticas que permitan modular la expresión y/o función de los transportadores de monocarboxilatos en el SNC, los que podrían ser utilizados para controlar la obesidad y sus patologías asociadas.

### Realimentación doble *knockdown* MCT1-MCT4



**Figura 42. Modelo del mecanismo sensor de glucosa basado en una interacción entre tanicitos  $\beta 1v$  y  $\beta 1d$ , y neuronas orexigénicas y anorexigénicas.**

Esquema resumen del modelo de interacción en base a lactato propuesto entre tanicitos  $\beta 1v$  y tanicitos  $\beta 1d$ , con neuronas orexigénicas y anorexigénicas, frente al aumento en la concentración de glucosa en respuesta a realimentación, en animales doble *knockdown* para MCT1 y MCT4 en tanicitos.  $\beta 1d$ : tanicitos, GK: glucoquinasa, LDH: láctico deshidrogenasa.

**Tabla 5. Resumen de resultados *in vivo*.**

	<i>Knockdown</i> MCT1	<i>Knockdown</i> MCT4	<i>Knockdown</i> MCT1/MCT4
Ingesta de alimentos	aumenta	disminuye	aumenta
Peso corporal	aumenta	disminuye	n/c
Eventos de alimentación	disminuye	aumenta	aumenta
Intervalo de tiempo	aumenta	disminuye	disminuye
Velocidad de alimentación	aumenta	disminuye	disminuye
Duración de alimentación promedio	n/c	n/c	aumenta
Tamaño de alimento promedio	n/c	disminuye	n/c

n/c: No hay cambios



## V. BIBIOGRAFÍA.

Ainscow, E.K., S. Mirshamsi, T. Tang, M.L. Ashford, and G.A. Rutter. 2002. Dynamic imaging of free cytosolic ATP concentration during fuel sensing by rat hypothalamic neurones: evidence for ATP-independent control of ATP-sensitive K(+) channels. *The Journal of physiology*. 544:429-445.

Akmayev, I.G., and A.P. Popov. 1977. Morphological aspects of the hypothalamic-hypophyseal system. VII. The tanocytes: Their relation to the hypophyseal adrenocorticotrophic function. An ultrastructural study. *Cell and tissue research*. 180:263-282.

Almeida, A., J. Almeida, J.P. Bolanos, and S. Moncada. 2001. Different responses of astrocytes and neurons to nitric oxide: the role of glycolytically generated ATP in astrocyte protection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98:15294-15299.

Altman, J., and S.A. Bayer. 1978. Development of the diencephalon in the rat. III. Ontogeny of the specialized ventricular linings of the hypothalamic third ventricle. *The Journal of comparative neurology*. 182:995-1015.

Allard, C., L. Carneiro, S.C. Collins, C. Chretien, S. Grall, L. Penicaud, and C. Leloup. 2013. Alteration of hypothalamic glucose and lactate sensing in 48h hyperglycemic rats. *Neuroscience letters*. 534:75-79.

Allard, C., L. Carneiro, S. Grall, B.H. Cline, X. Fioramonti, C. Chretien, F. Baba-Aissa, C. Giaume, L. Penicaud, and C. Leloup. 2014. Hypothalamic astroglial connexins are



required for brain glucose sensing-induced insulin secretion. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 34:339-346.

Anand, B.K., and J.R. Brobeck. 1951. Hypothalamic control of food intake in rats and cats. *The Yale journal of biology and medicine*. 24:123-140.

Anderson, C.M., and R.A. Swanson. 2000. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia*. 32:1-14.

Archer, Z.A., S.M. Rhind, P.A. Findlay, C.E. Kyle, M.C. Barber, and C.L. Adam. 2005. Hypothalamic responses to peripheral glucose infusion in food-restricted sheep are influenced by photoperiod. *The Journal of endocrinology*. 184:515-525.

Arletti, R., A. Benelli, and A. Bertolini. 1989. Influence of oxytocin on feeding behavior in the rat. *Peptides*. 10:89-93.

Aschauer, D.F., S. Kreuz, and S. Rumpel. 2013. Analysis of transduction efficiency, tropism and axonal transport of AAV serotypes 1, 2, 5, 6, 8 and 9 in the mouse brain. *PLoS one*. 8:e76310.

Atasoy, D., J.N. Betley, H.H. Su, and S.M. Sternson. 2012. Deconstruction of a neural circuit for hunger. *Nature*. 488:172-177.

Bady, I., N. Marty, M. Dallaporta, M. Emery, J. Gyger, D. Tarussio, M. Foretz, and B. Thorens. 2006. Evidence from glut2-null mice that glucose is a critical physiological regulator of feeding. *Diabetes*. 55:988-995.

Balmaceda-Aguilera, C., C. Cortes-Campos, M. Cifuentes, B. Peruzzo, L. Mack, J.C.

Tapia, K. Oyarce, M.A. Garcia, and F. Nualart. 2012. Glucose transporter 1 and monocarboxylate transporters 1, 2, and 4 localization within the glial cells of shark blood-brain-barriers. *PloS one*. 7:e32409.

Balland, E., J. Dam, F. Langlet, E. Caron, S. Steculorum, A. Messina, S. Rasika, A. Falluel-Morel, Y. Anouar, B. Dehouck, E. Trinquet, R. Jockers, S.G. Bouret, and V. Prevot. 2014. Hypothalamic tanycytes are an ERK-gated conduit for leptin into the brain. *Cell metabolism*. 19:293-301.

Barros, L.F. 2013. Metabolic signaling by lactate in the brain. *Trends in neurosciences*. 36:396-404.

Barros, L.F., R. Courjaret, P. Jakoby, A. Loaiza, C. Lohr, and J.W. Deitmer. 2009. Preferential transport and metabolism of glucose in Bergmann glia over Purkinje cells: a multiphoton study of cerebellar slices. *Glia*. 57:962-970.

Benton, C.R., Y. Yoshida, J. Lally, X.-X. Han, H. Hatta, and A. Bonen. 2008. PGC-1 $\alpha$  increases skeletal muscle lactate uptake by increasing the expression of MCT1 but not MCT2 or MCT4. *Physiological Genomics*. 35:45-54.

Bergersen, L., E. Johannsson, M.L. Veruki, E.A. Nagelhus, A. Halestrap, O.M. Sejersted, and O.P. Ottersen. 1999. Cellular and subcellular expression of monocarboxylate transporters in the pigment epithelium and retina of the rat. *Neuroscience*. 90:319-331.

Bergersen, L., O. Waerhaug, J. Helm, M. Thomas, P. Laake, A.J. Davies, M.C. Wilson, A.P. Halestrap, and O.P. Ottersen. 2001. A novel postsynaptic density protein: the monocarboxylate transporter MCT2 is co-localized with delta-glutamate receptors in postsynaptic densities of parallel fiber-Purkinje cell synapses. *Experimental brain*

*research*. 136:523-534.

Bergersen, L.H. 2007. Is lactate food for neurons? Comparison of monocarboxylate transporter subtypes in brain and muscle. *Neuroscience*. 145:11-19.

Bigard, X., H. Sanchez, J. Zoll, P. Mateo, V. Rousseau, V. Veksler, and R. Ventura-Clapier. 2000. Calcineurin Co-regulates contractile and metabolic components of slow muscle phenotype. *The Journal of biological chemistry*. 275:19653-19660.

Bittencourt, J.C., F. Presse, C. Arias, C. Peto, J. Vaughan, J.L. Nahon, W. Vale, and P.E. Sawchenko. 1992. The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: an immuno- and hybridization histochemical characterization. *The Journal of comparative neurology*. 319:218-245.

Blazquez, C., C. Sanchez, A. Daza, I. Galve-Roperh, and M. Guzman. 1999. The stimulation of ketogenesis by cannabinoids in cultured astrocytes defines carnitine palmitoyltransferase I as a new ceramide-activated enzyme. *Journal of neurochemistry*. 72:1759-1768.

Blevins, J.E., P.K. Chelikani, A.C. Haver, and R.D. Reidelberger. 2008. PYY(3-36) Induces Fos in the Arcuate Nucleus and in both Catecholaminergic and Non-catecholaminergic Neurons in the Nucleus Tractus Solitarius of Rats. *Peptides*. 29:112-119.

Blouet, C., and G.J. Schwartz. 2010. Hypothalamic nutrient sensing in the control of energy homeostasis. *Behavioural brain research*. 209:1-12.

Bogan, J.S. 2012. Regulation of glucose transporter translocation in health and diabetes.

*Annual review of biochemistry.* 81:507-532.

Borg, W.P., M.J. During, R.S. Sherwin, M.A. Borg, M.L. Brines, and G.I. Shulman. 1994. Ventromedial hypothalamic lesions in rats suppress counterregulatory responses to hypoglycemia. *The Journal of clinical investigation.* 93:1677-1682.

Boughton, C.K., and K.G. Murphy. 2013. Can neuropeptides treat obesity? A review of neuropeptides and their potential role in the treatment of obesity. *British journal of pharmacology.* 170:1333-1348.

Bouzier-Sore, A.-K., P. Voisin, V. Bouchaud, E. Bezancon, J.-M. Franconi, and L. Pellerin. 2006. Competition between glucose and lactate as oxidative energy substrates in both neurons and astrocytes: a comparative NMR study. *European Journal of Neuroscience.* 24:1687-1694.

Bouzier-Sore, A.-K., P. Voisin, P. Canioni, P.J. Magistretti, and L. Pellerin. 2003. Lactate is a Preferential Oxidative Energy Substrate over Glucose for Neurons in Culture. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism.* 23:1298-1306.

Brawer, J.R. 1972. The fine structure of the ependymal tanycytes at the level of the arcuate nucleus. *The Journal of comparative neurology.* 145:25-41.

Bray, G.A. 1991. Weight homeostasis. *Annual review of medicine.* 42:205-216.

Brobeck, J.R. 1946. Mechanism of the development of obesity in animals with hypothalamic lesions. *Physiological reviews.* 26:541-559.

Broberger, C. 2005. Brain regulation of food intake and appetite: molecules and networks. *Journal of internal medicine.* 258:301-327.

Broberger, C., J. Johansen, C. Johansson, M. Schalling, and T. Hokfelt. 1998. The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95:15043-15048.

Broer, S., A. Broer, H.P. Schneider, C. Stegen, A.P. Halestrap, and J.W. Deitmer. 1999. Characterization of the high-affinity monocarboxylate transporter MCT2 in *Xenopus laevis* oocytes. *The Biochemical journal*. 341 ( Pt 3):529-535.

Broer, S., B. Rahman, G. Pellegrini, L. Pellerin, J.L. Martin, S. Verleystonk, B. Hamprecht, and P.J. Magistretti. 1997. Comparison of lactate transport in astroglial cells and monocarboxylate transporter 1 (MCT 1) expressing *Xenopus laevis* oocytes. Expression of two different monocarboxylate transporters in astroglial cells and neurons. *The Journal of biological chemistry*. 272:30096-30102.

Broer, S., H.P. Schneider, A. Broer, B. Rahman, B. Hamprecht, and J.W. Deitmer. 1998. Characterization of the monocarboxylate transporter 1 expressed in *Xenopus laevis* oocytes by changes in cytosolic pH. *The Biochemical journal*. 333 ( Pt 1):167-174.

Bruni, J.E., D.G. Montemurro, R.E. Clattenburg, and R.P. Singh. 1972. A scanning electron microscopic study of the ependymal surface of the third ventricle of the rabbit, rat, mouse and human brain. *The Anatomical record*. 174:407-420.

Burdakov, D., S.M. Luckman, and A. Verkhratsky. 2005. Glucose-sensing neurons of the hypothalamus. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*. 360:2227-2235.

Burton-Freeman, B., D.W. Gietzen, and B.O. Schneeman. 1997. Meal pattern analysis to

investigate the satiating potential of fat, carbohydrate, and protein in rats. *The American journal of physiology*. 273:R1916-1922.

Carneiro, L., S. Geller, X. Fioramonti, A. Hebert, C. Repond, C. Leloup, and L. Pellerin. 2016. Evidence for hypothalamic ketone body sensing: impact on food intake and peripheral metabolic responses in mice. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*. 310:E103-115.

Ciofi, P., M. Garret, O. Lapirot, P. Lafon, A. Loyens, V. Prevot, and J.E. Levine. 2009. Brain-endocrine interactions: a microvascular route in the mediobasal hypothalamus. *Endocrinology*. 150:5509-5519.

Cook, D.L., L.S. Satin, M.L. Ashford, and C.N. Hales. 1988. ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in pancreatic beta-cells. Spare-channel hypothesis. *Diabetes*. 37:495-498.

Cortes-Campos, C., R. Elizondo, C. Carril, F. Martinez, K. Boric, F. Nualart, and M.A. Garcia-Robles. 2013. MCT2 expression and lactate influx in anorexigenic and orexigenic neurons of the arcuate nucleus. *PloS one*. 8:e62532.

Cortes-Campos, C., R. Elizondo, P. Llanos, R.M. Uranga, F. Nualart, and M.A. Garcia. 2011. MCT expression and lactate influx/efflux in tanycytes involved in glia-neuron metabolic interaction. *PloS one*. 6:e16411.

Cowley, M.A., J.L. Smart, M. Rubinstein, M.G. Cerdan, S. Diano, T.L. Horvath, R.D. Cone, and M.J. Low. 2001. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature*. 411:480-484.

Crawley, J.N. 1995. Biological actions of galanin. *Regulatory peptides*. 59:1-16.

Cremer, J.E. 1982. Substrate utilization and brain development. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2:394-407.

Crowley, W.R., G.V. Shah, B.L. Carroll, D. Kennedy, M.E. Dockter, and S.P. Kalra. 1990. Neuropeptide-Y enhances luteinizing hormone (LH)-releasing hormone-induced LH release and elevations in cytosolic Ca<sup>2+</sup> in rat anterior pituitary cells: evidence for involvement of extracellular Ca<sup>2+</sup> influx through voltage-sensitive channels. *Endocrinology*. 127:1487-1494.

Cui, W., N.D. Allen, M. Skynner, B. Gusterson, and A.J. Clark. 2001. Inducible ablation of astrocytes shows that these cells are required for neuronal survival in the adult brain. *Glia*. 34:272-282.

Chauvet, N., M.L. Parmentier, and G. Alonso. 1995. Transected axons of adult hypothalamo-neurohypophysial neurons regenerate along tancytic processes. *Journal of neuroscience research*. 41:129-144.

Chavan, R., C. Feillet, S.S. Costa, J.E. Delorme, T. Okabe, J.A. Ripperger, and U. Albrecht. 2016. Liver-derived ketone bodies are necessary for food anticipation. *Nature communications*. 7:10580.

Chenal, J., and L. Pellerin. 2007. Noradrenaline enhances the expression of the neuronal monocarboxylate transporter MCT2 by translational activation via stimulation of PI3K/Akt and the mTOR/S6K pathway. *Journal of neurochemistry*. 102:389-397.

Chenal, J., K. Pierre, and L. Pellerin. 2008. Insulin and IGF-1 enhance the expression of the neuronal monocarboxylate transporter MCT2 by translational activation via stimulation

of the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin pathway. *The European journal of neuroscience*. 27:53-65.

Chih, C.P., P. Lipton, and E.L. Roberts, Jr. 2001. Do active cerebral neurons really use lactate rather than glucose? *Trends in neurosciences*. 24:573-578.

Chiry, O., W.N. Fishbein, N. Merezhinskaya, S. Clarke, R. Galuske, P.J. Magistretti, and L. Pellerin. 2008. Distribution of the monocarboxylate transporter MCT2 in human cerebral cortex: an immunohistochemical study. *Brain Res*. 1226:61-69.

Date, Y., M. Kojima, H. Hosoda, A. Sawaguchi, M.S. Mondal, T. Suganuma, S. Matsukura, K. Kangawa, and M. Nakazato. 2000. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology*. 141:4255-4261.

Date, Y., M. Nakazato, S. Hashiguchi, K. Dezaki, M.S. Mondal, H. Hosoda, M. Kojima, K. Kangawa, T. Arima, H. Matsuo, T. Yada, and S. Matsukura. 2002. Ghrelin is present in pancreatic alpha-cells of humans and rats and stimulates insulin secretion. *Diabetes*. 51:124-129.

de Graaf, C., W.A. Blom, P.A. Smeets, A. Stafleu, and H.F. Hendriks. 2004. Biomarkers of satiation and satiety. *The American journal of clinical nutrition*. 79:946-961.

de Lecea, L., T.S. Kilduff, C. Peyron, X. Gao, P.E. Foye, P.E. Danielson, C. Fukuhara, E.L. Battenberg, V.T. Gautvik, F.S. Bartlett, 2nd, W.N. Frankel, A.N. van den Pol, F.E. Bloom, K.M. Gautvik, and J.G. Sutcliffe. 1998. The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95:322-327.



De Saedeleer, C.J., T. Copetti, P.E. Porporato, J. Verrax, O. Feron, and P. Sonveaux. 2012. Lactate Activates HIF-1 in Oxidative but Not in Warburg-Phenotype Human Tumor Cells. *PloS one*. 7:e46571.

de Vries, M.G., L.M. Arseneau, M.E. Lawson, and J.L. Beverly. 2003. Extracellular glucose in rat ventromedial hypothalamus during acute and recurrent hypoglycemia. *Diabetes*. 52:2767-2773.

Dimmer, K.S., B. Friedrich, F. Lang, J.W. Deitmer, and S. Broer. 2000. The low-affinity monocarboxylate transporter MCT4 is adapted to the export of lactate in highly glycolytic cells. *The Biochemical journal*. 350 Pt 1:219-227.

Dombrowski, G.J., Jr., K.R. Swiatek, and K.L. Chao. 1989. Lactate, 3-hydroxybutyrate, and glucose as substrates for the early postnatal rat brain. *Neurochemical research*. 14:667-675.

Dringen, R., R. Gebhardt, and B. Hamprecht. 1993. Glycogen in astrocytes: possible function as lactate supply for neighboring cells. *Brain Res*. 623:208-214.

Duale, H., S. Kasparov, J.F. Paton, and A.G. Teschemacher. 2005. Differences in transductional tropism of adenoviral and lentiviral vectors in the rat brainstem. *Experimental physiology*. 90:71-78.

Dunn-Meynell, A.A., E. Govek, and B.E. Levin. 1997. Intracarotid glucose selectively increases Fos-like immunoreactivity in paraventricular, ventromedial and dorsomedial nuclei neurons. *Brain Research*. 748:100-106.

Ebrahim, I.O., R.S. Howard, M.D. Kopelman, M.K. Sharief, and A.J. Williams. 2002. The

hypocretin/orexin system. *Journal of the Royal Society of Medicine*. 95:227-230.

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

Elizondo-Vega, R., C. Cortes-Campos, M. Barahona, P. Ordenes, C. Carril, M. Salgado, K. Oyarce, and M. Garcia. 2016. Inhibition of hypothalamic MCT1 expression increases food intake and alters orexigenic and anorexigenic neuropeptide expression. *Scientific Report (En revisión)*.

Elizondo-Vega, R., C. Cortes-Campos, M.J. Barahona, K.A. Oyarce, C.A. Carril, and M.A. Garcia-Robles. 2015. The role of tanycytes in hypothalamic glucosensing. *Journal of cellular and molecular medicine*. 19:1471-1482.

Elmquist, J.K., R.S. Ahima, C.F. Elias, J.S. Flier, and C.B. Saper. 1998. Leptin activates distinct projections from the dorsomedial and ventromedial hypothalamic nuclei. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95:741-746.

Fioramonti, X., S. Contie, Z. Song, V.H. Routh, A. Lorsignol, and L. Penicaud. 2007. Characterization of glucosensing neuron subpopulations in the arcuate nucleus: integration in neuropeptide Y and pro-opio melanocortin networks? *Diabetes*. 56:1219-1227.

Flament-Durand, J., and J.P. Brion. 1985. Tanycytes: morphology and functions: a review. *International review of cytology*. 96:121-155.

Flier, J.S. 2004. Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell*. 116:337-350.

Forbes, S., S. Bui, B.R. Robinson, U. Hochgeschwender, and M.B. Brennan. 2001. Integrated control of appetite and fat metabolism by the leptin-proopiomelanocortin pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98:4233-4237.

Frayling, C., R. Britton, and N. Dale. 2011. ATP-mediated glucosensing by hypothalamic tanycytes. *The Journal of physiology*. 589:2275-2286.

Friesema, E.C., S. Ganguly, A. Abdalla, J.E. Manning Fox, A.P. Halestrap, and T.J. Visser. 2003. Identification of monocarboxylate transporter 8 as a specific thyroid hormone transporter. *The Journal of biological chemistry*. 278:40128-40135.

Fuente-Martin, E., C. Garcia-Caceres, P. Argente-Arizon, F. Diaz, M. Granado, A. Freire-Regatillo, D. Castro-Gonzalez, M.L. Ceballos, L.M. Frago, S.L. Dickson, J. Argente, and J.A. Chowen. 2016. Ghrelin Regulates Glucose and Glutamate Transporters in Hypothalamic Astrocytes. *Scientific reports*. 6:23673.

Garcia, C.K., M.S. Brown, R.K. Pathak, and J.L. Goldstein. 1995. cDNA cloning of MCT2, a second monocarboxylate transporter expressed in different cells than MCT1. *The Journal of biological chemistry*. 270:1843-1849.

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

Garcia, M.A., M. Carrasco, A. Godoy, K. Reinicke, V.P. Montecinos, L.G. Aguayo, J.C. Tapia, J.C. Vera, and F. Nualart. 2001. Elevated expression of glucose transporter-1 in hypothalamic ependymal cells not involved in the formation of the brain-cerebrospinal fluid barrier. *Journal of cellular biochemistry*. 80:491-503.

Gautron, L., and J.K. Elmquist. 2011. Sixteen years and counting: an update on leptin in energy balance. *The Journal of clinical investigation*. 121:2087-2093.

Gerhart, D.Z., B.E. Enerson, O.Y. Zhdankina, R.L. Leino, and L.R. Drewes. 1997. Expression of monocarboxylate transporter MCT1 by brain endothelium and glia in adult and suckling rats. *The American journal of physiology*. 273:E207-213.

Giaume, C., A. Taberero, and J.M. Medina. 1997. Metabolic trafficking through astrocytic gap junctions. *Glia*. 21:114-123.

Goldberg, M.P., and D.W. Choi. 1993. Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture: calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 13:3510-3524.

Grollman, E.F., N.J. Philp, P. McPhie, R.D. Ward, and B. Sauer. 2000. Determination of transport kinetics of chick MCT3 monocarboxylate transporter from retinal pigment epithelium by expression in genetically modified yeast. *Biochemistry*. 39:9351-9357.

Hahn, T.M., J.F. Breininger, D.G. Baskin, and M.W. Schwartz. 1998. Coexpression of *AgRP* and *NPY* in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nature neuroscience*. 1:271-272.

Halestrap, A.P. 2012. The monocarboxylate transporter family--Structure and functional characterization. *IUBMB life*. 64:1-9.

Halestrap, A.P. 2013. Monocarboxylic acid transport. *Comprehensive Physiology*. 3:1611-1643.

Halestrap, A.P., and N.T. Price. 1999. The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *The Biochemical journal*. 343 Pt 2:281-299.

Halestrap, A.P., X. Wang, R.C. Poole, V.N. Jackson, and N.T. Price. 1997. Lactate transport in heart in relation to myocardial ischemia. *The American journal of cardiology*. 80:17A-25A.

Hanu, R., M. McKenna, A. O'Neill, W.G. Resneck, and R.J. Bloch. 2000. Monocarboxylic acid transporters, MCT1 and MCT2, in cortical astrocytes in vitro and in vivo. *American journal of physiology. Cell physiology*. 278:C921-930.

Hatta, H., M. Tonouchi, D. Miskovic, Y. Wang, J.J. Heikkila, and A. Bonen. 2001. Tissue-specific and isoform-specific changes in MCT1 and MCT4 in heart and soleus muscle during a 1-yr period. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*. 281:E749-756.

Hawkins, R.A., D.H. Williamson, and H.A. Krebs. 1971. Ketone-body utilization by adult and suckling rat brain in vivo. *The Biochemical journal*. 122:13-18.

Higuchi, H., T. Niki, and T. Shiiya. 2008. Feeding behavior and gene expression of appetite-related neuropeptides in mice lacking for neuropeptide Y Y5 receptor subclass.

*World journal of gastroenterology.* 14:6312-6317.

Hillebrand, J.J., D. de Wied, and R.A. Adan. 2002. Neuropeptides, food intake and body weight regulation: a hypothalamic focus. *Peptides.* 23:2283-2306.

Himmi, T., J. Perrin, M. Dallaporta, and J.C. Orsini. 2001. Effects of lactate on glucose-sensing neurons in the solitary tract nucleus. *Physiology & behavior.* 74:391-397.

Hugo, S.E., L. Cruz-Garcia, S. Karanth, R.M. Anderson, D.Y. Stainier, and A. Schlegel. 2012. A monocarboxylate transporter required for hepatocyte secretion of ketone bodies during fasting. *Genes & development.* 26:282-293.

Ibrahim, N., M.A. Bosch, J.L. Smart, J. Qiu, M. Rubinstein, O.K. Ronnekleiv, M.J. Low, and M.J. Kelly. 2003. Hypothalamic proopiomelanocortin neurons are glucose responsive and express K(ATP) channels. *Endocrinology.* 144:1331-1340.

Ishikawa, K., Y. Taniguchi, K. Inoue, K. Kurosumi, and M. Suzuki. 1988. Immunocytochemical delineation of thyrotrophic area: origin of thyrotropin-releasing hormone in the median eminence. *Neuroendocrinology.* 47:384-388.

Iversen, L. 1999. Neuropeptides: Regulators of Physiological Processes. *Trends in neurosciences.* 22:482.

Jackson, V.N., and A.P. Halestrap. 1996. The kinetics, substrate, and inhibitor specificity of the monocarboxylate (lactate) transporter of rat liver cells determined using the fluorescent intracellular pH indicator, 2',7'-bis(carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein. *The Journal of biological chemistry.* 271:861-868.

Johannsson, E., P.K. Lunde, C. Heddle, I. Sjaastad, M.J. Thomas, L. Bergersen, A.P.

Halestrap, T.W. Blackstad, O.P. Ottersen, and O.M. Sejersted. 2001. Upregulation of the cardiac monocarboxylate transporter MCT1 in a rat model of congestive heart failure. *Circulation*. 104:729-734.

Jureus, A., M.J. Cunningham, M.E. McClain, D.K. Clifton, and R.A. Steiner. 2000. Galanin-like peptide (GALP) is a target for regulation by leptin in the hypothalamus of the rat. *Endocrinology*. 141:2703-2706.

Kacem, K., P. Lacombe, J. Seylaz, and G. Bonvento. 1998. Structural organization of the perivascular astrocyte endfeet and their relationship with the endothelial glucose transporter: a confocal microscopy study. *Glia*. 23:1-10.

Kalra, S.P., M.G. Dube, S. Pu, B. Xu, T.L. Horvath, and P.S. Kalra. 1999. Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocrine reviews*. 20:68-100.

Kerr, N.C., F.E. Holmes, and D. Wynick. 2000. Galanin-like peptide (GALP) is expressed in rat hypothalamus and pituitary, but not in DRG. *Neuroreport*. 11:3909-3913.

Kim, D.K., Y. Kanai, H. Matsuo, J.Y. Kim, A. Chairoungdua, Y. Kobayashi, A. Enomoto, S.H. Cha, T. Goya, and H. Endou. 2002. The human T-type amino acid transporter-1: characterization, gene organization, and chromosomal location. *Genomics*. 79:95-103.

Kittner, H., H. Franke, J.I. Harsch, I.M. El-Ashmawy, B. Seidel, U. Krugel, and P. Illies. 2006. Enhanced food intake after stimulation of hypothalamic P2Y1 receptors in rats: modulation of feeding behaviour by extracellular nucleotides. *The European journal of neuroscience*. 24:2049-2056.

Koehler-Stec, E.M., I.A. Simpson, S.J. Vannucci, K.T. Landschulz, and W.H. Landschulz. 1998. Monocarboxylate transporter expression in mouse brain. *The American journal of physiology*. 275:E516-524.

Kristensen, P., M.E. Judge, L. Thim, U. Ribel, K.N. Christjansen, B.S. Wulff, J.T. Clausen, P.B. Jensen, O.D. Madsen, N. Vrang, P.J. Larsen, and S. Hastrup. 1998. Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature*. 393:72-76.

Lam, C.K., M. Chari, P.Y. Wang, and T.K. Lam. 2008. Central lactate metabolism regulates food intake. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*. 295:E491-496.

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

Langlet, F. 2014. Tanycytes: a gateway to the metabolic hypothalamus. *Journal of neuroendocrinology*. 26:753-760.

Langlet, F., B.E. Levin, S. Luquet, M. Mazzone, A. Messina, A.A. Dunn-Meynell, E. Balland, A. Lacombe, D. Mazur, P. Carmeliet, S.G. Bouret, V. Prevot, and B. Dehouck. 2013a. Tanycytic VEGF-A boosts blood-hypothalamus barrier plasticity and access of metabolic signals to the arcuate nucleus in response to fasting. *Cell metabolism*. 17:607-617.

Langlet, F., A. Mullier, S.G. Bouret, V. Prevot, and B. Dehouck. 2013b. Tanycyte-like cells form a blood-cerebrospinal fluid barrier in the circumventricular organs of the mouse brain. *The Journal of comparative neurology*. 521:3389-3405.



Larrabee, M.G. 1983. Lactate uptake and release in the presence of glucose by sympathetic ganglia of chicken embryos and by neuronal and nonneuronal cultures prepared from these ganglia. *Journal of neurochemistry*. 40:1237-1250.

Larrabee, M.G. 1995. Lactate metabolism and its effects on glucose metabolism in an excised neural tissue. *Journal of neurochemistry*. 64:1734-1741.

Lee, D.A., J.L. Bedont, T. Pak, H. Wang, J. Song, A. Miranda-Angulo, V. Takiar, V. Charubhumi, F. Balordi, H. Takebayashi, S. Aja, E. Ford, G. Fishell, and S. Blackshaw. 2012a. Tanycytes of the hypothalamic median eminence form a diet-responsive neurogenic niche. *Nature neuroscience*. 15:700-702.

Lee, W.J., M. Kim, H.S. Park, H.S. Kim, M.J. Jeon, K.S. Oh, E.H. Koh, J.C. Won, M.S. Kim, G.T. Oh, M. Yoon, K.U. Lee, and J.Y. Park. 2006. AMPK activation increases fatty acid oxidation in skeletal muscle by activating PPARalpha and PGC-1. *Biochemical and biophysical research communications*. 340:291-295.

Lee, Y., B.M. Morrison, Y. Li, S. Lengacher, M.H. Farah, P.N. Hoffman, Y. Liu, A. Tsingalia, L. Jin, P.W. Zhang, L. Pellerin, P.J. Magistretti, and J.D. Rothstein. 2012b. Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. *Nature*. 487:443-448.

Leibowitz, S.F., P. Roossin, and M. Rosenn. 1984. Chronic norepinephrine injection into the hypothalamic paraventricular nucleus produces hyperphagia and increased body weight in the rat. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 21:801-808.

Leino, R.L., D.Z. Gerhart, and L.R. Drewes. 1999. Monocarboxylate transporter (MCT1) abundance in brains of suckling and adult rats: a quantitative electron microscopic

immunogold study. *Brain research. Developmental brain research.* 113:47-54.

Lengacher, S., T. Nehiri-Sitayeb, N. Steiner, L. Carneiro, C. Favrod, F. Preitner, B. Thorens, J.C. Stehle, L. Dix, F. Pralong, P.J. Magistretti, and L. Pellerin. 2013. Resistance to diet-induced obesity and associated metabolic perturbations in haploinsufficient monocarboxylate transporter 1 mice. *PloS one.* 8:e82505.

Levin, B.E., A.A. Dunn-Meynell, and V.H. Routh. 1999. Brain glucose sensing and body energy homeostasis: role in obesity and diabetes. *The American journal of physiology.* 276:R1223-1231.

Levin, B.E., V.H. Routh, L. Kang, N.M. Sanders, and A.A. Dunn-Meynell. 2004. Neuronal glucosensing: what do we know after 50 years? *Diabetes.* 53:2521-2528.

Lin, R.Y., J.C. Vera, R.S. Chaganti, and D.W. Golde. 1998. Human monocarboxylate transporter 2 (MCT2) is a high affinity pyruvate transporter. *The Journal of biological chemistry.* 273:28959-28965.

Liposits, Z., I. Merchenthaler, W.C. Wetsel, J.J. Reid, P.L. Mellon, R.I. Weiner, and A. Negro-Vilar. 1991. Morphological characterization of immortalized hypothalamic neurons synthesizing luteinizing hormone-releasing hormone. *Endocrinology.* 129:1575-1583.

Lustig, R.H., F. Greenway, P. Velasquez-Mieyer, D. Heimbürger, D. Schumacher, D. Smith, W. Smith, N. Soler, G. Warsi, W. Berg, J. Maloney, J. Benedetto, W. Zhu, and J. Hohnaker. 2006. A multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-finding trial of a long-acting formulation of octreotide in promoting weight loss in obese adults with insulin hypersecretion. *International journal of obesity.* 30:331-341.

Magistretti, P.J., and L. Pellerin. 1999. Cellular mechanisms of brain energy metabolism and their relevance to functional brain imaging. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences.* 354:1155-1163.

Magni, P., E. Dozio, M. Ruscica, F. Celotti, M.A. Masini, P. Prato, M. Broccoli, A. Mambro, M. More, and F. Stollo. 2009. Feeding behavior in mammals including humans. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1163:221-232.

Manning Fox, J.E., D. Meredith, and A.P. Halestrap. 2000. Characterisation of human monocarboxylate transporter 4 substantiates its role in lactic acid efflux from skeletal muscle. *The Journal of physiology.* 529 Pt 2:285-293.

Marty, N., M. Dallaporta, M. Foretz, M. Emery, D. Tarussio, I. Bady, C. Binnert, F. Beermann, and B. Thorens. 2005. Regulation of glucagon secretion by glucose transporter type 2 (glut2) and astrocyte-dependent glucose sensors. *The Journal of clinical investigation.* 115:3545-3553.

Marty, N., M. Dallaporta, and B. Thorens. 2007. Brain glucose sensing, counterregulation, and energy homeostasis. *Physiology.* 22:241-251.

Matsumoto, N., M. Sorimachi, and N. Akaike. 2004. Excitatory effects of ATP on rat dorsomedial hypothalamic neurons. *Brain Res.* 1009:234-237.

Matsuyama, S., S. Ohkura, K. Iwata, Y. Uenoyama, H. Tsukamura, K. Maeda, and K. Kimura. 2009. Food deprivation induces monocarboxylate transporter 2 expression in the brainstem of female rat. *The Journal of reproduction and development.* 55:256-261.

Mayer, J. 1953. Glucostatic mechanism of regulation of food intake. *The New England*

*journal of medicine.* 249:13-16.

Meloni, A.R., M.B. DeYoung, C. Lowe, and D.G. Parkes. 2013. GLP-1 receptor activated insulin secretion from pancreatic beta-cells: mechanism and glucose dependence. *Diabetes, obesity & metabolism.* 15:15-27.

Mellon, P.L., J.J. Windle, P.C. Goldsmith, C.A. Padula, J.L. Roberts, and R.I. Weiner. 1990. Immortalization of hypothalamic GnRH neurons by genetically targeted tumorigenesis. *Neuron.* 5:1-10.

Merchenthaler, I., and Z. Liposits. 1994. Mapping of thyrotropin-releasing hormone (TRH) neuronal systems of rat forebrain projecting to the median eminence and the OVLT. Immunocytochemistry combined with retrograde labeling at the light and electron microscopic levels. *Acta biologica Hungarica.* 45:361-374.

Meredith, D., P. Bell, B. McClure, and R. Wilkins. 2002. Functional and molecular characterisation of lactic acid transport in bovine articular chondrocytes. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology.* 12:227-234.

Millan, C., F. Martinez, C. Cortes-Campos, I. Lizama, M.J. Yanez, P. Llanos, K. Reinicke, F. Rodriguez, B. Peruzzo, F. Nualart, and M.A. Garcia. 2010. Glial glucokinase expression in adult and post-natal development of the hypothalamic region. *ASN neuro.* 2:e00035.

Millington, G.W. 2007. The role of proopiomelanocortin (POMC) neurones in feeding behaviour. *Nutrition & metabolism.* 4:18.

Miselis, R.R., and A.N. Epstein. 1975. Feeding induced by intracerebroventricular 2-

deoxy-D-glucose in the rat. *The American journal of physiology*. 229:1438-1447.

Murakami, Y., N. Kohyama, Y. Kobayashi, M. Ohbayashi, H. Ohtani, Y. Sawada, and T. Yamamoto. 2005. Functional characterization of human monocarboxylate transporter 6 (SLC16A5). *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 33:1845-1851.

Muroya, S., T. Yada, S. Shioda, and M. Takigawa. 1999. Glucose-sensitive neurons in the rat arcuate nucleus contain neuropeptide Y. *Neuroscience letters*. 264:113-116.

Murray, C.M., R. Hutchinson, J.R. Bantick, G.P. Belfield, A.D. Benjamin, D. Brazma, R.V. Bundick, I.D. Cook, R.I. Craggs, S. Edwards, L.R. Evans, R. Harrison, E. Holness, A.P. Jackson, C.G. Jackson, L.P. Kingston, M.W. Perry, A.R. Ross, P.A. Rugman, S.S. Sidhu, M. Sullivan, D.A. Taylor-Fishwick, P.C. Walker, Y.M. Whitehead, D.J. Wilkinson, A. Wright, and D.K. Donald. 2005. Monocarboxylate transporter MCT1 is a target for immunosuppression. *Nature chemical biology*. 1:371-376.

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

Nicholson, C. 1995. Extracellular space as the pathway for neuron-glia cell interaction. In: *Neuroglia*. Oxford University Press:387-397.

Nunez-Parra, A., C. Cortes-Campos, J. Bacigalupo, L. Garcia Mde, F. Nualart, and J.G. Reyes. 2011. Expression and distribution of facilitative glucose (GLUTs) and monocarboxylate/H<sup>+</sup> (MCTs) transporters in rat olfactory epithelia. *Chemical senses*. 36:771-780.

Ojuka, E.O. 2004. Role of calcium and AMP kinase in the regulation of mitochondrial biogenesis and GLUT4 levels in muscle. *The Proceedings of the Nutrition Society*. 63:275-278.

Olson, B.R., M.D. Drutarosky, M.S. Chow, V.J. Hruby, E.M. Stricker, and J.G. Verbalis. 1991. Oxytocin and an oxytocin agonist administered centrally decrease food intake in rats. *Peptides*. 12:113-118.

Oomura, Y., K. Kimura, H. Ooyama, T. Maeno, M. Iki, and M. Kuniyoshi. 1964. Reciprocal Activities of the Ventromedial and Lateral Hypothalamic Areas of Cats. *Science*. 143:484-485.

Oomura, Y., T. Ono, H. Ooyama, and M.J. Wayner. 1969. Glucose and osmosensitive neurones of the rat hypothalamus. *Nature*. 222:282-284.

Oomura, Y., K. Sasaki, K. Suzuki, T. Muto, A.J. Li, Z. Ogita, K. Hanai, I. Tooyama, H. Kimura, and N. Yanaihara. 1992. A new brain glucosensor and its physiological significance. *The American journal of clinical nutrition*. 55:278S-282S.

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

Orellana, J.A., P.J. Saez, C. Cortes-Campos, R.J. Elizondo, K.F. Shoji, S. Contreras-Duarte, V. Figueroa, V. Velarde, J.X. Jiang, F. Nualart, J.C. Saez, and M.A. Garcia. 2012. Glucose increases intracellular free Ca(2+) in tanycytes via ATP released through connexin 43 hemichannels. *Glia*. 60:53-68.

Ovens, M.J., A.J. Davies, M.C. Wilson, C.M. Murray, and A.P. Halestrap. 2010a. AR-

C155858 is a potent inhibitor of monocarboxylate transporters MCT1 and MCT2 that binds to an intracellular site involving transmembrane helices 7-10. *The Biochemical journal*. 425:523-530.

Ovens, M.J., C. Manoharan, M.C. Wilson, C.M. Murray, and A.P. Halestrap. 2010b. The inhibition of monocarboxylate transporter 2 (MCT2) by AR-C155858 is modulated by the associated ancillary protein. *The Biochemical journal*. 431:217-225.

Parton, L.E., C.P. Ye, R. Coppari, P.J. Enriori, B. Choi, C.Y. Zhang, C. Xu, C.R. Vianna, N. Balthasar, C.E. Lee, J.K. Elmquist, M.A. Cowley, and B.B. Lowell. 2007. Glucose sensing by POMC neurons regulates glucose homeostasis and is impaired in obesity. *Nature*. 449:228-232.

Pellerin, L., L.H. Bergersen, A.P. Halestrap, and K. Pierre. 2005. Cellular and subcellular distribution of monocarboxylate transporters in cultured brain cells and in the adult brain. *Journal of neuroscience research*. 79:55-64.

Pellerin, L., and P.J. Magistretti. 1994. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91:10625-10629.

Pellerin, L., G. Pellegrini, P.G. Bittar, Y. Charnay, C. Bouras, J.L. Martin, N. Stella, and P.J. Magistretti. 1998. Evidence supporting the existence of an activity-dependent astrocyte-neuron lactate shuttle. *Developmental neuroscience*. 20:291-299.

Penicaud, L., C. Leloup, X. Fioramonti, A. Lorsignol, and A. Benani. 2006. Brain glucose sensing: a subtle mechanism. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*.

9:458-462.

Perez de Heredia, F., I.S. Wood, and P. Trayhurn. 2010. Hypoxia stimulates lactate release and modulates monocarboxylate transporter (MCT1, MCT2, and MCT4) expression in human adipocytes. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 459:509-518.

Peruzzo, B., F.E. Pastor, J.L. Blazquez, K. Schobitz, B. Pelaez, P. Amat, and E.M. Rodriguez. 2000. A second look at the barriers of the medial basal hypothalamus. *Experimental brain research*. 132:10-26.

Philp, N.J., J.D. Ochriotor, C. Rudoy, T. Muramatsu, and P.J. Linser. 2003. Loss of MCT1, MCT3, and MCT4 expression in the retinal pigment epithelium and neural retina of the 5A11/basigin-null mouse. *Investigative ophthalmology & visual science*. 44:1305-1311.

Pierre, K., A. Parent, P.Y. Jayet, A.P. Halestrap, U. Scherrer, and L. Pellerin. 2007. Enhanced expression of three monocarboxylate transporter isoforms in the brain of obese mice. *The Journal of physiology*. 583:469-486.

Pierre, K., and L. Pellerin. 2005. Monocarboxylate transporters in the central nervous system: distribution, regulation and function. *Journal of neurochemistry*. 94:1-14.

Pierre, K., L. Pellerin, R. Debernardi, B.M. Riederer, and P.J. Magistretti. 2000. Cell-specific localization of monocarboxylate transporters, MCT1 and MCT2, in the adult mouse brain revealed by double immunohistochemical labeling and confocal microscopy. *Neuroscience*. 100:617-627.

Poitry-Yamate, C.L., S. Poitry, and M. Tsacopoulos. 1995. Lactate released by Muller glial



cells is metabolized by photoreceptors from mammalian retina. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 15:5179-5191.

Poole, R.C., and A.P. Halestrap. 1993. Transport of lactate and other monocarboxylates across mammalian plasma membranes. *The American journal of physiology*. 264:C761-782.

Pullen, T.J., G. da Silva Xavier, G. Kelsey, and G.A. Rutter. 2011. miR-29a and miR-29b contribute to pancreatic beta-cell-specific silencing of monocarboxylate transporter 1 (Mct1). *Molecular and cellular biology*. 31:3182-3194.

Rafiki, A., J.L. Boulland, A.P. Halestrap, O.P. Ottersen, and L. Bergersen. 2003. Highly differential expression of the monocarboxylate transporters MCT2 and MCT4 in the developing rat brain. *Neuroscience*. 122:677-688.

Ransom, B., T. Behar, and M. Nedergaard. 2003. New roles for astrocytes (stars at last). *Trends in neurosciences*. 26:520-522.

Risold, P.Y., R.H. Thompson, and L.W. Swanson. 1997. The structural organization of connections between hypothalamus and cerebral cortex. *Brain research. Brain research reviews*. 24:197-254.

Robins, S.C., I. Stewart, D.E. McNay, V. Taylor, C. Giachino, M. Goetz, J. Ninkovic, N. Briancon, E. Maratos-Flier, J.S. Flier, M.V. Kokoeva, and M. Placzek. 2013. alpha-Tanycytes of the adult hypothalamic third ventricle include distinct populations of FGF-responsive neural progenitors. *Nature communications*. 4:2049.

Rodriguez, E.M., J.L. Blazquez, F.E. Pastor, B. Pelaez, P. Pena, B. Peruzzo, and P. Amat.

2005. Hypothalamic tanycytes: a key component of brain-endocrine interaction. *International review of cytology*. 247:89-164.

Rose, C.R., S.G. Waxman, and B.R. Ransom. 1998. Effects of glucose deprivation, chemical hypoxia, and simulated ischemia on Na<sup>+</sup> homeostasis in rat spinal cord astrocytes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 18:3554-3562.

Sakurai, T., A. Amemiya, M. Ishii, I. Matsuzaki, R.M. Chemelli, H. Tanaka, S.C. Williams, J.A. Richardson, G.P. Kozlowski, S. Wilson, J.R. Arch, R.E. Buckingham, A.C. Haynes, S.A. Carr, R.S. Annan, D.E. McNulty, W.S. Liu, J.A. Terrett, N.A. Elshourbagy, D.J. Bergsma, and M. Yanagisawa. 1998. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*. 92:1 page following 696.

Salgado, M., E. Tarifeno-Saldivia, P. Ordenes, C. Millan, M.J. Yanez, P. Llanos, M. Villagra, R. Elizondo-Vega, F. Martinez, F. Nualart, E. Uribe, and M. de Los Angeles Garcia-Robles. 2014. Dynamic localization of glucokinase and its regulatory protein in hypothalamic tanycytes. *PloS one*. 9:e94035.

Sanders, N.M., A.A. Dunn-Meynell, and B.E. Levin. 2004. Third ventricular alloxan reversibly impairs glucose counterregulatory responses. *Diabetes*. 53:1230-1236.

Sato, T., Y. Fukue, H. Teranishi, Y. Yoshida, and M. Kojima. 2005. Molecular forms of hypothalamic ghrelin and its regulation by fasting and 2-deoxy-d-glucose administration. *Endocrinology*. 146:2510-2516.

Schneeberger, M., R. Gomis, and M. Claret. 2014. Hypothalamic and brainstem neuronal

circuits controlling homeostatic energy balance. *The Journal of endocrinology*. 220:T25-46.

Schuit, F., A. De Vos, S. Farfari, K. Moens, D. Pipeleers, T. Brun, and M. Prentki. 1997. Metabolic fate of glucose in purified islet cells. Glucose-regulated anaplerosis in beta cells. *The Journal of biological chemistry*. 272:18572-18579.

Schuit, F.C., P. Huypens, H. Heimberg, and D.G. Pipeleers. 2001. Glucose sensing in pancreatic beta-cells: a model for the study of other glucose-regulated cells in gut, pancreas, and hypothalamus. *Diabetes*. 50:1-11.

Schurr, A., J.J. Miller, R.S. Payne, and B.M. Rigor. 1999. An increase in lactate output by brain tissue serves to meet the energy needs of glutamate-activated neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 19:34-39.

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

Shimizu, H., E. Watanabe, T.Y. Hiyama, A. Nagakura, A. Fujikawa, H. Okado, Y. Yanagawa, K. Obata, and M. Noda. 2007. Glial Nax channels control lactate signaling to neurons for brain [Na<sup>+</sup>] sensing. *Neuron*. 54:59-72.

Song, Z., and V.H. Routh. 2005. Differential effects of glucose and lactate on glucosensing neurons in the ventromedial hypothalamic nucleus. *Diabetes*. 54:15-22.

Sorimachi, M., H. Ishibashi, T. Moritoyo, and N. Akaike. 2001. Excitatory effect of ATP on acutely dissociated ventromedial hypothalamic neurons of the rat. *Neuroscience*. 105:393-401.

Steffens, A.B., A.J. Scheurink, D. Porte, Jr., and S.C. Woods. 1988. Penetration of peripheral glucose and insulin into cerebrospinal fluid in rats. *The American journal of physiology*. 255:R200-204.

Suhre, K., S.Y. Shin, A.K. Petersen, R.P. Mohn, D. Meredith, B. Wägele, E. Altmaier, CardioGram, P. Deloukas, J. Erdmann, E. Grundberg, C.J. Hammond, M.H. de Angelis, G. Kastenmuller, A. Kottgen, F. Kronenberg, M. Mangino, C. Meisinger, T. Meitinger, H.W. Mewes, M.V. Milburn, C. Prehn, J. Raffler, J.S. Ried, W. Romisch-Margl, N.J. Samani, K.S. Small, H.E. Wichmann, G. Zhai, T. Illig, T.D. Spector, J. Adamski, N. Soranzo, and C. Gieger. 2011. Human metabolic individuality in biomedical and pharmaceutical research. *Nature*. 477:54-60.

Suzuki, A., S.A. Stern, O. Bozdagi, G.W. Huntley, R.H. Walker, P.J. Magistretti, and C.M. Alberini. 2011. Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation. *Cell*. 144:810-823.

Swart, I., J.W. Jahng, J.M. Overton, and T.A. Houpt. 2002. Hypothalamic NPY, AGRP, and POMC mRNA responses to leptin and refeeding in mice. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*. 283:R1020-1026.

Taberner, A., C. Vicario, and J.M. Medina. 1996. Lactate spares glucose as a metabolic fuel in neurons and astrocytes from primary culture. *Neuroscience research*. 26:369-376.

Takimoto, M., and T. Hamada. 2014. Acute exercise increases brain region-specific expression of MCT1, MCT2, MCT4, GLUT1, and COX IV proteins. *Journal of applied physiology*. 116:1238-1250.

Thorens, B. 2001. GLUT2 in pancreatic and extra-pancreatic gluco-detection (review).

*Molecular membrane biology.* 18:265-273.

Thorens, B. 2012. Sensing of glucose in the brain. *Handbook of experimental pharmacology*:277-294.

Thorens, B., H.K. Sarkar, H.R. Kaback, and H.F. Lodish. 1988. Cloning and functional expression in bacteria of a novel glucose transporter present in liver, intestine, kidney, and beta-pancreatic islet cells. *Cell.* 55:281-290.

Tschop, M., D.L. Smiley, and M.L. Heiman. 2000. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature.* 407:908-913.

Ullah, M.S., A.J. Davies, and A.P. Halestrap. 2006. The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1, is up-regulated by hypoxia through a HIF-1alpha-dependent mechanism. *The Journal of biological chemistry.* 281:9030-9037.

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

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

Viale, A., Y. Zhixing, C. Breton, F. Pedeutour, A. Coquerel, D. Jordan, and J.L. Nahon. 1997. The melanin-concentrating hormone gene in human: flanking region analysis, fine chromosome mapping, and tissue-specific expression. *Brain research. Molecular brain research.* 46:243-255.

Vischer, U., B. Blondel, C.B. Wollheim, W. Hoppner, H.J. Seitz, and P.B. Linedjian. 1987. Hexokinase isoenzymes of RIN-m5F insulinoma cells. Expression of glucokinase gene in

insulin-producing cells. *The Biochemical journal*. 241:249-255.

Walz, W., and S. Mukerji. 1988. Lactate release from cultured astrocytes and neurons: a comparison. *Glia*. 1:366-370.

Wang, L., D.H. Saint-Pierre, and Y. Tache. 2002. Peripheral ghrelin selectively increases Fos expression in neuropeptide Y - synthesizing neurons in mouse hypothalamic arcuate nucleus. *Neuroscience letters*. 325:47-51.

Wang, R., X. Liu, S.T. Hentges, A.A. Dunn-Meynell, B.E. Levin, W. Wang, and V.H. Routh. 2004. The regulation of glucose-excited neurons in the hypothalamic arcuate nucleus by glucose and feeding-relevant peptides. *Diabetes*. 53:1959-1965.

Wang, Y., M. Tonouchi, D. Miskovic, H. Hatta, and A. Bonen. 2003. T3 increases lactate transport and the expression of MCT4, but not MCT1, in rat skeletal muscle. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*. 285:E622-E628.

Wender, R., A.M. Brown, R. Fern, R.A. Swanson, K. Farrell, and B.R. Ransom. 2000. Astrocytic glycogen influences axon function and survival during glucose deprivation in central white matter. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 20:6804-6810.

Wetsel, W.C., P.L. Mellon, R.I. Weiner, and A. Negro-Vilar. 1991. Metabolism of pro-luteinizing hormone-releasing hormone in immortalized hypothalamic neurons. *Endocrinology*. 129:1584-1595.

Wetsel, W.C., M.M. Valenca, I. Merchenthaler, Z. Liposits, F.J. Lopez, R.I. Weiner, P.L. Mellon, and A. Negro-Vilar. 1992. Intrinsic pulsatile secretory activity of immortalized

luteinizing hormone-releasing hormone-secreting neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 89:4149-4153.

Wilson, M.C., V.N. Jackson, C. Heddle, N.T. Price, H. Pilegaard, C. Juel, A. Bonen, I. Montgomery, O.F. Hutter, and A.P. Halestrap. 1998. Lactic acid efflux from white skeletal muscle is catalyzed by the monocarboxylate transporter isoform MCT3. *The Journal of biological chemistry*. 273:15920-15926.

Wilson, M.C., D. Meredith, J.E. Fox, C. Manoharan, A.J. Davies, and A.P. Halestrap. 2005. Basigin (CD147) is the target for organomercurial inhibition of monocarboxylate transporter isoforms 1 and 4: the ancillary protein for the insensitive MCT2 is EMBIGIN (gp70). *The Journal of biological chemistry*. 280:27213-27221.

Wollmann, G., C. Acuna-Goycolea, and A.N. van den Pol. 2005. Direct excitation of hypocretin/orexin cells by extracellular ATP at P2X receptors. *Journal of neurophysiology*. 94:2195-2206.

Wren, A.M., C.J. Small, C.R. Abbott, W.S. Dhillo, L.J. Seal, M.A. Cohen, R.L. Batterham, S. Taheri, S.A. Stanley, M.A. Ghatei, and S.R. Bloom. 2001. Ghrelin causes hyperphagia and obesity in rats. *Diabetes*. 50:2540-2547.

Wynne, K., S. Stanley, B. McGowan, and S. Bloom. 2005. Appetite control. *The Journal of endocrinology*. 184:291-318.

Wyss, M.T., R. Jolivet, A. Buck, P.J. Magistretti, and B. Weber. 2011. In vivo evidence for lactate as a neuronal energy source. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 31:7477-7485.

Yang, X.J., L.M. Kow, T. Funabashi, and C.V. Mobbs. 1999. Hypothalamic glucose sensor: similarities to and differences from pancreatic beta-cell mechanisms. *Diabetes*. 48:1763-1772.

Yoon, H., L.A. Donoso, and N.J. Philp. 1999. Cloning of the human monocarboxylate transporter MCT3 gene: localization to chromosome 22q12.3-q13.2. *Genomics*. 60:366-370.

Zhao, C., M.C. Wilson, F. Schuit, A.P. Halestrap, and G.A. Rutter. 2001. Expression and distribution of lactate/monocarboxylate transporter isoforms in pancreatic islets and the exocrine pancreas. *Diabetes*. 50:361-366.

Zorrilla, E.P., K. Inoue, G.R. Valdez, A. Tabarin, and G.F. Koob. 2005. Leptin and post-prandial satiety: acute central leptin more potently reduces meal frequency than meal size in the rat. *Psychopharmacology*. 177:324-335.

