



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

Rol de GGRP y de la cetogénesis glial en el glucosensing hipotalámico



Tesis presentada a la Escuela de Graduados de la Universidad de Concepción como parte de los requisitos para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas, área Biología Celular y Molecular

MAGDIEL ANDRÉS SALGADO MENDOZA
CONCEPCIÓN-CHILE
2019

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

Profesor guía: Elena Amparo Uribe Pérez
Depto. de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Esta tesis fue realizada en el Departamento de Biología Celular, perteneciente a la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción.

Profesores integrantes Comisión Evaluadora:

Dra. María de los Ángeles García R.
Profesor guía de Tesis
Universidad de Concepción

Dra. E. Amparo Uribe P.
Profesor guía de tesis
Universidad de Concepción



Dr. J. Leonardo Guzmán G.
Profesor Evaluador Interno
Universidad de Concepción

Dr. Ariel Castro A.
Profesor Evaluador Interno
Universidad de Concepción

Dr. Xavier Figueroa F.
Profesor Evaluador externo
Pontificia Universidad Católica de Chile

Dr. Juan Pablo Henríquez H.
Director (s)
Programa Doctorado en Ciencias
Biológicas, área Biología Celular y
Molecular
Universidad de Concepción



Tesis de doctorado financiada por:

Proyecto FONDECYT # 1140677 (2014-2017)

Proyecto FONDECYT # 1180871 (2018-2019).

Beca CONYCYT para estudios de doctorado nacional (2014-2018)

Escuela de Graduados de la Universidad de Concepción (2016-2018).

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue sustentado gracias a los aportes de proyectos FONDECYT regular y beca para estudios de Doctorado nacional de CONICYT.

Mi gratitud completa es en primer lugar con Dios, quien me dió los medios físicos y emocionales para sobrellevar estos años de esfuerzo. En segundo lugar, muchas personas han contribuido a mi desarrollo científico. Gran parte de ese mérito lo tienen mis dos grandes mentoras, Dras. Uribe y Garcia, quienes además del rigor científico, me han enseñado el valor de la dedicación y el trabajo en equipo. Así mismo, agradezco enormemente a los profesores integrantes de mi comisión evaluadora, quienes me acompañaron en todo este proceso con asertivas críticas y consejos para mejorar la calidad del trabajo desarrollado. Muchas gracias por su tiempo y disposición. No puedo dejar de mencionar a mis amigos de laboratorio, con quienes he compartido día a día durante estos años de paso por el doctorado. Fito, Roberto, Claudio, Sergio, Anto, Coté, Pato y Alejandra, muchas gracias por la buena onda, el compañerismo y la disposición constante a cooperar en distintas etapas de mi tesis. Agradezco especialmente a don Jorge, quien además de toda la ayuda fundamental que presta en el funcionamiento del laboratorio, se ha convertido en un buen amigo acompañando las largas jornadas de trabajo.

La ciencia ofrece desafíos psicológicos importantes, en los que mi amada familia cumplió un rol fundamental, estando siempre presentes y pendientes de aportar a que este tiempo fuese mas llevadero. Un lugar muy especial en la concreción de esta etapa la cumplió mi novia, Macarena, quien me ha llenado de amor y energías para llegar a puerto con satisfacción. Muchas gracias a todos.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	I
INDICE DE FIGURAS	V
INDICE DE TABLAS.....	VII
ABREVIATURAS.....	VIII
RESUMEN	XIII
ABSTRACT	XV
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. Obesidad y homeóstasis energética en el organismo.....	1
2. Sensing de glucosa periférico	3
2.1. <i>Sensing</i> de glucosa pancreático	3
2.2. <i>Sensing</i> de glucosa en hígado.....	4
2.3. <i>Sensing</i> de glucosa cerebral.....	5
3. Vía de la melanocortina y control del comportamiento alimenticio.....	6
4. Glía hipotalámica y su rol en el comportamiento alimenticio.....	10
5. Aspectos relevantes del metabolismo de glucosa cerebral.....	13
6. Rol de GK-GKRP en el glucosensing hipotalámico.....	15
7. Rol de monocarboxilatos gliales en el glucosensing hipotalámico	16
8. Cuerpos cetónicos y sus efectos neuronales	19
8.1. Uso terapéutico de dietas cetogénicas	20
8.2. Rol de cuerpos cetónicos en el comportamiento alimenticio.	21
8.3. Producción glial de cuerpos cetónicos.....	21
8.4. HCA2 y vía de señalización inducida por β HB.....	24
II. Planteamiento del problema	26
HIPOTESIS	28
OBJETIVOS	28
I. OBJETIVO GENERAL.....	28
II. OBJETIVOS ESPECIFICOS	28
III. MATERIALES Y MÉTODOS	29
1. Animales de experimentación	29
2. Cultivos Celulares	29

2.1. Cultivo primario de tanicitos hipotalámicos	30
2.2. Cultivos primarios mixtos de neuronas hipotalámicas.	30
2.3. Cultivo de células de insulinoma de rata, línea 832/13	31
2.4. Cultivo de células HEK 293A y HEK293T	32
2.5. Cultivo de células GT1-7.....	32
3. Procesamiento histológico e inmunofluorescencia.....	33
3.1. Fijación por perfusión vascular.	33
3.2. Procesamiento criogénico y obtención de cortes por congelación.	33
3.3. Inmunofluorescencia en cortes de tejido.....	33
3.4. Inmunofluorescencia en células.....	34
4. Microscopía confocal y procesamiento de imágenes.....	35
5. Vectores de expresión utilizados.....	36
6. Cepas microbiológicas	36
7. Medios de cultivo microbiológico.....	37
8. Aislamiento de plásmidos.....	37
9. Extracción de ARN total	37
10. Transcripción reversa del ARN, síntesis de ADNc	38
11. Amplificación del ADNc por PCR	39
12. PCR cuantitativo.	39
13. Electroforesis en geles de agarosa	41
14. Generación de un adenovirus que silencie y sobreexpresé GKRP-Venus	41
14.1. Construcción del plásmido pDC311.3-shGKRP-EGFP	41
14.2. Construcción del plásmido pDC311.4-GKRP-Venus	42
14.3. Generación del adenovirus: co-transfección de células HEK293A	44
15. Utilización de los adenovirus <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	47
15.1. Transducción <i>in vitro</i>	47
15.2. Transducción <i>in vivo</i>	48
15.3. Estudios de comportamiento alimenticio.....	48
15.4. Expresión de neuropéptidos hipotalámicos en respuesta a glucosa icv.	49
16. Medición de glicemia en animales	50
17. Medición de la actividad GK.....	50
18. Electroforesis en geles de poliacrilamida	51

19. Inmunodetección de proteínas, <i>Western Blot</i>	51
19.1 Electrotransferencia de proteínas	51
19.2 Inmunodetección.....	52
20. Análisis de la dinámica de localización subcelular de GK en tanicitos a distintas condiciones glicémicas.	53
21. Análisis de la dinámica de localización subcelular de GK en 832-13 sobreexpresando GGRP a distintas condiciones glicémicas.....	53
22. Microscopia confocal y cuantificación de la inmunofluorescencia.....	54
23. Fraccionamiento subcelular núcleo-citoplasma.....	54
24. Interacción GK-GGRP en respuesta a glucosa	55
24.1. Proximity Ligation Assays (PLA).....	55
24.2. Co-inmunoprecipitación de proteínas	56
25. Determinación de ondas de calcio en rebanadas de hipotálamo	56
26. Medición de actividad de neuronas POMC mediante Current-clamp de célula completa	57
27. Determinación de la capacidad cetogénica en tanicitos.....	58
IV RESULTADOS.....	59
1. Estandarización del uso de los adenovirus generados.....	59
2. Modulación de la expresión de GGRP en ratas adultas	64
3. Perfil de expresión de neuropéptidos hipotalámicos en respuesta a glucosa	68
4. Cambios en el comportamiento alimenticio en animales con pérdida y ganancia de función de GGRP.	72
5. Rol de GGRP sobre la traslocación nucleocitoplasmática de GK, estudios <i>in vitro</i>	80
6. Evaluación de la interacción de GK y GGRP en tanicitos.....	91
7. Respuesta neuronal a metabolitos gliales.	98
7.1. Tipos de respuesta neuronal a glucosa en el HVM	98
7.2. Uso de ratones POMC-EGFP como modelo de estudio	100
7.3. Respuesta de neuronas POMC de ratón a glucosa y lactato	102
8. Metabolismo y señalización de cuerpos cetónicos a nivel hipotalámico	106
8.1. Producción de β HB en tejidos controles	109
8.2. Dependencia de AMPK, MCTs y GGRP en la producción de β HB en tanicitos.....	109

8.3. Efecto de β HB sobre la actividad de neuronas POMC	113
8.4. β HB antagoniza los efectos producidos por lactato sobre la expresión de neuropéptidos hipotalámicos.	115
8.5. Comportamiento alimenticio en ratas inyectadas icv con β HB.	118
9. Inmunolocalización de HCA2 en hipotálamo de rata y ratón.....	124
V. DISCUSIÓN	128
Capítulo 1: Participación de GGRP en el glucosensing hipotalámico.....	128
1.1. Rol de GGRP en la traslocación de GK dependiente de glucosa	128
1.2. Función de GGRP en el comportamiento alimenticio de animales	133
Capítulo 2: Comunicación metabólica entre tanicitos y neuronas POMC	136
2.1. Roles opuestos de lactato y β HB sobre la actividad de neuronas que regulan el comportamiento alimenticio.	136
2.2. Cetogénesis en tanicitos.....	139
2.3. Efectos de β HB icv sobre el comportamiento alimenticio	142
VI. CONCLUSIONES GENERALES	147
VII. REFERENCIAS.....	148



INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Regulación hormonal de la vía de la melanocortina hipotalámica.....	8
Figura 2: Representación esquemática de la reorganización de la barrera sangre/hipotálamo inducida en hipoglicemia.....	12
Figura 3: Modelo propuesto del rol de AMPK sobre la producción de cuerpos cetónicos en astrocitos durante ayuno o hipoxia.....	23
Figura 4: Diagrama de pasos necesarios para la generación de un adenovirus que silencie y sobreexpresa GGRP.....	45
Figura 5: Estandarización del tiempo óptimo de transducción adenoviral.....	60
Figura 6: Efecto funcional de los virus generados.....	61
Figura 7: Efecto de la inhibición y sobreexpresión de GGRP sobre la expresión de los mensajeros de GGRP, GK, GLUT2 y α 2AMPK en tanicitos.....	65
Figura 8: Los adenovirus generados inhiben o sobreexpresan eficientemente GGRP en tanicitos, afectando la expresión de otras proteínas involucradas en el glucosensing.....	66
Figura 9: Ambos adenovirus transducen solo la pared ventricular, generando el efecto esperado en el hipotálamo basal.....	67
Figura 10: Efecto sobre la expresión de GK y GGRP del protocolo usado para evaluar neuropéptidos en respuesta a glucosa.....	69
Figura 11: Perfil de expresión de neuropéptidos, en respuesta a glucosa en ratas con pérdida y ganancia de función de GGRP.....	71
Figura 12: Rol de GGRP en la macroestructura de la alimentación en ratas.....	73
Figura 13: Perfil de alimentación en ratas con distintos niveles de GGRP.....	77
Figura 14: Microestructura de la alimentación en ratas KD y que sobreexpresan GGRP.....	78
Figura 15: Aumento de localización nuclear de GK en tanicitos en respuesta a glucosa.....	82
Figura 16: Disminución en la localización nuclear de GK en tanicitos que sobreexpresan GGRP en respuesta a glucosa.....	83
Figura 17: Inhibición de la traslocación núcleo-citoplasma de GK en ausencia de GGRP.....	85
Figura 18: Traslocación nucleocitoplasma de GK pancreática en células que sobreexpresan GGRP en respuesta a glucosa.....	88
Figura 19: GK y GGRP se translocan desde el núcleo hasta el citoplasma en respuesta a incrementos de glucosa.....	89

Figura 20. Cinética de traslocación de GK en respuesta a glucosa en células 832-13 que sobreexpresan GKRP	92
Figura 21: Expresión relativa de <i>Gckr</i> y <i>Gck</i> en distintos tejidos glucosensores... 93	93
Figura 22: Interacción endógena de GK-GKRP en tanicitos en respuesta a glucosa	96
Figura 23: Co-inmunoprecipitación de GK y GKRP en fracciones subcelulares de tanicitos incubados a distintas concentraciones de glucosa.....	97
Figura 24: Tipos de neuronas hipotalámicas en relación con su respuesta a glucosa.....	99
Figura 25: Localización de neuronas POMC-EGFP en ratón y su comportamiento eléctrico.....	101
Figura 26: Aumento de actividad de neuronas POMC en respuesta a glucosa y lactato.....	104
Figura 27: Respuesta de neuronas POMC a glucosa depende de la actividad de los transportadores de monocarboxilato.....	105
Figura 28: Expresión de proteínas relevantes para el metabolismo y señalización de cuerpos cetónicos en el hipotálamo de ratas	107
Figura 29: Efecto de la concentración de glucosa sobre la liberación de β HB y la activación de la AMPK en tanicitos. A. Protocolo experimental realizado para medir la liberación de β HB	111
Figura 30: Liberación de β HB en cultivo primario de tanicitos.....	112
Figura 31: β HB reduce la actividad de neuronas POMC de ratón.....	114
Figura 32: Lactato y β HB cumplen un rol antagónico sobre la expresión de neuropéptidos en cultivo primario de neuronas hipotalámicas	117
Figura 33: Comportamiento alimenticio de ratas inyectadas con β HB	121
Figura 34: Cambios en el comportamiento alimenticio de ratas inyectadas con β HB durante 1 día post inyección.....	122
Figura 35: Efectos de β HB icv sobre la avidez alimenticia de ratas	123
Figura 36: Inmunolocalización de HCA2 en hipotálamo basal de ratas	126
Figura 37: Inmunolocalización de HCA2 en hipotálamo de ratones POMC-EGFP.	127
Figura 38: Modelo propuesto de interacción GK-GKRP en presencia de glucosa en tanicitos.	134
Figura 39: Modelo propuesto de interacción metabólica entre tanicitos y neuronas del ARC en situación de ayuno y post prandial	146

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Afinidad (K_m) de los principales miembros de la familia de MCTs sobre monocarboxilatos de relevancia fisiológica (Tomado de (Halestrap 2013)	19
Tabla 2: Anticuerpos primarios utilizados	35
Tabla 3: Anticuerpos secundarios utilizados	35
Tabla 4: Partidores utilizados para RT-PCR, qPCR, clonamiento de shGKRP y GKRP-Venus en pDC311.3.....	40
Tabla 5: Principales parámetros alimenticios de ratas inyectadas con los adenovirus Adsh β gal (SHB), AdshGKRP (SHG) y AdGKRP (OEG).	79



ABREVIATURAS

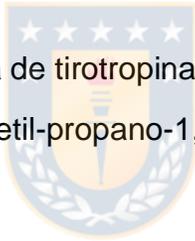
AcAc	: Acetoacetato
ACC	: enzima acetil-coA carboxilasa
ADN	: ácido desoxirribonucleico
ADNase	: enzima desoxirribonucleasa
ADNc	: ácido desoxirribonucleico copia
ADP	: adenosin difosfato
AdGKRP	: adenovirus que sobreexpresa GKRP
Adshβgal	: adenovirus que codifica un ARN horquilla contra β galactosidasa
AgRP	: péptido relacionado a agoutí
AHL	: área hipotalámica lateral
AMP	: adenosin monofosfato
AMPK	: quinasa dependiente de AMP
ARC	: Núcleo arqueado hipotalámico
ARNm	: ácido ribonucleico mensajero
as	: antisentido
Asn	: asparragina
ATP	: adenosin trifosfato
BiP	: bifosfato
BSA	: albúmina de suero bovino
CART	: transcrito regulado por cocaína y anfetamina
Ca²⁺_v	: canal de calcio sensible a voltaje
CCK	: colecistoquinina
CpC	: Compuesto C
Cpt1	: carnitina palmitoil transferasa 1
cy²	: cianina 2
cy³	: cianina 3

cy⁵	: cianina 5
DMEM	: medio mínimo de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	: dimetil sulfóxido
dNTPs	: desoxirribonucleótidos
DREADD	: Receptores diseñados y activados exclusivamente por drogas diseñadas
DTT	: ditioneitol
EC	: Código de enzimas
EDTA	: ácido etilendiaminotetracético
EGFP	: proteína fluorescente verde mejorada
EM	: eminencia media
F1P	: fructosa-1-fosfato
F6P	: fructosa-6-fosfato
FADH₂	: flavina adenina dinucleótido reducido
FGF21	: Factor de crecimiento de fibroblastos 21
FK	: fructoquinasa
FPA	: Frecuencia de potenciales de acción
G6P	: glucosa-6-fosfato
GE	: neurona excitada por glucosa
GFAP	: proteína ácida fibrilar glial
GI	: neurona inhibida por glucosa
GK	: glucoquinasa
GKRP	: Proteína reguladora de GK
GLP-1	: péptido tipo glucagón-1
GLUT1	: transportador de glucosa 1
GLUT2	: transportador de glucosa 2
H₂SO₄	: ácido sulfúrico
HCA2	: Receptor de ácidos hidroxicarboxílicos 2
HCl	: ácido clorhídrico

HKD	: hexoquinasa D
HL	: hipotálamo lateral
HMGCS2	: hidroximetilglutaril-coA sintasa 2
HRP	: peroxidasa de rábano picante
HVM	: hipotálamo ventromedial
IC₅₀	: concentración media inhibitoria
ifu/mL	: unidades infectivas por mililitro
IIIV	: tercer ventrículo
K_{cat}	: constante catalítica
KCl	: cloruro de potasio
kb	: kilobase
kDa	: kilodalton
KH₂PO₄	: dihidrógeno fosfato de potasio
K⁺_{ATP}	: Canal de potasio sensible a ATP
K_d	: constante de disociación
K_i	: constante de inhibición
K_m	: constante de Michaelis
Lac	: lactosa
LB	: medio de cultivo Luria Bertani
LCR	: líquido cefalorraquídeo
LDH	: enzima láctico deshidrogenasa
Leu	: leucina
MCT	: transportador de monocarboxilato
MEM	: medio mínimo esencial de Eagle
Met	: metionina
MgCl₂	: cloruro de magnesio
MgSO₄	: sulfato de magnesio
MODY	: diabetes de inicio en la madurez juvenil

Na₂HPO₄	: hidrógeno fosfato de sodio
NaCl	: cloruro de sodio
NADH	: nicotinamida dinucleótido reducido
NADPH	; nicotinamida dinucleótido fosfato reducido
N/C	: relación núcleo / citoplasma
NE	: neuronas excitadas por glucosa
NI	: neuronas inhibidas por glucosa
NLS	: Secuencia de localización nuclear
NPV	: núcleo para ventricular
NPY	: neuropéptido Y
NTS	: núcleo del tracto solitario
NVM	: núcleo ventromedial
OEG	: adenovirus que sobreexpresa GGRP-venus
OMS	: Organización Mundial de la Salud
OXM	: Oxintomodulina
PAGE	: electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	: tampón fosfato salino
PCR	: reacción en cadena de la polimerasa
PDH	: complejo piruvato deshidrogenasa
PFA	: paraformaldehído
PLA	: Ensayos de ligación en proximidad
PMSF	: fluoruro de fenilmetilsulfonilo
POMC	: derivado de la pro-opiomelanocortina
pUb	: promotor de ubiquitina humano
PYY	: Péptido YY
qRT-PCR	: retrotranscripción y PCR cuantitativo
ROI	: región de interés
RT	: retrotranscripción

SDS	: dodecilsulfato de sodio
SFB	: suero bovino fetal
shARN	: ácido ribonucleico de horquilla corta
SHB	: adenovirus de silencia b-galactosidasa bacteriana
SHG	: adenovirus de silencia GKRP de tanicitos
SMC	: sitio de múltiple clonamiento
sn	: sentido
SNC	: sistema nervioso central
SV40-polyA	: señal de poliadenilación del virus SV40.
TAE	: tampón tris acetato EDTA
TBS	: tampón tris salino
TEMED	: N,N,N',N'-Tetrametiletilenediamina
TL	: <i>tween</i> leche
TRH	: Hormona liberadora de tirotropina
Tris	: 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
UV-VIS	: ultravioleta-visible
Val	: valina
VL	: ventrículo lateral
V_{máx}	: velocidad máxima



RESUMEN

El hipotálamo es una región cerebral que tiene como una de sus principales funciones mantener la homeostasis energética. En él, se han identificado núcleos neuronales donde se concentran poblaciones neuronales comprometidas en esta función, tal como el núcleo arqueado (ARC). El ARC se ubica próximo al tercer ventrículo (3V), cuyas paredes basales están revestidas por células tipo glia radial, los tanicitos. A través de sus procesos, estas células contactan a la eminencia media, región libre de barrera hematoencefálica, por lo que se encuentran en una posición privilegiada para detectar hormonas o nutrientes como la glucosa. Previamente, hemos demostrado que los tanicitos responden a glucosa con incrementos de calcio intracelular, liberación de lactato y ATP, lo que puede ser revertido usando inhibidores de la enzima glucoquinasa (GK). Bajo este paradigma, en esta tesis nos propusimos en primer lugar evaluar la modulación de la actividad y localización subcelular de GK en tanicitos gracias a la manipulación del nivel de expresión de GKRP, el único inhibidor endógeno de GK. Los resultados demostraron que la sobreexpresión de GKRP en tanicitos lleva a una inhibición de la actividad de GK y a su secuestro nuclear en baja glucosa. En ratas que sobreexpresan GKRP en tanicitos se altera la expresión de neuropéptidos hipotalámicos en respuesta a glucosa y aumenta la avidez alimenticia en ratas ayunadas. Por otro lado, el silenciamiento de GKRP promueve una localización citoplasmática de GK, la cual se asoció a una caída altamente significativa en la ingesta alimenticia y peso corporal, relacionadas a un aumento de la saciedad. Estos resultados están de acuerdo con un mecanismo indirecto de regulación de

la ingesta, donde la glía toma glucosa y libera lactato a las neuronas del ARC. En este contexto, nos preguntamos si neuronas POMC, inductoras de saciedad, responden a lactato, por lo que utilizamos ratones transgénicos POMC-EGFP y evaluamos mediante electrofisiología la actividad neuronal en respuesta a glucosa y lactato. Los resultados mostraron que neuronas POMC responden más rápidamente y con mayor potencia a lactato que a glucosa, y que la respuesta a glucosa es dependiente de la actividad de los transportadores de monocarboxilato, reforzando el rol de los tanicitos en este proceso. De manera interesante, hemos demostrado mediante RT-qPCR y electrofisiología que β HB, otro monocarboxilato y principal producto de la cetogénesis hepática, es capaz de inhibir a neuronas POMC. Adicionalmente, demostramos por primera vez que los tanicitos son capaces de producir cuerpos cetónicos *in vitro* como consecuencia de una privación energética, producción que es potenciada por AMPK y cuya liberación depende de transportadores de monocarboxilato (MCTs). En este escenario, hemos postulado que los tanicitos pueden liberar β HB como una señal paracrina en el hipotálamo mediobasal y modular de esta manera el comportamiento alimenticio luego de un ayuno. Para poner a prueba esta hipótesis hemos evaluado el efecto de β HB icv sobre el comportamiento alimenticio de ratas adultas. Los resultados muestran un aumento significativo en la ingesta alimenticia durante las primeras 6 h de registro mientras que este parámetro fue menor luego de 24 h. En resumen, nuestros resultados indican que los tanicitos son capaces de producir lactato y β HB, los cuales poseen efectos opuestos sobre la actividad de neuronas “sensibles a glucosa”, modulando recíprocamente el comportamiento alimenticio en ratas.

ABSTRACT

The hypothalamus is a brain region that has as one of its main functions to maintain a proper energy homeostasis. In it, neuronal nuclei have been identified where neuronal populations involved in this function are concentrated, such as the arcuate nucleus (ARC). The ARC is located near the third ventricle (3V), whose basal walls are lined by radial glia-like cells, the tanycytes. Through their processes, these cells contact the median eminence, a blood-brain barrier-free region, so they are in a privileged position to detect hormones or nutrients such as glucose. Previously, we have shown that tanycytes respond to glucose with increases in intracellular calcium, lactate and ATP release, which can be reversed using glucokinase (GK) enzyme inhibitors. Under this paradigm, in this thesis we set out first to evaluate the modulation of the activity and subcellular localization of GK in tanycytes thanks to the manipulation of GKRP expression level, the only endogenous GK inhibitor. The results showed that overexpression of GKRP in tanycytes leads to an inhibition of GK activity and its nuclear sequestration in low glucose. In rats that overexpress GKRP in tanycytes, the expression of hypothalamic neuropeptides in response to glucose was altered and food avidity increased in fasted rats. On the other hand, the silencing of GKRP promoted a cytoplasmic location of GK, which was associated with a highly significant drop in food intake and body weight, related to an increase in satiety. These results support an indirect mechanism of food intake regulation, where the glia takes glucose and releases lactate to the ARC neurons. In this context, we wonder if POMC neurons, inducing satiety, respond to lactate, so we use POMC-EGFP

transgenic mice and electrophysiologically evaluate the activity of these cells in response to glucose and lactate. The results showed that POMC neurons respond more rapidly and more strongly to lactate than to glucose, and that the glucose response is dependent on the activity of monocarboxylate transporters, reinforcing the role of tanycytes in this process. Along with this, we have demonstrated by RT-qPCR and electrophysiology that β -hydroxybutyrate (β HB), another monocarboxylate and main product of hepatic ketogenesis, is capable of inhibiting POMC neurons. Additionally, we demonstrate for the first time that tanycytes can produce ketone bodies *in vitro* as a result of energy deprivation, production that is enhanced by AMPK and whose release depends on monocarboxylate transporters (MCTs). In this scenario, we have postulated that tanycytes can release β HB as a paracrine signal in the mediobasal hypothalamus and thus modulate eating behavior after a fast. To test this hypothesis, we have evaluated the effect of β HB icv on the feeding behavior of adult rats. The results show a significant increase in food intake during the first 6 h of registration while this parameter was lower after 24 h. In summary, our results indicate that tanycytes can produce lactate and β HB, which have opposite effects on the activity of "glucose-sensitive" neurons, reciprocally modulating feeding behavior in rats.

I. INTRODUCCIÓN

1. Obesidad y homeóstasis energética en el organismo

El peso corporal y el contenido de grasa del organismo suelen ser bastante estables a lo largo del tiempo debido a un proceso biológico denominado "homeostasis energética", el cual se encarga de coordinar la ingesta con el gasto de energía durante largos períodos de tiempo. El sistema de homeostasis energética comprende neuronas en el hipotálamo mediobasal, complejo dorsal vagal y otras áreas del cerebro que forman parte de un neurocircuito que regula la ingesta de alimentos en respuesta a señales hormonales y metabólicas (Marty *et al.* 2007; Mobbs *et al.* 2013). Sin embargo, la robusta eficiencia con la que funciona el sistema de homeostasis energética, en humanos con peso normal y modelos animales, parece estar en desacuerdo con la alta prevalencia de sobrepeso y obesidad en las sociedades occidentales (Morton *et al.* 2014).

La obesidad es definida como un estado de incremento del peso corporal, producto de un aumento del tejido adiposo y en magnitudes suficientes para provocar efectos adversos en la salud (Spiegelman & Flier 2001). Una persona obesa es el resultado de la ingesta de más calorías de las que quema y se caracteriza por un índice de masa corporal igual o superior a treinta. Según cifras de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en 2016 el 39% de la población adulta en el mundo padece sobrepeso mientras que un 13% son obesos. Además, se ha informado que, incluso en algunos países orientales, la obesidad sobrepasa el 25% (Ogden *et al.* 2006). En Chile, el ministerio de salud informó en el último sondeo del año 2017

que la prevalencia de sobrepeso es idéntica a las cifras a nivel mundial, sin embargo, alarma un 31% de adultos obesos.

La glucosa es por lejos el principal combustible del organismo, existiendo mecanismos que permiten que la concentración de este azúcar se regule finamente. Entender cómo funcionan y se regulan dichos mecanismos permitirá el desarrollo de terapias efectivas para disminuir la prevalencia de la obesidad y de las patologías asociadas. Entre los estímulos no fisiológicos que afectan la ingesta alimenticia, se encuentran factores psicológicos como el estrés y económicos como la conveniencia y el costo de los alimentos, entre otros (Woods 2009). Se ha demostrado además un fuerte control hedónico de la alimentación, donde el consumo de una dieta rica en azúcar induce una rápida liberación de dopamina en el núcleo accumbens (Rada *et al.* 2005). Esto se suma al hecho que ratones deficientes en dopamina cursan con hipoactividad e hipofagia (Szczyпка *et al.* 1999). Por otro lado, los principales estímulos fisiológicos que participan en el proceso de control del peso corporal son las hormonas sintetizadas en tejidos relacionados con la nutrición, tales como las derivadas del intestino delgado (colecistoquinina (CCK) y péptido tipo glucagón 1 (GLP-1)), de los adipocitos (leptina), del estómago (grelina) y del páncreas endocrino (insulina y glucagón).

Cada una de estas señales son capaces de favorecer o inhibir la ingesta alimenticia y estimular vías catabólicas o anabólicas de los nutrientes (Bady *et al.* 2006). En modelos animales se ha demostrado también que la concentración plasmática de glucosa per se, es capaz de modular el gasto energético (Bady *et al.* 2006; Schwartz *et al.* 2000). El papel de la glucosa en la regulación de la ingesta

alimenticia fue sugerido por primera vez en la década de los 50, proponiéndose que la concentración sanguínea de este nutriente es responsable de regular el apetito, inhibiendo o estimulando centros localizados en el sistema nervioso central (SNC), conocida como la hipótesis glucostática (Mayer 1955).

2. Sensing de glucosa periférico

En literatura, se ha acuñado el concepto de *sensing* para referirse al proceso de detección de cambios en la concentración circulante de una determinada molécula y la posterior respuesta ante estos cambios. Glucosensores, por tanto, son todos aquellos tipos celulares capaces de detectar y posteriormente responder frente a variaciones en la concentración circulante de glucosa y la generación de una respuesta que permita restablecer su correcto equilibrio.

2.1. Sensing de glucosa pancreático

El primer y principal modelo descrito de un sistema sensor de glucosa fue la célula β -pancreática, la cual puede detectar un aumento sanguíneo de la concentración de glucosa y responder en segundos liberando insulina a la sangre (Grodsky *et al.* 1967). El mecanismo mediante el cual este tipo celular realiza este proceso involucra el transportador facilitativo de glucosa de baja afinidad GLUT2 y la enzima también de baja afinidad glucoquinasa (GK), ambas actuando coordinadamente primero para incorporar glucosa a la célula y luego para fosforilarla (Thorens *et al.* 1988). La alta actividad anaplerótica de la enzima piruvato carboxilasa en este tejido (Schuit *et al.* 1997) facilita la incorporación de los subproductos catabólicos de glucosa al ciclo de Krebs mitocondrial y por ende a

una elevada producción de equivalentes reductores (NADH y FADH₂) que conducen a la producción de una gran cantidad de ATP (Schuit *et al.* 2001). Como consecuencia de esta alza en la concentración de ATP intracelular, se llevan a cabo una serie de cambios sucesivos en el transporte a través de la membrana: cierre de canales de potasio sensibles a ATP (K⁺_{ATP}) (Boschero *et al.* 1988), depolarización de la membrana y como consecuencia de esto, apertura de los canales de calcio sensibles a voltaje (Ca²⁺_v) (Grapengiesser *et al.* 1989). El incremento en la concentración intracelular del ion calcio provoca finalmente la exocitosis de las reservas vesiculares de insulina (Hiriart & Aguilar-Bryan 2008). Además, se conoce que el péptido tipo glucagón, GLP-1, potencia la liberación de insulina inducida por glucosa en las células β-pancreáticas, por lo que se ha catalogado como una hormona insulino-trópica (Kreymann *et al.* 1987).

2.2. Sensing de glucosa en hígado

Entre las principales funciones del hígado destaca su rol en la mantención de los niveles de glucosa en la sangre en rangos apropiados, proceso dependiente de la captación de glucosa desde la circulación portal y de la concentración de glucagón e insulina. El hígado, a diferencia de otros tejidos, tiene la capacidad de desarrollar gluconeogénesis, proceso por el cual se produce glucosa a partir de compuestos sencillos como lactato, piruvato, glicerol y alanina. El metabolismo de la glucosa está implicado en diversas rutas metabólicas, tales como la síntesis y degradación de glucógeno (glucogenogénesis y glucogenólisis, respectivamente), y la ruta de las pentosas fosfato, en la cual se sintetizan pentosas útiles para la generación de nucleótidos y se genera poder reductor en forma de NADPH. Además, el hígado

como todos los tejidos realiza glicólisis, vía metabólica encargada de oxidar la glucosa y así obtener energía para la célula.

Al aumentar los niveles de glucosa en la sangre, la insulina potencia su almacenamiento en el hígado a la forma de glucógeno, por lo que la glicemia disminuye. En contraste, cuando los niveles de glucosa disminuyen, decae la actividad glicolítica y se produce un aumento en la liberación de glucosa hacia la sangre por la acción glucogenolítica y gluconeogénica del glucagón, llevando la glicemia a sus valores normales de ~5 mM. Todo lo anterior ha llevado a catalogar al hígado como un órgano “amortiguador de la glicemia”. Es importante destacar que esta función es posible por la presencia de la enzima glucosa-6-fosfatasa, cuya expresión está restringida a hígado y riñón (van Schaftingen & Gerin 2002), y que les permite a estos tejidos exportar glucosa defosforilada desde las células mediante GLUT2 (Thorens *et al.* 1988). Por otro lado, en el hígado destaca un mecanismo regulatorio independiente de hormonas y que es ejercido por la proteína reguladora de la GK, GKRP, la cual secuestra a GK en el núcleo del hepatocito cuando la actividad de la enzima no es requerida. Dado que GK es la puerta de entrada para las reacciones involucradas tanto en la oxidación de glucosa, síntesis de glucógeno y vía de las pentosas en este tejido, este secuestro nuclear sería clave para regular el flujo metabólico por las distintas rutas comprometidas.

2.3. Sensing de glucosa cerebral

Tempranamente se demostró que el cerebro estaba involucrado en el control del comportamiento alimenticio, observando que lesiones en el hipotálamo de perros

inducían hiperfagia (Bernard 1849). Luego, en 1953, Jean Meyer propuso que células especializadas de este tejido son capaces de sensor variaciones plasmáticas de glucosa y postuló que estas células traducen las variaciones detectadas en la glicemia en señales eléctricas o químicas que controlan el comportamiento alimenticio (Mayer 1955). Más tarde, dos grupos en paralelo identificaron mediante análisis electrofisiológicos en rebanadas de hipotálamo a neuronas capaces de modular su actividad en respuesta a cambios en los niveles de glucosa extracelular (Anand *et al.* 1964; Oomura & Yoshimatsu 1984). Las neuronas que aumentan su actividad con elevaciones de las concentraciones de glucosa extracelular fueron denominadas neuronas GE (*glucose-excited*) mientras que las que son activadas producto de una disminución en la concentración extracelular de glucosa (o por glucoprivación) fueron denominadas neuronas GI (*glucose-inhibited*) (Yang *et al.* 1999). Ambos tipos de neuronas son ampliamente distribuidas en el cerebro, pero especialmente representadas en algunos núcleos hipotalámicos y tronco cerebral. En el hipotálamo, las neuronas GE se encuentran principalmente en el hipotálamo ventromedial (HVM), formado por el núcleo arqueado (ARC) y el núcleo ventromedial (NVM) (Wang *et al.* 2004), mientras que las neuronas GI están principalmente localizadas en el hipotálamo lateral (HL), ARC medio y NPV.

3. Vía de la melanocortina y control del comportamiento alimenticio.

Nuestro entendimiento de los neurocircuitos que controlan la homeostasis energética ha aumentado rápidamente en los últimos años. Entre las subpoblaciones neuronales mejor estudiadas y comprendidas se encuentra la que

co-expresa neuropéptido Y (NPY), el péptido relacionado a agouti (AgRP) y GABA, referidas comúnmente como neuronas AgRP. Las neuronas AgRP se localizan en el ARC y son capaces de estimular la ingesta alimenticia cuando son activadas (Hagan *et al.* 2000). A su vez, está ampliamente demostrado que ellas son inhibidas por hormonas post-prandiales tales como leptina e insulina (Cowley *et al.* 2001; Spanswick *et al.* 2000), mientras que son activadas por grelina (Cowley *et al.* 2003), la cual es secretada tras periodos de ayuno (**Fig. 1**). Como sustento a estas evidencias, se ha reportado que en ratones deficientes de leptina (*ob/ob*), las neuronas AgRP se encuentran fuertemente activadas, lo que se encuentra funcionalmente ligado a la pronunciada hiperfagia que presentan estos animales (Hahn *et al.* 1998; Schwartz *et al.* 1996).

Adyacentes a las células AgRP se encuentran las neuronas que expresan pro-opiomelanocortina (POMC) y liberan la hormona estimulante de α -melanocito (α -MSH), la cual posee la función de inhibir la ingesta alimenticia al activar receptores de melanocortina neuronales. De manera opuesta a neuronas AgRP, las neuronas POMC son activadas por leptina (Cowley *et al.* 2001; Schwartz *et al.* 1997) y un *subset* de ellas son además sensibles a insulina (Williams *et al.* 2010). A pesar de estas diferencias, leptina e insulina son capaces de activar vías de señalización y cascadas transcripcionales redundantes en neuronas POMC (Hill 2010). Una población mayoritaria de estas neuronas es activada por aferencias serotoninérgicas ascendentes o por neuronas glutamatérgicas ubicadas en el núcleo hipotalámico ventromedial (NVM), mientras que se reconoce que prácticamente todas estas neuronas reciben input GABAérgicos inhibitorios desde neuronas AgRP.

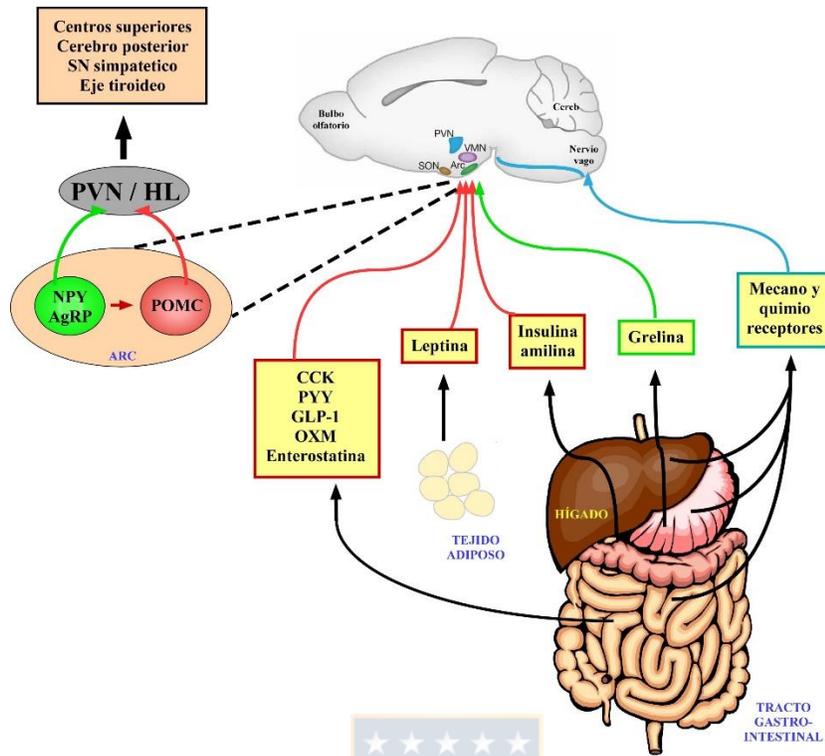


Figura 1: Regulación hormonal de la vía de la melanocortina hipotalámica.

Tras una comida, a nivel intestinal se libera CCK, PYY, GLP-1, OXM y enterostatina. Desde el tejido adiposo se produce leptina, mientras que el páncreas libera insulina y amilina. Todas estas hormonas post-prandiales son capaces de activar las neuronas POMC en el ARC, mientras que algunas de ellas además inhiben las neuronas AgRP/NPY. Por contraparte, luego de un periodo de ayuno el estómago produce la hormona grelina, la cual activa en forma potente la actividad de neuronas AgRP. La regulación recíproca de estas poblaciones neuronales modulará a su vez la actividad eefectora de neuronas localizadas en núcleos superiores (PVN o HL) encargados de la generación de hambre o saciedad.

Se ha informado que la delección del transportador vesicular de GABA en neuronas AgRP resulta en un ratón con un fenotipo magro, resistente al desarrollo de obesidad inducida por dieta (Tong *et al.* 2008). Es necesario mencionar que, además de la inhibición sobre las neuronas POMC, se ha demostrado que las proyecciones gabaérgicas de las neuronas AgRP inhiben tónicamente un *subset* de neuronas del núcleo parabraquial (PBN), las cuales al activarse gatillan una anorexia profunda (Wu *et al.* 2009).

Elegantes estudios utilizando tecnologías farmacogenéticas DREADD (*Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs*), han mostrado que la activación selectiva de neuronas AgRP es suficiente para estimular la alimentación en forma rápida y potente (Krashes *et al.* 2011). Optogenéticamente, la activación de sólo 800 neuronas AgRP evocó una alimentación voraz de ratones AgRP-ChR2 en tan sólo 6 min post estimulación, respuesta que fue proporcional a la duración y frecuencia del estímulo (Aponte *et al.* 2011). Respecto a neuronas POMC, como se esperaba su estimulación e inhibición, usando optogenética y DREADDs, reduce e incrementa respectivamente la ingesta alimenticia en animales, sin embargo, estos efectos no ocurren rápidamente, sino que se hacen evidentes luego de al menos 24 h (Aponte *et al.* 2011; Atasoy *et al.* 2012), indicando que la activación de estas neuronas posee un rol regulatorio en periodos más largos que los ejercidos por las neuronas inductoras de hambre (AgRP). Se ha propuesto que, gracias a la cercanía con el tercer ventrículo (3V), estas neuronas “glucosensoras” son capaces de responder de manera directa a los cambios de concentración de glucosa del líquido cefalorraquídeo (LCR), sin embargo, un análisis detallado de la arquitectura

hipotalámica muestra que las paredes del 3V están formadas por tanicitos, células endimarias altamente interdigitadas lateralmente (Rodriguez *et al.* 2005) y apicalmente unidas por uniones adherentes (Rodriguez *et al.* 1979), lo que dificulta el tránsito de metabolitos desde el LCR hacia el parénquima hipotalámico. Además, mediante estudios de microdiálisis se ha establecido que luego de una comida, la concentración de glucosa parenquimal aumenta muy discretamente, alcanzando un valor máximo de 1.6 mM y haciendo poco factible un mecanismo de *sensing* neuronal directo (de Vries *et al.* 2003).

4. Glía hipotalámica y su rol en el comportamiento alimenticio

Los tanicitos son células endimogliales especializadas, no ciliadas, que limitan el piso del 3V en la región tuberal del hipotálamo a nivel del ARC (Prevot *et al.* 2018). Aunque los tanicitos comparten varias características con astrocitos, ellos presentan una morfología única, lo que se asocia con propiedades funcionales particulares (Clasadonte & Prevot 2018). Los tanicitos son células polarizadas, con cuerpos celulares ubicados en la pared del 3V y procesos altamente elongados que se extienden en el parénquima hipotalámico, muchos de ellos alcanzando la superficie pial del cerebro (Elizondo-Vega *et al.* 2015). Debido a esta morfología peculiar, a la expresión de marcadores asociados a precursores neurales (Haan *et al.* 2013; Ma *et al.* 2015; Robins *et al.* 2013), a la capacidad de formar neuroesferas (Robins *et al.* 2013) y a experimentos basados en recombinación cre/lox, se ha demostrado la capacidad autorrenovativa de los tanicitos y su diferenciación a otros tipos celulares, incluyendo neuronas maduras y funcionales, las cuales pueden responder a señales periféricas (Bless *et al.* 2016).

Los tanicitos han sido clasificados en 4 subtipos, $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ y $\beta 2$, basado principalmente en su ubicación dorsoventral, lo que además coincide con diferencias en la extensión del proceso basal en el hipotálamo y en criterios histoquímicos (Akmayev *et al.* 1973). Sin embargo, en base al actual conocimiento de la fisiología de los tanicitos y a la diversidad estructural (Placzek & Briscoe 2005) y genética (Campbell *et al.* 2017; Chen *et al.* 2017) encontrada, se ha sugerido que esta antigua clasificación debiese ser revisada y actualizada.

La eminencia media (EM), es un órgano circunventricular adyacente al ARC, donde los tanicitos contactan un plexo capilar cuyas células endoteliales poseen fenestraciones y por tanto son altamente permeables, permitiendo la extravasación de moléculas plasmáticas hacia el LCR (Mullier *et al.* 2010). De manera interesante, los tanicitos $\beta 2$ generan una barrera celular, estando lateralmente unidos mediante uniones ocluyentes, las que generan un cierre continuo alrededor del cuerpo celular (Langlet *et al.* 2013). Además, los tanicitos $\beta 2$ cumplen un rol fundamental en la regulación de múltiples funciones hipotalámicas, incluyendo reproducción y metabolismo. Ellos controlan dinámicamente la secreción de neuropéptidos en la circulación portal hipotálamo-pituitaria, generan la forma activa de la hormona tiroidea y regulan la homeostasis local, controlando el intercambio de moléculas tales como leptina entre la sangre y el LCR (Prevot 2002). De manera interesante, se ha demostrado que la disminución en la concentración plasmática de glucosa inducida por ayuno altera la organización estructural de esta barrera sangre/hipotálamo (**Fig. 2**), resultando en una potenciación del acceso de sustratos metabólicos al ARC (Langlet *et al.* 2013).

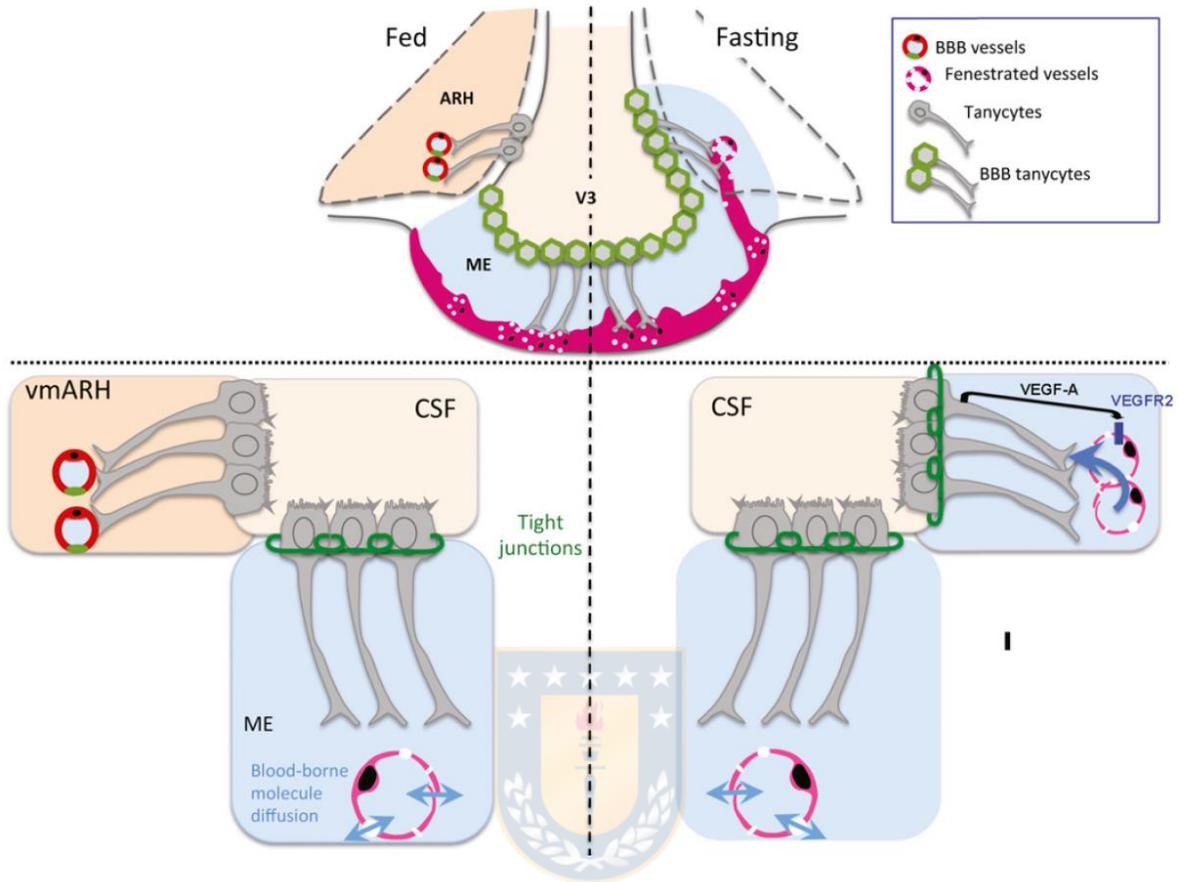


Figura 2: Representación esquemática de la reorganización de la barrera sangre/hipotálamo inducida en hipoglicemia. En animales alimentados, los tancitos del ARC contactan vasos sanguíneos con barrera, mientras que luego de un periodo de ayuno, la expresión de VEGF por los tancitos induce la fenestración del endotelio vascular, favoreciendo un acceso expedito de moléculas plasmáticas desde la sangre al ARC. Tomado de (Prevot *et al.* 2018).

En este contexto, es de gran interés conocer la capacidad de los tanicitos de responder a cambios en la concentración de glucosa plasmática, modulando la liberación de neuropéptidos del ARC y alterando el comportamiento alimenticio de animales de experimentación. Mediante infección adenoviral específica en tanicitos, hemos demostrado que el silenciamiento de GLUT2 (Barahona *et al.* 2018), GK (Uranga *et al.* 2017) y MCT1 (Elizondo-Vega *et al.* 2016) en ratas lleva a un aumento de la ingesta alimenticia y peso corporal de los animales, sugiriendo fuertemente que el metabolismo de glucosa hasta lactato en los tanicitos y su posterior exporte a neuronas implicadas en la vía de la melanocortina del ARC, cumple un rol fundamental en la generación de saciedad.

5. Aspectos relevantes del metabolismo de glucosa cerebral.

Glucosa y ácidos grasos son los principales combustibles del organismo, siendo utilizados por los diversos tejidos de manera diferencial. El corazón y los riñones pueden usarlos indistintamente, mientras que el cerebro utiliza casi exclusivamente glucosa y en mucha menor medida cuerpos cetónicos. Se ha estimado que el cerebro utiliza cerca del 20% de la oferta de glucosa del organismo, sin embargo, fisiológicamente las neuronas no son capaces de almacenar glucosa a la forma de glucógeno, como si lo hacen astrocitos y tanicitos (Oz *et al.* 2009; Rodríguez *et al.* 2005). A pesar de que en la actualidad no se conocen células gliales que puedan exportar glucosa desde glucógeno, ellas sí pueden generar y liberar lactato (Dringen *et al.* 1993). Además, se ha demostrado que las neuronas presentan significativamente menos actividad glicolítica que las glías debido a un bloqueo funcional a nivel de la fosfofructoquinasa, lo que asegura un flujo sostenido a través

de la vía de las pentosas-fosfato, una vía anabólica que además de generar sustratos nucleotídicos mantiene el citosol reducido y así protegido contra estrés oxidativo (Herrero-Mendez *et al.* 2009). Por contraparte, las células gliales son glicolíticas por excelencia; resultados previos de nuestro grupo de investigación han evidenciado que cultivos primarios de tanicitos expuestos a 15 mM de glucosa exportan lactato de manera tiempo dependiente (Cortes-Campos *et al.* 2011) y que la apertura de hemicanales generada producto de la metabolización glicolítica de glucosa se genera en menos de 20 seg de incubación con glucosa (Orellana *et al.* 2012).

En base a la teoría glucosensora metabólica que postulamos, por cada molécula de glucosa que los tanicitos son capaces de captar, se producen glicolíticamente 2 moléculas netas de ATP y 2 de lactato. Nuestros resultados previos indican que ATP, además de sus roles energéticos, puede ser utilizado como molécula de señalización autocrina en tanicitos lo que lleva a la liberación de calcio desde reservorios intracelulares, desconociendo si posee algún efecto sobre canales de potasio sensibles a este nucleótido (Orellana *et al.* 2012), los cuales se encuentran ampliamente implicados en modelos sensibles a glucosa. Lactato, por su lado, es una molécula rica en electrones compuesta de tan solo 3 átomos de carbono y enlazada a la red metabólica por piruvato, en una reacción cercana al equilibrio catalizada por la enzima redox lactato deshidrogenasa (LDH).

Otra diferencia importante entre células gliales y neuronas es la actividad de la enzima piruvato deshidrogenasa (PDH), puerta de entrada a las reacciones aeróbicas mitocondriales. Las neuronas mantienen una PDH activa, canalizando el

piruvato al ciclo de Krebs, mientras que en células gliales PDH se encuentra tónicamente inhibida por fosforilación, favoreciendo la génesis y exporte de lactato (Halim *et al.* 2010).

6. Rol de GK-GKRP en el glucosensing hipotalámico

Las propiedades cinéticas de GK le confieren un rol protagónico en los procesos de glucodetección. Dado que su $S_{0.5}$ para glucosa se encuentra muy próxima a la concentración plasmática de este azúcar, la actividad catalítica de GK cambia significativamente en respuesta a pequeños cambios en la glicemia. Además, su baja afinidad por glucosa le permite responder eficientemente a aumentos de glucosa circulante, a diferencia de las otras hexoquinasas (I-III) que poseen valores de K_m menores a 1 mM, por lo que se saturan a valores de glicemia estándar (Cardenas *et al.* 1998). En el hipotálamo basal el ~90% de la expresión de GK está restringida a los tanicitos (Millan *et al.* 2010), los cuales también expresan el único regulador endógeno de GK conocido a la fecha, GKRP (Salgado *et al.* 2014). Resultados previos indican que los tanicitos en cultivo responden a aumentos de glucosa extracelular generando ondas de calcio intracelular, los cuales dependen de la actividad de GK (Orellana *et al.* 2012). Se ha reportado que una inyección intracerebroventricular (icv) de aloxano, un inhibidor farmacológico de GK, desregula la respuesta anorexigénica a glucosa en ratas, (Sanders *et al.* 2004). En esta misma línea, el silenciamiento adenoviral de GK en tanicitos altera la expresión de neuropéptidos hipotalámicos y potencia la ingesta alimenticia (Uranga *et al.* 2017), posicionando a GK como un actor clave en el glucosensing hipotalámico.

A pesar de que los hepatocitos comparten con tanicitos la expresión de GK y GKRP, nuestros resultados recientes indican que a diferencia de lo que ocurre en hígado donde GK cambia su localización desde nuclear a citoplasmática en respuesta a un estímulo hiperglicémico, en tanicitos de los mismos animales y al mismo tiempo, GK aumenta su localización nuclear. Otra diferencia fundamental entre hepatocitos y tanicitos es que, en los primeros, GKRP permanece principalmente nuclear independiente de la concentración de glucosa a la que son expuestos mientras que en tanicitos, esta proteína parece aumentar su localización nuclear de la misma manera como lo hace GK (Salgado *et al.* 2014). Aún resta por dilucidar la trascendencia de esta regulación glucosa dependiente diferencial en tanicitos y si este fenómeno depende de la concentración de GKRP del tejido, dado que en hígado se presentan altos niveles de esta proteína regulatoria mientras que en hipotálamo su expresión es discreta (Alvarez *et al.* 2002; Beer *et al.* 2009). En hipotálamo de humanos también se ha identificado GKRP tanto a nivel de mensajero como de proteína, sin embargo, su funcionalidad aún no ha sido explorada (Roncero *et al.* 2004).

7. Rol de monocarboxilatos gliales en el glucosensing hipotalámico

Se ha propuesto que el lactato generado en la glía puede ser tomado por las neuronas del ARC y utilizado para modificar su actividad y la liberación de neuropéptidos implicados en la regulación del comportamiento alimenticio. Lam y cols. (Lam *et al.* 2005) demostraron que la inyección icv de lactato genera los mismos efectos observados tras una inyección icv de glucosa, principalmente, una disminución robusta en la glicemia producto de un descenso en la glucogenólisis

hepática. La coinyección de lactato y oxamato, un inhibidor de la conversión de lactato a piruvato, suprime los efectos de glucosa y lactato icv, indicando que la conversión a piruvato es un paso esencial en la vía glucosensora hipotalámica. Por su lado, la perfusión de lactato al HVM imita los efectos de glucosa, inhibiendo la liberación pancreática de glucagón durante un *clamp* hipoglucémico (Borg *et al.* 2003).

En el tronco cerebral, el lactato es sentido como una señal metabólica que puede regular la actividad de neuronas sensibles a glucosa en el área postrema y el Núcleo del tracto solitario (NTS), lo que pudo ser confirmado gracias a estudios de inmunomarcaje de c-fos y bloqueando transportadores de monocarboxilato con 4-hidroxicinamato (4-CIN), lo que lleva a una elevación de la concentración de glucosa sanguínea (Briski & Patil 2005; Marty *et al.* 2007; Patil & Briski 2005). Aún resta por conocer en específico el rol de lactato sobre la actividad de neuronas gluconsensoras del ARC. En este contexto, sabemos que las neuronas del ARC, tanto AgRP como POMC, expresan el transportador de lactato MCT2 (Cortes-Campos *et al.* 2013) mientras que los tanicitos expresan MCT1 y MCT4 (Cortes-Campos *et al.* 2011), cuyas propiedades cinéticas y funcionales hacen plausible su participación en el transporte de monocarboxilatos entre glía y neuronas (**Tabla 1**).

Estudios *in vivo* en los que se ha silenciado la expresión de MCT1 específicamente en tanicitos de rata, muestran que el perfil de expresión de neuropéptidos se desregula drásticamente. Mientras que en animales controles inyectados icv con 10 μ L de glucosa 50 mM la expresión de péptidos orexigénicos cae y los neuropéptidos anorexígenos aumenta, en animales MCT1-KD nos encontramos

con que la expresión de neuropéptidos orexigénicos no cae en respuesta a glucosa y sorprendentemente, los anorexígenos se encuentran altos aun en periodos de ayuno (Elizondo-Vega *et al.* 2016). En este escenario, podemos inferir que lactato es responsable al menos en parte de la inhibición en la expresión de neuropéptidos inductores de hambre en respuesta a glucosa, ya que cuando no se puede exportar, esta regulación no tiene lugar. Respecto a la respuesta anorexigénica en ayuno, sin embargo, no es factible responsabilizar a lactato, dado que los niveles cerebrales de esta molécula son depletados luego de 15 minutos de ayuno (Oz *et al.* 2009). De este modo, solo es posible que algún monocarboxilato distinto a lactato, transportado por MCT1, sea responsable de la inhibición de neuronas anorexigénicas en situación de ayuno. MCT1, además de lactato, puede transportar una amplia gama de monocarboxilatos de cadena corta, aunque sus principales sustratos naturales son L-lactato, piruvato, D- β -hidroxibutirato (β HB), acetoacetato (AcAc), acetato y butirato (**Tabla 1**), aunque los dos últimos pueden atravesar la membrana por simple difusión (Halestrap 2013).

Mientras que lactato y piruvato son producidos en condiciones energéticamente favorables, β HB y AcAc son los principales productos de la cetogénesis hepática, vía que se encuentra activa solo en condiciones de ayuno prolongado. β HB es una forma reducida de AcAc, reducción que está favorecida en condiciones fisiológicas, lo que lleva a que β HB constituya cerca del 70% de la producción hepática de cuerpos cetónicos (Persson 1970).

Tabla 1: Afinidad (K_m) de los principales miembros de la familia de MCTs sobre monocarboxilatos de relevancia fisiológica (Tomado de (Halestrap 2013))

Monocarboxylate	MCT1	MCT2	MCT4	Plasma concentration
Acetate	(3.73)[3.5]	NA	NA	0.030
Propionate	[1.5]	NA	NA	NA
L-lactate	3.5 (4.5)	0.74	28	1.51
D-lactate	(27.5)	NA	519	NA
Pyruvate	1.0 (0.7)	0.08	153	0.064
D- β -hydroxybutyrate	(10.1)	1.2*	130	0.060
γ -hydroxybutyrate	(7.7)	NA	>500 [#]	NA
Acetoacetate	(5.5)	0.8	216	0.041
α -Ketobutyrate	(0.2)	NA	57	NA
α -ketoisocaproate [†]	0.7	0.1	95	NA
α -ketoisovalerate [†]	1.3	0.3	113	NA

*D,L racemic mix used in these studies.

[#]Uptake too low to measure accurately.

[†]These substrates are transported slowly and acted better as inhibitors.

8. Cuerpos cetónicos y sus efectos neuronales

La cetogénesis es el proceso catabólico mediante el cual los ácidos grasos son convertidos en moléculas hidrosolubles llamados cuerpos cetónicos. Este proceso ocurre principalmente en las mitocondrias de hepatocitos a muy bajos niveles, pero se potencia en respuesta a bajos niveles de glucosa (Laffel 1999). En este proceso, los ácidos grasos son enzimáticamente catabolizados hasta acetil coA. Cuando la cantidad de acetil coA es superior a la capacidad de procesamiento del ciclo de Krebs, el acetil coA toma rutas alternativas hasta convertirse en acetoacetato y luego en β HB, siendo un punto regulatorio en este proceso la actividad de la enzima hidroximetilglutaril coA sintasa (HMG-CoA sintasa, HMGCS2). A pesar de que en rigor β HB no es una cetona, es el principal producto de la cetogénesis. Se ha documentado que acetoacetato y β HB pueden viajar vía circulación sanguínea y alcanzar el tejido cerebral a través de MCTs (Kim & Rho 2008).

8.1. Uso terapéutico de dietas cetogénicas

Aun cuando una producción excesiva de cuerpos cetónicos puede resultar en cetoacidosis, en los últimos años ha existido una expansión notoria en la literatura científica que muestra distintos efectos beneficiosos, extra-energéticos, de la infusión de β HB en el tejido cerebral. Desde los años 1920s, una dieta cetogénica que incluye bajo consumo de carbohidratos y alta ingesta de grasas, ha sido utilizada para el control efectivo de ataques epilépticos (Wilder 1921). El desarrollo de fármacos antiepilépticos disminuyó el uso de la dieta cetogénica como herramienta terapéutica, sin embargo, recobró relevancia en los 1990s luego de un gran número de estudios que demostraron su eficacia e inocuidad (Freeman *et al.* 1998; Vining *et al.* 1998). Desde entonces, esta dieta se ha utilizado terapéuticamente para tratar distintas patologías, incluyendo síndrome de abstinencia alcohólica (Dencker *et al.* 2018), enfermedad de Parkinson (Shaafi *et al.* 2016; Vanitallie *et al.* 2005), esclerosis lateral amiotrófica (Siva 2006), esquizofrenia (Kraft & Westman 2009) y enfermedad de Alzheimer (Reger *et al.* 2004; Taylor *et al.* 2018).

A pesar de estos efectos demostrados, no está del todo claro el mecanismo por el cual los cuerpos cetónicos ejercen su acción. Al respecto, se han propuesto varias hipótesis, incluyendo la potenciación de la transmisión GABAérgica (Dahlin *et al.* 2005; Yang *et al.* 2007), antagonismo de la transmisión glutamatérgica (Juge *et al.* 2010; Yang *et al.* 2007), incremento en la actividad de canales de potasio (Ma *et al.* 2007a; Tanner *et al.* 2011), transmisión purinérgica (Masino *et al.* 2011) e incrementos en la actividad antioxidante (Maalouf *et al.* 2007).

8.2. Rol de cuerpos cetónicos en el comportamiento alimenticio.

Recientemente, se ha demostrado que β HB inhibe la expresión y secreción de la hormona liberadora de la hormona del crecimiento (GHRH) en neuronas hipotalámicas inmortalizadas de ratón (Fu *et al.* 2015). De manera interesante, se ha empleado el mismo modelo celular para demostrar que β HB induce un aumento de expresión de AgRP, efecto que fue dependiente de la concentración de glucosa del cultivo y de la actividad de la enzima quinasa dependiente de AMP, AMPK (Laeger *et al.* 2012). Los resultados muestran que β HB favorece una señalización orexigénica exclusivamente cuando las células son cultivadas a 25 mM glucosa, mientras que a baja glucosa (5.5 mM) se reduce significativamente tanto la fosforilación de AMPK como la expresión AgRP. En relación con el rol de β HB en la modulación del comportamiento alimenticio, se ha publicado que una infusión intracarótida de β HB, en animales alimentados *ad libitum*, induce un aumento de la expresión de neuropéptidos orexigénicos acompañado de un incremento en la ingesta alimenticia en ratones (Carneiro *et al.* 2016). A pesar de que no se conocen mayores detalles sobre el mecanismo por el cual este efecto se lleva a cabo, los autores pudieron demostrar que dicho tratamiento provocaba un aumento de la fosforilación activante de la enzima AMPK en el hipotálamo de los animales.

8.3. Producción glial de cuerpos cetónicos

A pesar de que el hígado es ampliamente reconocido como el principal tejido cetogénico, desde hace 20 años existen reportes en literatura que indican que astrocitos corticales son capaces de realizar cetogénesis desde ácidos grasos de cadena larga en situación de deprivación energética, efecto que es potenciado con

fármacos activadores de AMPK (Blazquez *et al.* 1999). Los autores demostraron que además de activar la ruta cetogénica, AMPK potencia la actividad de carnitina palmitoil transferasa I (Cpt1) y acetil-coA carboxilasa (ACC), favoreciendo el catabolismo de ácidos grasos, mientras que disminuyeron los niveles de malonil coA, principal precursor de la biosíntesis de lípidos (**Fig. 3**). La evidencia de que los astrocitos puedan llevar a cabo la síntesis de cuerpos cetónicos en el cerebro va de la mano con su habilidad de llevar a cabo otras vías del metabolismo de lípidos, tales como su síntesis (Lopes-Cardozo *et al.* 1986) y secreción de lipoproteínas (Ladu *et al.* 2000).

En el hipotálamo basal, la principal glía residente es el tanicito, célula que comparte muchas propiedades características con astrocitos, incluyendo la expresión de GFAP (tanicitos α). Resultados preliminares indican que los tanicitos expresan niveles significativos de proteínas claves para el proceso de cetogénesis, tales como HMG-coA sintasa y Cpt1, mientras que neuronas del ARC expresan proteínas que permiten tanto su transporte (MCTs) como la señalización extracelular (HCA2) (Resultados no publicados). Además, como se adelantó al final de la sección 7, el silenciamiento de MCT1 en tanicitos afecta la respuesta de las neuronas hipotalámicas al ayuno. En conjunto, estas evidencias nos hacen plantear la hipótesis que los tanicitos podrían ser capaces de producir cuerpos cetónicos y estos a su vez modular la actividad de neuronas del ARC, las cuales a su vez modulan el comportamiento alimenticio. Cabe destacar que, existe la posibilidad adicional y no excluyente que los tanicitos regulen el tránsito de β HB desde la EM hacia las neuronas del ARC, sin participar en la génesis de estos metabolitos.

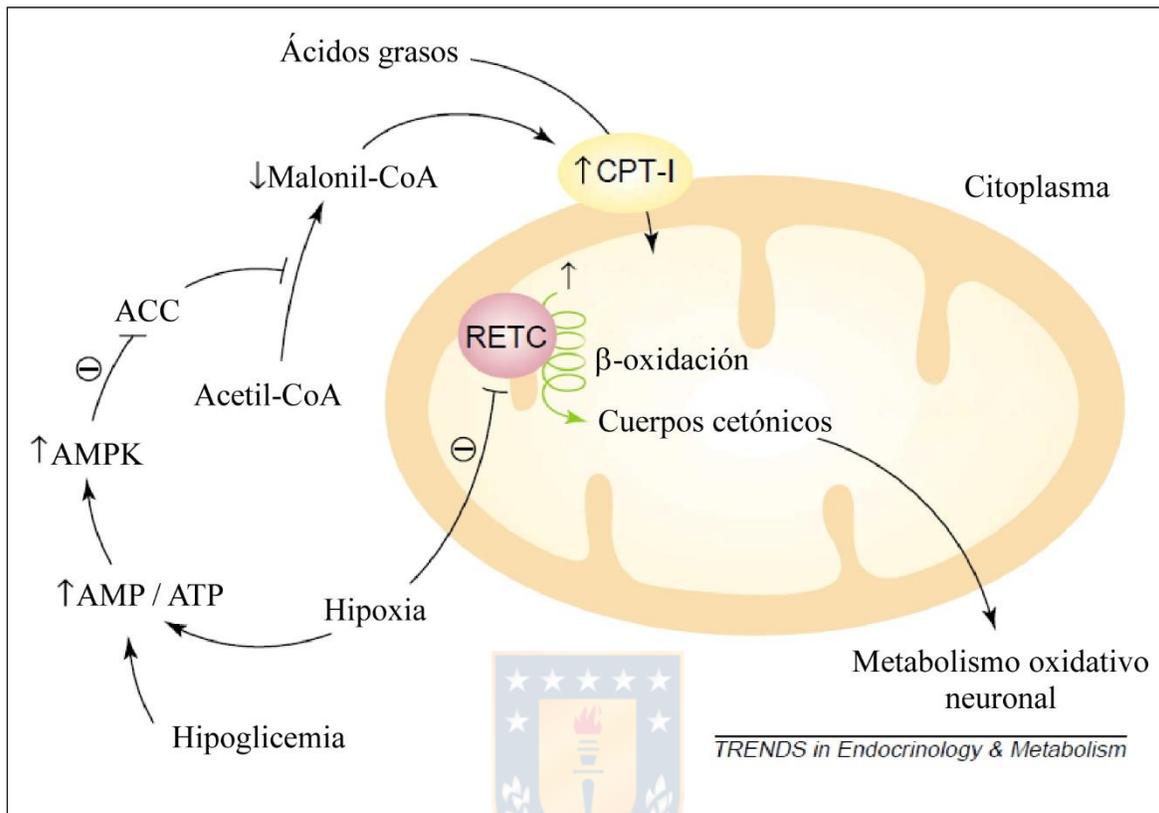


Figura 3: Modelo propuesto del rol de AMPK sobre la producción de cuerpos cetónicos en astrocitos durante ayuno o hipoxia. Tanto el ayuno como la hipoxia llevan a un aumento de la razón AMP/ATP, activando a la enzima AMPK, la que a su vez fosforila a la enzima ACC, inactivándola. La disminución en los niveles de malonil-coA favorece la actividad de Cpt1, potenciando la incorporación y metabolización de ácidos grasos a la mitocondria de los astrocitos, lo que sustenta una tasa cetogénica constante en estas condiciones. Adaptado de Blázquez 2011.

8.4. HCA2 y vía de señalización inducida por β HB

En los últimos años, se ha identificado el único receptor conocido a la fecha que tiene como ligando endógeno a β HB, el receptor de ácidos carboxílicos 2 (HCA2) (Taggart *et al.* 2005). A nivel cerebral, se ha informado su expresión en cerebelo, hipocampo e hipotálamo, sin especificar el tipo celular en que se expresa (Titgemeyer *et al.* 2011). Este receptor posee una IC_{50} para β HB de 0.8 mM y se encuentra acoplado a proteína G de tipo inhibitorio (G_i/G_o). Dada su alta afinidad por β HB, HCA2 se encuentra facultado para responder a concentraciones plasmáticas de esta molécula, teniendo un rol clave en la modulación de la actividad lipolítica del tejido adiposo. Además del tejido adiposo, se ha informado la expresión de este receptor en varias células del sistema inmune, tales como macrófagos, neutrófilos y células dendríticas (Ahmed 2011; Tang *et al.* 2008). Evidencias recientes sugieren que HCA2 puede mediar además efectos anti-neuroinflamatorios (Offermanns & Schwaninger 2015), destacando el rol beneficioso que posee la activación de este receptor en el tratamiento de esclerosis múltiple (Kappos *et al.* 2008).

Una vez que HCA2 se activa, se reduce la actividad de la adenil ciclasa con la concomitante reducción en la producción de AMPc (Ahmed *et al.* 2009; Soga *et al.* 2003). Los efectos funcionales de esta señalización han sido ampliamente estudiados en adipocitos, llevando a una inhibición de la lipólisis cuando la concentración circulante de β HB se encuentra aumentada (Taggart *et al.* 2005). En células del sistema inmune se ha reportado que la activación de HCA2 lleva a un aumento de la concentración de calcio intracelular, desconociéndose la vía

molecular por la que este aumento se lleva a cabo (Benyo *et al.* 2006). A nivel cerebral, sin embargo, no existen publicaciones que analicen el rol de este receptor.



II. Planteamiento del problema

Abundantes evidencias avalan la idea que el hipotálamo es el centro integrador y regulador de la ingesta alimenticia y la homeostasis de glucosa. Hemos propuesto que los tanicitos sensan los niveles de glucosa sistémicos desde la EM y liberan lactato como señal para activar las neuronas de núcleos adyacentes. Previamente, hemos demostrado en tanicitos la expresión y funcionalidad del transportador de glucosa GLUT2, de la enzima GK y de su proteína reguladora GKRP, proponiendo un rol clave de esta célula glial en el sistema sensor de glucosa cerebral. No conocemos, sin embargo, el real rol de la proteína GKRP sobre el comportamiento alimenticio, dado sus bajos niveles de expresión en el hipotálamo y su localización subcelular ubicua, lo que la diferencia de la contraparte hepática. En este escenario, no sabemos si el nivel de expresión de esta proteína podría afectar la localización subcelular de GK en respuesta a glucosa y en consecuencia la actividad de las neuronas del ARC encargadas de la modulación del comportamiento alimenticio.

Por otro lado, no se tiene claridad en cuanto a los mecanismos de *sensing* en hipoglicemia, en donde los derivados de glucosa (piruvato, ATP o lactato) difícilmente podrían ejercer un rol protagónico dada la escasez de nutrientes. Reportes de literatura y nuestros resultados preliminares nos llevaron a proponer que los tanicitos serían capaces de producir y liberar cuerpos cetónicos, los cuales podrían ser tomados por las neuronas del ARC para regular su actividad y de esta manera modular luego el comportamiento alimenticio. En este contexto, es probable también que luego de un ayuno prolongado, capilares fenestrados de la

EM se extiendan hasta el ARC, favoreciendo el acceso directo de β HB desde la circulación periférica. Cualquiera sea el caso, ya sea producción local y/o incorporación desde la periferia, es probable además que β HB se incorpore a las neuronas del ARC mediante MCT2 para su metabolización y obtención energética o que, por el contrario, estos compuestos activen vías de señalización extracelular, como las que dependen del receptor HCA2.



HIPOTESIS

La concentración de glucosa y GKRP modulan la localización subcelular de GK en tanicitos, condiciones que determinan la generación de lactato en hiperglicemia o cuerpos cetónicos en hipoglicemia, los cuales tendrán efectos opuestos en la modulación del comportamiento alimenticio

OBJETIVOS

I. OBJETIVO GENERAL

Determinar el rol de GKRP y de la cetogénesis glial en el glucosensing hipotalámico mediado por la comunicación tanicito-neurona



II. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1) Determinar la participación de GKRP en la localización subcelular de GK en tanicitos y su efecto sobre el comportamiento alimenticio.
- 2) Determinar el rol de los cuerpos cetónicos en la comunicación tanicito-neurona glucosensora en condiciones hipoglicémicas.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales de experimentación

En esta tesis se utilizaron ratas Sprague-Dawley de 17 días de desarrollo embrionario (E17) para cultivo primario de neuronas hipotalámicas, 1 día postnatal (P1) para cultivo primario de tanicitos y machos adultos de 200-250g (aprox. P45) para estudios de comportamiento alimenticio y expresión de neuropéptidos hipotalámicos. Además, se emplearon ratones adultos C57BL/J6L y C57BL/6J-Tg(POMC-EGFP)1 (Jackson laboratory, cat#009593) para inmunofluorescencia y estudios electrofisiológicos. Los animales se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura 20-25°C, fotoperiodo 12/12h luz/oscuridad, recibieron acceso libre al agua y fueron alimentados diariamente (Lab Diet, 5P00 Prolab RMH 3000, Purina Mills, St. Louis, MO), excepto en los experimentos en que se indujo ayuno a los animales. Todos los animales de experimentación se manejaron según las normas de bioética del *National Institute of Health*, Bethesda, Maryland y por el manual de Bioseguridad (2018) de CONICYT.

2. Cultivos Celulares

Los cultivos celulares fueron mantenidos en una incubadora de células a 37°C, 5% de CO₂ 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 en nitrógeno líquido con DMSO 10% v/v y medio de cultivo con 20% v/v de suero bovino fetal (SBF).

2.1. Cultivo primario de tanicitos hipotalámicos

Los cultivos primarios fueron obtenidos de ratas Sprague-Dawley de 1 día postnatal y mantenidos a 37°C y 5% de CO₂ en incubadora. La región hipotalámica fue microdiseccionada 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 15 min a 37°C en presencia de tripsina 0.25% (p/v) (Gibco, CA, USA) y EDTA 0.20% (p/v) (Sigma, St. Louis, MO, USA), y luego a disgregación mecánica en medio de plantado MEM (Gibco, CA, USA) suplementada con 10% de SBF (Gibco, CA, USA) y glutamina 2 mM (Gibco RL). El recuento y la estimación de la viabilidad celular fueron realizados por el método de exclusión con azul de tripán. Las células obtenidas se sembraron en frascos de 25 cm² (T25, Corning Costar, NY, USA) a una densidad aproximada de 75000 células/cm² por 4 h, al cabo de las cuales se reemplazó el medio de cultivo por MEM (Sigma) suplementado con 10% de suero bovino fetal (Gibco BRL), glutamina 2 mM, penicilina 100 U/mL, estreptomycin 100 mg/mL y fungizona 2.5 mg/mL. Las células en cultivo se mantuvieron por 10 días con cambios frecuentes de medio cultivo, hasta confluencia. Al día 11, las células se sembraron en placas de 6, 12 o 24 pocillos y se mantuvieron en cultivo hasta el día 14, cuando se realizaron los experimentos respectivos.

2.2. Cultivos primarios mixtos de neuronas hipotalámicas.

Los cultivos primarios fueron obtenidos de ratas Sprague-Dawley de 18 días de gestación y mantenidos en cultivo a 37°C y 5% v/v de CO₂. La región hipotalámica del cerebro de ratas fue microdiseccionada a 4°C en solución de disección

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 10 min a 37°C en presencia de tripsina 0.25% p/v (Invitrogen) y EDTA 0.20% p/v (Sigma) y luego a disgregación mecánica en la solución de Plantado. 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 a una densidad aproximada de 5×10^5 células/cm² por 30 min, al cabo de los cuales se reemplazó el medio de cultivo por Neurobasal (Invitrogen) suplementado con B27 (Invitrogen), glutamina 2 mM (Invitrogen), penicilina/estreptomicina 100 U/mL/100 mg/mL (Invitrogen) y Fungizona 2.5 mg/mL (Invitrogen); 48 h post-sembrado los cultivos fueron tratados con 15 μ M de AraC (Sigma). Las células se mantuvieron por 7 días en cultivo con cambio de medio con AraC cada 2 días, al cabo de los cuales las células se utilizaron para los análisis respectivos.

2.3. Cultivo de células de insulinoma de rata, línea 832/13

Las células fueron mantenidas en cultivo utilizando medio RPMI-1640 (Gibco BRL) que contenía un 10% SBF (Gibco BRL), 10mM HEPES, 2mM L-glutamina, 1mM piruvato de sodio, 0.05 mM 2-mercaptoetanol, 100 UI/mL de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomicina y fungizona 2.5 μ g/ml (Gibco). Las células fueron cultivadas en frascos T25 con 5 mL de medio o en placas Petri de 10 cm de diámetro (Falcon) con 10 mL de medio, con cambios de medio cada dos días. Cuando las células en cultivo alcanzaron una confluencia aproximada del 90%, fueron expandidas en una proporción de 1:5.

2.4. Cultivo de células HEK 293A y HEK293T

En esta tesis se emplearon dos subclones de células embrionarias de riñón humano (HEK). HEK293T fueron utilizadas para evaluar las construcciones adenovirales generadas mediante RT-PCR, western blot y fluorescencia, mientras que las células HEK293A se utilizaron para la producción y amplificación de los adenovirus generados. Ambos subtipos fueron cultivados de idéntica manera, en placas Petri de 10 cm de diámetro (Corning Costar) con 10 mL de medio de cultivo DMEM alta glucosa (Invitrogen) suplementado con 10% v/v de SBF (Invitrogen), penicilina/estreptomicina 100 U/mL/100 mg/mL (Invitrogen) y Fungizona 2.5 µg/mL (Invitrogen) con cambio de medio de cultivo cada dos a tres días. Cuando las células en cultivo alcanzaron una confluencia aproximada del 90%, fueron expandidas en una proporción de 1:5.



2.5. Cultivo de células GT1-7.

Las células de la línea GT1-7 son derivadas de un tumor de neuronas hipotalámicas y fueron mantenidas en cultivo utilizando DMEM alta glucosa (Invitrogen) suplementado con 10% v/v de SBF (Invitrogen), piruvato 110 mg/L (Invitrogen), penicilina 100 U/mL-estreptomicina 100 µg/mL (Invitrogen), glutamina 3.75 mM (Invitrogen) y Fungizona 2.5 µg/mL (Invitrogen). Las células fueron mantenidas en placas Petri de 10 cm de diámetro (Corning Costar) 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 ensayos de RT-qPCR en respuesta a metabolitos.

3. Procesamiento histológico e inmunofluorescencia

3.1. Fijación por perfusión vascular.

Los roedores fueron anestesiados por inhalación de isoflurano y se procedió a abrir la caja torácica e instalar una cánula en el ventrículo izquierdo del animal, abriendo un drenaje en la aurícula derecha. Inmediatamente, los animales fueron perfundidos con 25 mL de suero fisiológico durante 10 min y luego con 100 mL de PFA al 4% p/v por 30-40 min. Los cerebros fueron extraídos y post-fijados por inmersión durante 24 h a 4°C en PFA al 4% p/v y luego mantenidos en sacarosa al 30% p/v por 72 h a 4°C.

3.2. Procesamiento criogénico y obtención de cortes por congelación.

Las muestras de cerebro fijadas con PFA 4% p/v por perfusión vascular y mantenidas en sacarosa fueron embebidas en la solución criopreservante Neg-50 (Microm International, GmbH), congeladas a -20°C y luego mantenidas a -80°C hasta el momento de realizar los cortes histológicos de 30 µm en criostato (Microm HM520). Las secciones obtenidas fueron procesadas para inmunofluorescencia en cortes flotantes.

3.3. Inmunofluorescencia en cortes de tejido.

Las muestras fueron lavadas 3 veces por 10 min en tampón Tris-fosfato 10 mM (pH 7.8) e incubadas con el primer anticuerpo por 16 h en una cámara húmeda en las diluciones correspondientes (**Tabla 2**), preparado en Tris-BSA 1% y Tritón X-100 0.2% v/v. Posterior a la incubación con el primer anticuerpo las muestras se lavaron 10 veces por 2 min en tampón Tris-fosfato 10 mM (pH 7.8) e incubadas durante 2 h

con los anticuerpos secundarios respectivos conjugados a cianinas (**Tabla 3**), en una cámara húmeda oscura y a temperatura ambiente. Luego, las muestras fueron lavadas 10 veces por 2 min en tampón Tris-fosfato 10 mM (pH 7.8). Finalmente, las muestras fueron montadas con medio de montaje para fluorescencia (Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA). Como tinción nuclear se utilizó Hoechst o TOPRO-3 dependiendo de las propiedades espectrales de los fluoróforos empleados (Invitrogen). Independiente del marcador nuclear utilizado, las muestras fueron incubadas con 1 μ M de este colorante diluido en conjunto con el anticuerpo secundario.

3.4. Inmunofluorescencia en células

Las células fueron cultivadas sobre cubreobjetos de vidrio de 12 mm recubiertos con poly-L-lisina 0.2 mg/mL en placas 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, las células 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 3**), 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 o Hoechst en conjunto con el anticuerpo secundario.

4. Microscopía confocal y procesamiento de imágenes.

Las imágenes (1024 x 1024 x 8 bits) fueron obtenidas en un microscopio confocal espectral LSM780 NLO (Zeiss) equipado con 6 líneas laser UV-visible (405, 458, 488, 514, 561 y 633 nm) y un láser pulsado multifotónico (680-1080 nm). Para el procesamiento de las imágenes capturadas se utilizó el software ZEN 2.1 (Zeiss) mientras que la cuantificación de la intensidad de fluorescencia fue realizada mediante el software *ImageJ*.

Tabla 2: Anticuerpos primarios utilizados

Anticuerpo	Especie	Dilución	Empresa
Anti-GK H88	Conejo	1:100	Santa Cruz Biotechnology
Anti-GK MM	Cabra	1:500	Donado
Anti-GKRP H300	Conejo	1:100	Santa Cruz Biotechnology
Anti-GLUT2	Conejo	1:100	Alpha Diagnostic
Anti-Vimentina	Ratón	1:400	Dako Cytomation
Anti-vimentina	Pollo	1.400	Millipore
Anti-HCA2	Ratón	1.200	Santa Cruz Biotechnology
Anti-NeuN	Conejo	1:1000	Abcam
Anti-GFAP	Conejo	1:500	Millipore

Tabla 3: Anticuerpos secundarios utilizados

Anticuerpo	Especie	Dilución	Empresa
Anti-conejo-Alexa 488	Burro	1:200	Jackson immunoResearch
Anti-conejo-Alexa 549	Burro	1:200	Jackson immunoResearch
Anti-conejo-cy5	Burro	1:200	Jackson immunoResearch
Anti-ratón-Alexa-488	Burro	1:200	Jackson immunoResearch
Anti-cabra-cy5	Burro	1:200	Jackson immunoResearch

5. Vectores de expresión utilizados

-El plásmido H₆PQE60 de 3.4 kb fue usado para subclonar desde él la región codificante de GGRP glial. La transformación bacteriana con este vector confiere resistencia a ampicilina y cloranfenicol y posee un sitio de unión al ribosoma (RBS II). Además, contiene un sitio de término de la transcripción del fago λ t_o y el promotor fuerte del colifago T7, ubicado río arriba de dos operones lac, permitiendo la represión del gen subclonado por el represor lac, el cual es inducible por IPTG.

-El plásmido pDC311-OFF fue utilizado para expresar un *short hairpin* (sh) para GGRP. Este vector bicistrónico permite la expresión de ARNs pequeños bajo el control del promotor H1 y de la proteína fluorescente verde potenciada (EGFP) bajo el control del promotor de ubiquitina. La transformación bacteriana con este vector confiere resistencia a ampicilina.

-El vector PCR-blunt II-TOPO de 3.5 kb permite el clonamiento en un paso de productos de PCR con extremos *blunt*. La ligación del producto de PCR impide la expresión del gen de fusión LacZ-ccdB, cuya expresión es letal para clones transformantes negativos. La transformación bacteriana con este vector confiere resistencia a kanamicina y zeocina.

6. Cepas microbiológicas

-La cepa de *E. coli* Top10, cuyo genotipo es F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ (araleu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG, fue utilizada para la transformación de las distintas construcciones generadas para el diseño del plásmido pDC311.4-GGRP-Venus.

7. Medios de cultivo microbiológico

-El medio Luria (LB) se preparó utilizando 10 g/L de Bacto-triptona, 5 g/L de extracto de levadura y 5 g/L de NaCl. Luego, se ajustó a pH 7.0 y se autoclavó.

-Las placas LB- agar, se prepararon utilizando medio LB y agregando 15 g/L de agar. Luego se autoclavó, se enfrió a 50°C y se le adicionaron los antibióticos esterilizados por filtración (ampicilina 100 µg/mL final).

-El Medio SOC se preparó utilizando 20 g de Bacto-triptona, 5 g de Bacto-yeast extract, 0.5 g de NaCl y 2.5 mL de KCl 1M para un volumen de 1 L, se ajustó a pH 7.0 y se autoclavó, luego se agregó 20 mL de glucosa 1 M estéril y se almacenó a -20°C hasta su uso.



8. Aislamiento de plásmidos

Los plásmidos fueron purificados utilizando Kit comerciales (E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit I, Omega Bio-Tek, GA, USA) y siguiendo las recomendaciones del fabricante.

9. Extracción de ARN total

El ARN total fue obtenido desde tejido animal, cultivos primarios de tanicitos, cultivo primario de neuronas hipotalámicas, células 832/13, Gt1-7 y 293T. El ARN fue extraído homogenizando las muestras en 0.5 o 1 mL de Trizol®, incubándolas por 5 min a temperatura ambiente y centrifugándolas a 10000 xg por 10 min. Se retiró el sobrenadante y se agregó 200 µL de cloroformo, se agitó a emulsión

vigorosamente por 15 seg y se incubó a temperatura ambiente por 3 min. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 12000 xg por 15 min a 4°C, para separar las fases. Una vez recuperada la fase acuosa, se agregaron 500 µL de isopropanol a cada muestra, las que fueron incubadas por 10 min a temperatura ambiente y luego centrifugadas a 12.000 xg por 10 min a 4°C. El sobrenadante fue eliminado y el pellet fue lavado dos veces con 500 µL de etanol 70% v/v y centrifugado a 1000 xg por 5 min a 4°C. El pellet fue resuspendido en 10 a 50 µL 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.

10. Transcripción reversa del ARN, síntesis de ADNc

Previo al proceso de transcripción reversa, 2 µg de ARN total fueron tratados con ADNasa (ThermoFisher) para eliminar cualquier posible contaminación con ADN. Para un volumen final de 20 µL, se incubó la mezcla anterior con 0.5 µg de OligodT, 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, MgCl₂ 4 mM, DTT 10 mM), la mezcla de dNTPs (1 mM de cada uno) y 20 U del inhibidor de ARNasa y se incubó por 5 min a 37°C. Finalmente, se agregaron 200 U de la enzima transcriptasa reversa RevertAid® H Minus M-MuLV (ThermoFisher) 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 la enzima transcriptasa reversa.

11. Amplificación del ADNc por PCR

La reacción de amplificación del ADNc obtenido se realizó en un termociclador Mastercycler (Eppendorf) en presencia de los distintos partidores específicos (**Tabla 4**). La mezcla de reacción contenía Tris-HCl 10 mM (pH 8.8), KCl 50 mM, MgCl₂ 1.5 mM, mezcla de dNTPs (0.2 mM de cada uno), partidores específicos (0.2 μM de cada uno, Tabla 3), ADN polimerasa Taq 0.31 U (ThermoFisher) y 1 μL del producto de transcripción reversa, en un volumen final de 12.5 μL. La mezcla fue incubada inicialmente a 95°C por 5 min, luego se realizaron 35 ciclos de 95°C por 30 s, (T_m)°C por 30 s y 72°C por 1min/kb, por último, se realizó una extensión final de 72°C por 7 min. Todos los ADNc utilizados fueron testeados con partidores específicos para β-actina. Los partidores utilizados para amplificar los distintos genes fueron diseñados utilizando el programa AmplifX 1.5.4 en función de su T_m, el porcentaje de GC y la formación de dímeros y *loops*.

12. PCR cuantitativo.

El nivel de expresión de distintos genes fue evaluado mediante PCR cuantitativo previa síntesis de ADNc. 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. 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 20 μL, conteniendo 2 μL de ADNc y 0.5 mM de cada partidor (Tabla 3). Las muestras se denaturaron inicialmente a 95°C por 10 min y luego se realizaron 40 ciclos de 95°C por 30 s, T_m por 15 s y

72°C por 15 s, en un 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 (C_t) en relación con el gen de referencia ciclofilina, aplicando el método $\Delta\Delta C_t$.

Tabla 4: Partidores utilizados para RT-PCR, qPCR, clonamiento de shGKRP y GKRP-Venus en pDC311.3.

Nombre	Partidor sense (5'-3')	Partidor antisense (3'-5')	Prod. (pb)
β-actina	GCTGCTCGTCGACAACGGCTC	CAAACATGATCTGGGTCATCTTCTC	353
BamHI-GKRP-KpnI	GGATCCATGGCAGGCACCAAAC GATA	GGTACCATTGAGGGTCCCACAGGCG GGA	1760
KpnI-Venus-NotI	GGTACCGGTGGTATGGTGAGCA AGGGCGA	GCGGCCGCTCACTTGTACAGCTCGT CCA	739
GKRP_418	AGACAGAAGATAGCGCCCTACA	CTTTGAGAGGACACAACACCCTGG	418
qRT-NPY	TGTTTGGGCATTCTGGCTGAGG	CTGGGGGCATTTTCTGTGCTTTC	203
qRT-AgRP	GCAGACCGAGCAGAAGATGTTT	GTAGCACGTCTTGAAGAAGCGG	186
qRT-POMC	CTCCTGCTTCAGACCTCCATAGA	AAGGGCTGTTTATCTCCGTTG	164
qRT-CART	TCTGGGAAGAAGAGGGACTTTC	TCCATTTGTGTTGCTTTGGGGTG	137
qRT-ciclof	ATAATGGCACTGGTGGCAAGTC	ATTCCTGGACCCAAAACGCTCC	239
qRT-Gckr	TGGTGAATGGGAGTTGTCAGGG	TTCCAGCCACTTGCAACATGGT	218
qRT-Gck	TGTGAGGCACGAAGACCTAGAC	ACCAGCTCCACATTCTGCATTTCC	273
q-GLUT2	CAGCTTCATTCTGGGCAATCAG	CAATGGGCTGCCGATAATTCGGAT	290
q-AMPKa2	TACTGTACAGGCACATGGTTGT	GCAGAGTGGCAATAGAACGGTTGA	349
q-HMGCS2	TGGAGGTCTACTTTCCAGCCCA	CGATGTCAGTGTTGCCTGAATCCT	297
BHBDH	TCCAGCTCAATGTCTGCAACAGT	TCATAGCGTAGGCAGTCCGAGAAA	346
Cpt1c	TCTCTGGCGTGTCTGGAATGAC	AGCGCACGTTGAAAGCTGAAGA	382
HCA2	TGGGGCTGGAGTTTGTGTTTG	ATCTTGTTTCCAGGAAGTGGTGCGGG	349

13. Electroforesis en geles de agarosa

Para la identificación de fragmentos de DNA, se realizaron geles de agarosa al 1% en tampón TAE (Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, ácido acético 20 mM) y bromuro de etidio 25 µg/mL. Se utilizó tampón de carga 6X que contiene glicerol 30%, azul de bromofenol 0.5% en tampón TE (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1mM) utilizando un volumen adecuado para cada muestra. Como estándar de peso molecular se utilizaron marcadores de 100 y 1000 pb (ThermoFisher) utilizando 0.5 µg del estándar de DNA por pocillo. Los geles fueron sometidos a un campo eléctrico de 80 V por 40-60 min en tampón TAE. Los fragmentos de DNA en el gel fueron visualizados por tinción con bromuro de etidio, en un transiluminador de luz ultravioleta y las imágenes almacenadas digitalmente.

14. Generación de un adenovirus que silencie y sobreexpresen GKRPs-Venus

14.1. Construcción del plásmido pDC311.3-shGKRPs-EGFP

La selección de las secuencias que codifican para el shARN de GKRPs fue determinada mediante el programa siDESIGN Center (Dharmacon RNAi Technologies) utilizando la secuencia codificante de GKRPs de rata (Gene bank ID 25658). Para evitar que tuvieran homología con otros genes, se analizaron mediante el servidor BLASTn (NIH). Los oligonucleótidos de ADN que contenían los sitios de restricción para Ascl y PacI y la secuencia en horquilla, fueron enviados a sintetizar a la empresa Invitrogen y purificados por PAGE. Los oligos inhibidores de GKRPs (sense 5'-CGC GCC GCC AAA GCA GAT GCA GAG AAA T - 3' y antisense 5'-TAA AAA AAA CAA AGC AGA TGC AGA GAA A-3') fueron

resuspendidos a una concentración de 2 mg/mL en agua estéril libre de ARNasas y ADNasas (ThermoFisher), denaturados y alineados. 10 µg de cada oligo fueron calentados por 1 min a 90°C y luego incubados a temperatura ambiente por 1h en un volumen final de 2 µL, con el fin de clonar esta secuencia en el vector pDC311.2-OFF-EGFP. Este vector, generado previamente en nuestro laboratorio, posee un casete de expresión que contiene el promotor H1 rio arriba de un sitio de multiclonamiento que incorpora los sitios de restricción Ascl y Pacl para clonamiento de la secuencia shARN y un promotor de ubiquitina humana controlando la expresión de la proteína reportera EGFP. Para el clonamiento, el vector pDC311.2-OFF-EGFP fue digerido por 1h con 1U de las enzimas Ascl y Pacl en un volumen final de 10 µL, evaluando la correcta digestión mediante electroforesis en gel de agarosa. 30 ng de vector digerido y purificado por gel (kit SrataPrep DNA gel extraction, Agilent) fueron ligados con 1 µL de oligo alineado, en presencia 1U de la enzima DNA ligasa (Invitrogen) en un volumen final de 20 µL. La mezcla se incubó durante 16 h a 16°C. 1 µL del producto de ligación fue transformado en 50 µL de bacterias quimiocompetentes TOP10 (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. La correcta ligación fue evaluada mediante extracción de plásmidos y posteriores ensayos de restricción utilizando 1U de las enzimas BsrGI y NheI (NEB).

14.2. Construcción del plásmido pDC311.4-GKRP-Venus

Para la generación de este constructo, se empleó un vector previamente diseñado en nuestro grupo de investigación el cual se denominó pDC311.3-EGFP. Este

vector posee un sitio de multiclonamiento (SMC) que incluye sitios de restricción BamHI, KpnI y NotI, bajo la dirección del promotor de ubiquitina humano (Pub).

Como lo muestra el esquema (**Fig. 3**), la estrategia experimental incluye el subclonamiento de la proteína fluorescente Venus entre los sitios KpnI y NotI del vector y de GGRP glial entre los sitios BamHI y KpnI. Para este efecto, lo primero fue incorporar por PCR los sitios 5'KpnI y 3'NotI en Venus utilizando como templado el vector pRSETB-mVenus y como polimerasa una mezcla Taq/pfu 3:1. Se verificó la pureza del producto en un gel de agarosa al 1%, se purificó desde gel utilizando el kit StrataPrep DNA Gel Extraction Kit (Agilent Technologies) y se ligó al vector PCR blunt II-TOPO®. Luego de comprobar la correcta ligación al vector de pasaje, se digirió por 2 h a 37°C tanto el vector pDC311.3-EGFP como el vector generado TOPO-mVenus con las endonucleasas de restricción KpnI (1U) y NotI (1U). Se purificó desde gel un fragmento de 739 pb liberado desde el vector TOPO-mVenus y un fragmento de 5518 pb liberado desde el vector pDC311.3-EGFP. 10 ng del vector y 2 ng del inserto (KpnI-mVenus-NotI) fueron ligados direccionalmente utilizando 1U de la enzima T4 DNA ligase (Invitrogen) en un volumen de reacción de 20 µL y se incubó a 16°C por 16 h. Para la selección de los clones positivos a la ligación se transformaron bacterias quimiocompetentes Top10 (Invitrogen) y se procedió de acuerdo con el protocolo descrito por el fabricante. Los clones positivos fueron analizados mediante ensayos de digestión y por evaluación de la fluorescencia en células HEK 293T transfectadas con esta construcción. Luego, se incorporó por PCR los sitios 5'BamHI y 3'KpnI en el gen de GGRP glial a partir del vector H₆pQE60-GGRP y análogo a la ligación de mVenus al vector, se insertó

GKRP entre los sitios de restricción BamHI y KpnI, es decir, al extremo N-terminal de la proteína fluorescente Venus. La correcta construcción del gen de fusión GKRP-Venus y su ligación en el vector pDC311.3 fue comprobada por ensayos de restricción, por PCR de colonias y por secuenciación automática, mientras que la expresión del reportero fue evidenciada por estudios de transfección celular y evaluación de fluorescencia.

14.3. Generación del adenovirus: co-transfección de células HEK293A

Cada adenovirus fue construido a partir de la recombinación del plásmido pBHGlox Δ E1,3Cre, que contiene la delección de los genes E1 y E3, con cada vector de transferencia, pDC311.2-shGKRP-EGFP y pDC311.3-GKRP-Venus. Para ello se sembraron 4×10^5 cels. 293A (Invitrogen) pasaje <5 en placas de 6 pocillos y se co-transfectaron en duplicado con el vector pBHGlox Δ E1.3Cre y el vector de transferencia en relación molar de 2:3, con Lipofectamine 2000 (Invitrogen) cuando las células se encontraban en un 70% de confluencia, de acuerdo con el protocolo entregado por el fabricante. Las células se mantuvieron en cultivo por 7 días con adición de medio fresco cada 3 días, al cabo de los cuales sólo una pequeña población de ellas presentaba efecto citopático y baja fluorescencia. Se recolectaron las partículas virales mediante lisis celular a través de shock térmico y se combinó cada condición con su réplica. Para ello, las células fueron raspadas y traspasadas a un tubo de cónico de 15 mL, congeladas en nitrógeno líquido durante 20 seg y rápidamente llevadas a 37°C en baño termorregulado hasta un total descongelamiento. Posteriormente, los restos celulares se mezclaron por vortex, repitiendo el procedimiento 2 veces.

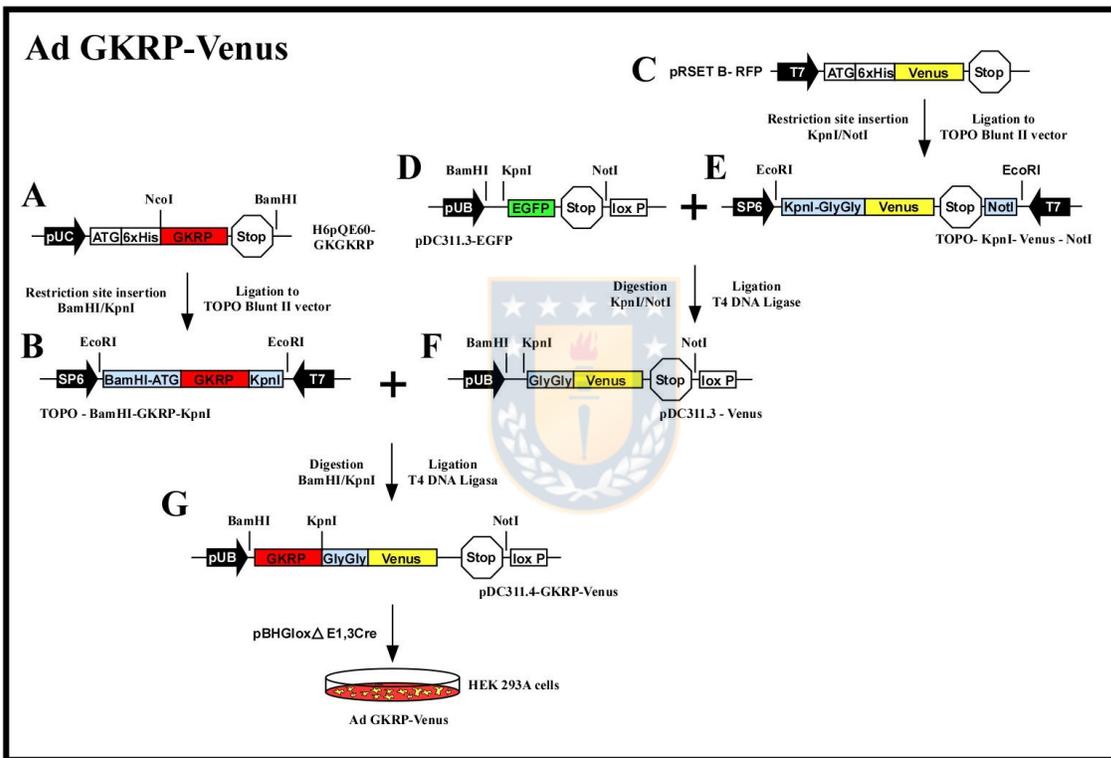
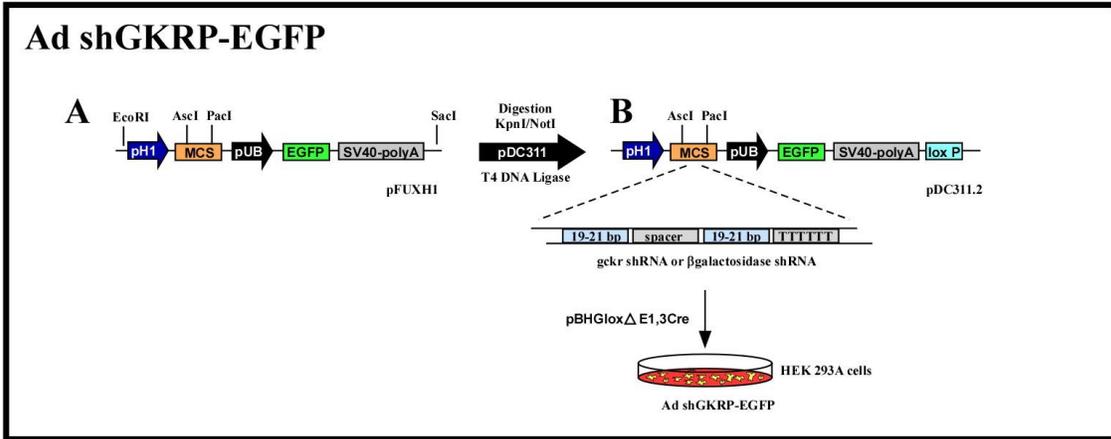


Figura 4: Diagrama de pasos necesarios para la generación de un adenovirus que silencie y sobreexpresé GKRP.

Superior: Para la generación del virus AdshGKRP-EGFP, se sintetizó un shARN dirigido a Gckr de rata incorporándole los sitios de restricción AclI y PaeI, para su posterior clonamiento al vector pdc311.2-OFF-EGFP. **Inferior:** Para la generación

del adenovirus AdGKRP-Venus, al vector de origen pDC311.3 se le escindió el gen reportero EGFP y se le incorporó el gen reportero Venus entre los sitios KpnI y NotI. Al extremo N-terminal de la proteína fluorescente se incorporó el gen codificante para GKRP glial, incorporando 2 residuos de glicina entre ambas proteínas para favorecer un correcto plegamiento de ambas. Ambos vectores se cotransfectaron con el vector pBHGlox Δ E1.3Cre en células HEK 293A en una relación molar 2:3. **pUb**: promotor de ubiquitina, **SMC**: sitio de multiclonamiento, **Amp**: gen que otorga resistencia a ampicilina al vector, **Ori**: origen de replicación plasmidial, **ITR**: repeticiones terminales invertidas, **loxP**: sitio de unión a la recombinasa Cre, **SV 40-polyA**: señal de poli-adenilación Simian Virus 40.



Los restos celulares fueron eliminados mediante centrifugación a 5000 xg por 5 min y el sobrenadante fue filtrado, a través de un filtro de poro de 0.45 μ m. Con el fin de aumentar el título de los adenovirus, las partículas virales contenidas en el sobrenadante se incorporaron a placas de 6 pocillos (Corning Costar) con células 293A a un 70% de confluencia. Al cabo de 1 semana, todas las células de los pocillos presentaban efecto citopático y los virus fueron colectados mediante *shock* térmico y re-amplificados en placas de 100 mm. Al cabo de 8-10 cosechas sucesivas, el adenovirus fue titulado en células 293T, evaluando el número de células infectadas de acuerdo con el protocolo descrito para el kit Adeno-X Rapid Titer (Clontech), dado que los vectores adenovirales codifican las proteínas reporteras EGFP y Venus. Finalmente, los virus se alicuotaron y almacenaron a -80°C hasta su utilización.

15. Utilización de los adenovirus *in vitro* e *in vivo*.

Los adenovirus AdshGKRP-EGFP y AdGKRP-Venus fueron caracterizados evaluando la capacidad *knock down* del vector que porta el shARN contra GKRP y del que la sobreexpresa, respectivamente, tanto en cultivos primarios de tanicitos como *in vivo*, estudiando el efecto que produce un cambio en el nivel de expresión de esta proteína sobre la respuesta hipotalámica a hiperglicemia, para lo cual los virus fueron inyectados i.c.v. a ratas machos adultas de 200-250 g.

15.1. Transducción *in vitro*.

La transducción se realizó incubando las células con 2×10^7 ifu/mL de los adenovirus control e inhibidor, diluidos en el medio de cultivo respectivo suplementado con 2% de SBF por 24 h. Con el fin de evaluar el tiempo de transducción óptimo, se transdujeron tanicitos, 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 analizada su fluorescencia, por microscopía confocal. Para evaluar la capacidad *Knock-down* y de sobreexpresión de estos virus, las células fueron cultivadas en placas de 6 pocillos, transducidas con Adsh β gal (control), AdshGKRP (inhibidor) o AdGKRP-Venus (sobreexpresión) y se incubaron por 72 h (tiempo óptimo). Posteriormente, se procedió a la extracción de ARN total y de proteínas totales, con el fin de realizar RT-qPCR y Western blot, respectivamente. La intensidad de la señal de los inmunoblots fue cuantificada con el programa Quantity One® (Biorad) y normalizada con respecto a actina. Para estudios de traslocación núcleo-citoplasma en cultivo, se analizó la intensidad de fluorescencia en cada compartimiento con el software ImageJ (NIH).

15.2. Transducción *in vivo*.

Las ratas fueron anestesiadas ip con Ketamina/Xilacina 90mg/Kg+10mg/Kg y mediante estereotaxia se implantó una guía de cánula (\emptyset 22 gauss) al 3V basal (bregma -3.14 mm, lateralidad 0.0 mm, profundidad 9.0 mm), la que fue fijada al cráneo mediante tornillos y cemento dental. Los animales se dejaron recuperar de la cirugía por 72 h utilizando tramadol 5mg/Kg como analgésico y con una fuente constante de calor, para finalmente ser inyectados con 20 μ L de los adenovirus control (Adsh β gal), inhibidor (AdshGKRP) o de sobreexpresión (AdGKRP) a una concentración de $1-2 \times 10^9$ ifu/mL, utilizando una cánula (\emptyset 28 gauss) que llegó a los 9.2 mm de profundidad.

15.3. Estudios de comportamiento alimenticio

Para la evaluación del comportamiento alimenticio, los animales fueron transducidos con cada virus durante 72 h, siendo las últimas 24 h en condición de ayuno. Al cabo de este periodo, a los animales se les presentó el alimento durante 24 h adicionales, tiempo en el cual se registró el perfil alimenticio de ellos, incluyendo cambios en la ingesta acumulada de alimentos, cambios en el peso corporal, frecuencia alimenticia y glicemia, entre otros. 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, 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 seg, separados entre sí 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). El intervalo entre comidas es definido como el tiempo que existen entre el término de un evento de alimentación y el inicio del siguiente. El tamaño promedio de la comida fue definido como la ingesta total de alimentos (g) dividido por la frecuencia de alimentación (número). La duración promedio de la comida fue 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 (g) por la duración total de los eventos de alimentación (min).

15.4. Expresión de neuropéptidos hipotalámicos en respuesta a glucosa icv.

Con el fin de evaluar la capacidad hipotalámica de responder a un estímulo hiperglucorráquico en animales que sobreexpresan o tienen silenciada GKRP en tunicitos, animales previamente canulados fueron transducidos durante 72 h, siendo las ultimas 48 h de infección en estado de ayuno. Al término de este periodo, los animales fueron inyectados icv con 10 μ L de LCR artificial sin glucosa

(NaCl 128 mM, KCl 3 mM, CaCl₂ 1.3 mM, MgCl₂ 1.0 mM, NaH₂PO₄ 1.3 mM, Na₂HPO₄ 21 mM, pH 7.4 y 320 mOsm) o glucosa 50 mM disuelta en el mismo tampón. Luego de 2 h de estímulo, los animales fueron sacrificados y se extrajo ARN total desde el hipotálamo basal. Desde cada ARN se generó ADNc y se cuantificó el nivel de expresión de los mensajeros de AgRP, NPY, POMC y CART mediante qPCR utilizando los partidores respectivos (**Tabla 4**).

16. Medición de glicemia en animales

Mediante una punción con lanceta estéril en la vena lateral de la cola de rata, se determinó la concentración plasmática de glucosa (mg/dL) en cada animal antes y después de cada procedimiento, con el fin de analizar la correcta generación de hipoglicemia producto de los periodos de ayuno y para verificar el correcto estado de salud de los animales utilizados en los estudios. Para esto, se utilizó el glucómetro Accu-Chek Go (Roche).

17. Medición de la actividad GK

Con el fin de evaluar el efecto de la sobreexpresión de GKRP sobre la actividad enzimática de GK, células 832-13 fueron transducidas con 5×10^7 ifu/mL del virus AdGKRP-Venus durante 72 h. Las células fueron lisadas por ultrasonido, se extrajeron proteínas y se emplearon para medir actividad hexoquinasa. Según se describió previamente (Salgado *et al.* 2014). Se utilizó una reacción acoplada a glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y se midió el aumento de la absorbancia a 340 nm luego de 5 min de reacción a 37°C. La mezcla de reacción contenía 25 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM DTT, 0.5 mM de Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

oxidado (NADP⁺), 2 mM MgCl₂, 1 mM adenosin trifosfato (ATP), 1U/mL de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, 1-30 mM de glucosa. Para la determinación de actividad específica, se utilizaron 0.5 mg/mL de proteínas totales en la mezcla de reacción. Para determinar la velocidad de reacción para cada absorbancia, se realizó una curva de calibración con glucosa-6-fosfato como sustrato.

18. Electroforesis en geles de poliacrilamida

Las muestras se resuspendieron en una solución que contenía Tris-HCl 60 mM pH 6.8, SDS al 1%, glicerol al 10%, β-mercaptoetanol al 5% y azul de bromofenol al 0.02%, para luego ser calentadas a 65°C por 60 seg. Las electroforesis se realizaron en geles de poliacrilamida al 10% en presencia de Buffer TG-SDS 1X, a un voltaje constante de 100V por aproximadamente 120 min. Una vez finalizada la electroforesis, algunos geles fueron teñidos con azul de Coomassie al 0.1% y desteñidos con una mezcla de metanol 40%, ácido acético 10% y agua. Cuando fue requerido, los geles se electrotransferieron a membranas inmobilonTM-P para el desarrollo de *western blot*.

19. Inmunodetección de proteínas, *Western Blot*

19.1 Electrotransferencia de proteínas

El gel resultante de la electroforesis fue transferido a membranas de InmobilonTM-P (Millipore), poniéndolos en contacto en un sistema de electrotransferencia en presencia de un tampón que contenía Tris 25 mM, Glicina 192 mM y metanol al 20%. La electrotransferencia fue realizada en frío a corriente constante de 40 mA durante 14 h y verificada mediante tinción con rojo ponceau.

19.2 Inmunodetección

Para la inmunodetección de las proteínas transferidas, la membrana fue bloqueada con leche descremada al 5% en tampón TBS–Tween 20 (Tris 10 mM, NaCl 150 mM y Tween 20 al 0.05%) durante 1 h. Luego, fueron incubadas con un primer anticuerpo anti GK, anti GGRP, anti β 1 laminina o anti β -actina (**Tabla 2**), diluido en TBS–Tween 20 más leche descremada al 5%, por 12-14 h a 4°C. Posteriormente, la membrana fue lavada 5 veces con TBS–Tween 20 por 5 min cada vez y luego 3 veces con TBS–Tween 20 más leche descremada al 5% por 5 min cada vez. Luego, la membrana fue incubada por 2 h con un segundo anticuerpo anti-IgG conjugado con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) diluido 1:5000 en TBS–Tween 20 más leche descremada al 5%. Una vez finalizada la incubación la membrana fue lavada con TBS–Tween 20, 10 veces por 5 min cada vez y luego revelada con un sistema de detección quimioluminiscente (Amersham™, ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagents, GE Healthcare, IL, USA) incubando la membrana por 5 min en la mezcla de reacción. El sistema de quimioluminiscencia consistía en dos reactivos: perhidrol y luminol que se mezclan en partes iguales. Ambos compuestos reaccionan con la peroxidasa acoplada a los anticuerpos secundarios dando como producto de oxidación una emisión de luz. La señal quimioluminiscente fue capturada en equipo automatizado de captura de imágenes fluorescentes/quimioluminiscentes (Clinx Science Instruments Co., Ltd, Model ChemiScope 3300. El análisis densitométrico de cada banda se realizó con el software Quantity one®, relativizando los valores a laminina β 1 para los extractos nucleares y a β -actina en los extractos totales y citosólicos.

20. Análisis de la dinámica de localización subcelular de GK en tanicitos a distintas condiciones glicémicas.

Luego de realizado el cultivo de tanicitos, estos fueron mantenidos en medio DMEM suplementado con 2 mM glucosa hasta confluencia y luego cultivados por 6 h a una concentración de 0.5 mM glucosa. Finalizado este periodo, las células fueron incubadas con 15 mM glucosa y procesadas para inmunofluorescencia, PLA, coimmunoprecipitación o fraccionamiento subcelular núcleo-citoplasma a los tiempos 0 y 30 min de incubación con glucosa (60 min sólo cuando se evaluó mediante fluorescencia). Cuando se evaluó el efecto de la sobreexpresión o silenciamiento de GGRP sobre la traslocación de GK en tanicitos, las células fueron transducidas durante 72 h con cada virus previo a la realización de los estímulos con glucosa. Luego de esto, los tanicitos fueron fijados y procesadas para inmunofluorescencia, analizando la localización de GK solamente en tanicitos positivos para Venus.

21. Análisis de la dinámica de localización subcelular de GK en 832-13 sobreexpresando GGRP a distintas condiciones glicémicas.

Análogamente, se determinó en células 832-13, los efectos de la sobreexpresión de GGRP sobre la localización subcelular de GK. Para esto, estas células fueron transducidas con el virus OEG durante 72 h y luego mantenidas en DMEM sin glucosa suplementada con 2% SBF y distintas concentraciones de glucosa. En primer lugar, fueron preincubadas a 3 mM glucosa durante 3 h y luego estimulas a 30 mM glucosa durante 35 min para luego ser procesadas a la inversa, es decir,

preincubadas a 30 mM glucosa durante 3 h y luego estimuladas a 3 mM glucosa durante 35 min. Las células se fijaron cada 5 min de incubación con cada estímulo y luego procesadas mediante inmunofluorescencia anti-GK.

22. Microscopia confocal y cuantificación de la inmunofluorescencia.

Las imágenes fueron obtenidas en un microscopio confocal espectral que contiene líneas láser de 405, 458, 488, 514, 561 y 633 nm asociado a un detector policromático equipado con 32 fotomultiplicadores. Las imágenes fueron obtenidas y procesadas con el software ZEN 2012 (Carl Zeiss) a una dimensión de 1024x1024 píxeles y empleando una potencia de láser de 2-2.5%. Para cuantificar la inmunofluorescencia nuclear de GK o GKRP en las distintas imágenes procesadas, se empleó el software libre ImageJ v1.47. En cada caso, se separaron los distintos canales de la imagen y se seleccionaron 45-60 ROIs (del inglés, *Region of Interest*) desde el canal azul (marcador nuclear). Estos mismos ROIs se emplearon para cuantificar la intensidad del canal rojo (antiGK o antiGKRP) en cada núcleo y/o citoplasma celular.

23. Fraccionamiento subcelular núcleo-citoplasma

Para una separación completa de las fracciones nucleares y citoplasmáticas de células en cultivo, las muestras fueron procesadas con el kit "Nuclear/cytosol fractionation kit" (Biovision, California, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante con pequeñas modificaciones. Brevemente, las células fueron lavadas con tampón PBS y peleteadas a 600g por 5 min. Por cada 2×10^6 células, estas se lisaron con 0.2 mL del reactivo CEB-A suplementado con 1 mM DTT e inhibidor de

proteasas, mezcla que fue agitada a máxima velocidad por 15 seg. para luego ser incubada en hielo durante 10 min. Luego de adicionar 11 μ L de buffer CEB-B, la mezcla fue agitada a máxima velocidad por 5 seg adicionales y centrifugada a máxima velocidad por 5 min. El sobrenadante de esta centrifugación corresponde a la fracción citosólica. El pellet se resuspendió en 100 μ L de buffer NEB suplementado con 1 mM DTT y se agitó durante 15 seg cada 10 min de incubación en hielo por un total de 40 min. Finalmente, la muestra se centrifugó a máxima velocidad durante 10 min, rescatando el sobrenadante como la fracción nuclear. Todos los tampones empleados estaban suplementados con inhibidor completo de proteasas y todas las etapas de centrifugación se realizaron a 4°C.

24. Interacción GK-GKRP en respuesta a glucosa

24.1. Proximity Ligation Assays (PLA)

Para evaluar la interacción endógena de GK y GKRP en tanicitos, se realizaron ensayos de ligación en proximidad, siguiendo las instrucciones del fabricante (Duolink). Para esto, 5×10^4 células fueron sembradas en pocillos de 12 mm recubiertos con poli-lisina. Utilizando los mismos estímulos y tiempos señalados en la sección anterior, las células fueron fijadas con PFA al 4% e incubadas por 16 h con los anticuerpos primarios anti-GK hecho en cabra y anti-GKRP hecho en conejo. Luego, las células fueron incubadas durante 1 h a 37°C con una mezcla constituida por 8 μ L de cada sonda PLA, las que luego fueron ligados utilizando 1 μ L de ligasa y 1X de buffer de ligación 5X durante 30 min a 37°C. Finalmente, la amplificación se llevó a cabo utilizando 0.5 μ L de polimerasa durante 100 min a 37°C.

24.2. Co-inmunoprecipitación de proteínas

Con el fin de evaluar la interacción de GK y GGRP en tanicitos, cultivos primarios de estas células fueron incubados en distintas concentraciones de glucosa y luego los complejos formados fueron inmunoprecipitados con un anticuerpo anti-GK. Para esto, los cultivos de tanicitos fueron lisados con un tampón suave compuesto de 0.5% NP-40, 10 mM HEPES pH 7.9, 1 mM DTT, 100 mM NaCl e inhibidor completo de proteasas (Roche), removiendo las células del plástico usando un *scraper*. Se homogenizaron las células lisadas y se rescató el sobrenadante proteico mediante centrifugación a 2000g por 5 min a 4°C. 1 mg de proteínas totales fueron utilizadas para incubar con anticuerpo anti-GK (positivo), IgG normal (control) e incubación sin anticuerpo (negativo). Para esto, los lisados fueron previamente clarificados, incubándolos con resina proteína A-agarosa durante 2 h a 4°C. Luego, 300 µg de cada lisado preclareado fueron incubados con cada uno de los anticuerpos antes descritos (1 µg c/u), en rotación durante 4 h y a 4 °C. Finalmente, la inmunoprecipitación se llevó a cabo incubando los complejos unidos a anticuerpos con 40 µL de resina nueva y equilibrada, en rotación durante 4 h a 4°C. Se lavó cuidadosamente la resina unida a los complejos y se denaturaron las proteínas a 65°C para su posterior análisis mediante *western blot*.

25. Determinación de ondas de calcio en rebanadas de hipotálamo

Con el fin de determinar la respuesta hipotalámica a glucosa, se evaluó en rebanadas coronales de hipotálamo de ratón (300 µm) la generación de ondas de calcio, las que fueron determinadas por su unión a la sonda de calcio Fluo4. Para esto, las rebanadas fueron pre-incubadas con 15 µM de Fluo4 en oscuridad

durante 15 min y luego equilibradas con LCRa 5 mM glucosa durante 15 min adicionales. Al cabo de este tiempo, las rebanadas fueron incubadas durante 8 min con 0.5 o 10 mM glucosa, ensayando la reversión de la respuesta con LCRa 5 mM glucosa. Se cuantificó el aumento en la intensidad de fluorescencia sobre la fluorescencia basal ($\Delta F/F_0$) utilizando el software Igor5.

26. Medición de actividad de neuronas POMC mediante Current-clamp de célula completa

Se prepararon rebanadas de hipotálamo de ratones POMC-EGFP (Catálogo Jax #009593) en LCRa oxigenado y frío conteniendo baja concentración de Ca^{2+} (0.5 mM) y alta concentración de Mg^{2+} . Secciones de 250 μm fueron mantenidas por 30 min a 35°C en LCRa normal (125 mM NaCl, 26 mM $NaHCO_3$, 1.25 mM NaH_2PO_4 , 2.5 mM KCl, 2 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM mioinositol, 0.4 mM ácido ascórbico, 2 mM piruvato de sodio y 0.5 mM glucosa) continuamente oxigenada (95% O_2 - 5% CO_2), lo cual produce un pH de 7.4 y una osmolaridad de 305 mOs) hasta iniciar los registros.

Las neuronas POMC fueron identificadas en base a la fluorescencia de EGFP, visualizadas usando un microscopio Olympus BX51W1 y registradas usando un amplificador dual EPC10 (HEKA) en modo *current-clamp*. La estimulación eléctrica y los registros fueron realizados utilizando el software PatchMaster. Los experimentos fueron realizados a temperatura ambiente con una velocidad de perfusión de 2-3 mL/min y utilizando pipetas de *patch* corrientes (4–8 M Ω), evaluando la actividad neuronal en respuesta a 15 mM glucosa, 15 mM L-lactato, 2 mM β HB y 2 mM 4-OH-cinamato (4-CIN).

27. Determinación de la capacidad cetogénica en tanicitos

Para estos fines, cultivos primarios de tanicitos (5×10^6 cels.) fueron cultivados en placas de 6 pocillos durante 4 horas en medio DMEM sin glucosa y sin rojo fenol (Thermo Fisher cat # A1443001) suplementado con ITS (1.72 μ M insulina, 0.07 μ M transferrina y 0.04 μ M Na_2SeO_3), 2 mM glutamina, 0.15 mM palmitato de sodio y 5 mM glucosa. Al cabo de este tiempo, las células fueron incubadas durante 4 h adicionales en el mismo medio anterior pero suplementado con distintos estímulos, tales como distintas concentraciones de glucosa, 0.5 mM AICAR (activador de AMPK), 0.25 mM compuesto C (inhibidor de AMPK) o los vehículos como controles. Cuando se evaluó el efecto de la sobreexpresión de GKRP sobre la tasa cetogénica, las células fueron previamente transducidas durante 72 h con 5×10^7 ifu/mL de cada virus. Como controles celulares de utilizaron las líneas H4 (derivada de hepatocarcinoma) y 832-13, de las cuales se conoce que liberan o no, respectivamente, cuerpos cetónicos cuando son incubadas con ácidos grasos. Además, utilizamos cultivos primarios de astrocitos como control glial de cetogénesis. La producción de β HB fue analizada mediante un kit colorimétrico que involucra la oxidación de β HB y la generación de formazán (β -Hydroxybutyrate (Ketone Body) Colorimetric Assay Kit, Cayman Chemical), siguiendo las instrucciones del fabricante.

IV RESULTADOS

1. Estandarización del uso de los adenovirus generados

Con el fin de evaluar los tiempos óptimos de utilización de cada uno de los adenovirus generados (AdshGKRP-EGFP y AdGKRP-Venus), se transdujeron cultivos primarios de tanicitos y se fijaron luego de 48, 72 y 96 h post transducción para analizar mediante microscopia confocal la tasa de transducción viral (**Fig. 5A-I**). Como control de infección viral se utilizó el virus Adsh β gal-EGFP (SHB), el cual porta un shARN contra una proteína bacteriana. Al cuantificar la tasa de transducción, expresada como porcentaje de células con intensidad de fluorescencia de reportero superior al 20% del nivel máximo de infección generado, se puede observar que desde las 72 h post infección se alcanzaron niveles de transducción superiores al 90% para los 3 adenovirus utilizados (**Fig. 5J**). Mediante exclusión de azul de tripán se analizó el porcentaje de viabilidad celular luego de los mismos tiempos de transducción. Los resultados no muestran diferencias significativas luego de 48 y 72 h post transducción, alcanzando valores de viabilidad cercanos al 80% (**Fig. 5K**). Sin embargo, luego de 96 h la muerte celular siempre superó el 20%, alcanzando un 40% para el virus SHG. Dados estos antecedentes, se escogió 72 h como tiempo óptimo de transducción en tanicitos, dada las altas tasas de transducción y sobrevivencia alcanzadas. Para reducir el número de animales utilizados y con el fin de entregar antecedentes que el adenovirus (OEG) permite la sobreexpresión de GKRP, utilizamos una línea celular que no expresa esta proteína, pero si la enzima GK, la que es inhibida por GKRP.

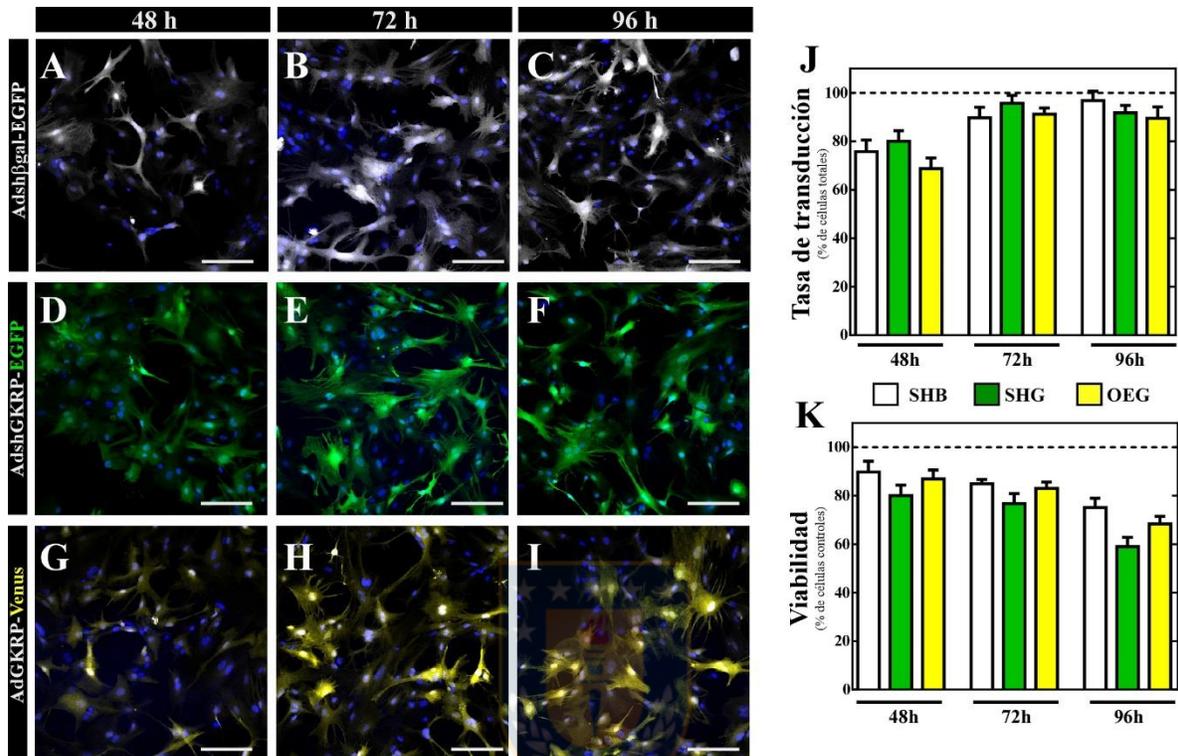


Figura 5: Estandarización del tiempo óptimo de transducción adenoviral. A-J: Cultivos primarios de tanicitos fueron transducidos con 5×10^7 ifu/mL de los virus Adsh β gal-EGFP (SHB), AdshGKRP-EGFP (SHG) y AdGKRP-Venus (OEG) durante 48, 72 y 96 h. Luego de cada tiempo, las células fueron fijadas con 4% PFA y procesadas para microscopía confocal, utilizando Hoechst como tinción nuclear. Barra: 50 μ m. **K:** Porcentaje de viabilidad celular evaluada mediante exclusión con azul de tripan. Se consideraron como positivas aquellas células que poseían una intensidad de fluorescencia de reportero superior al 20% del nivel máximo. N=3

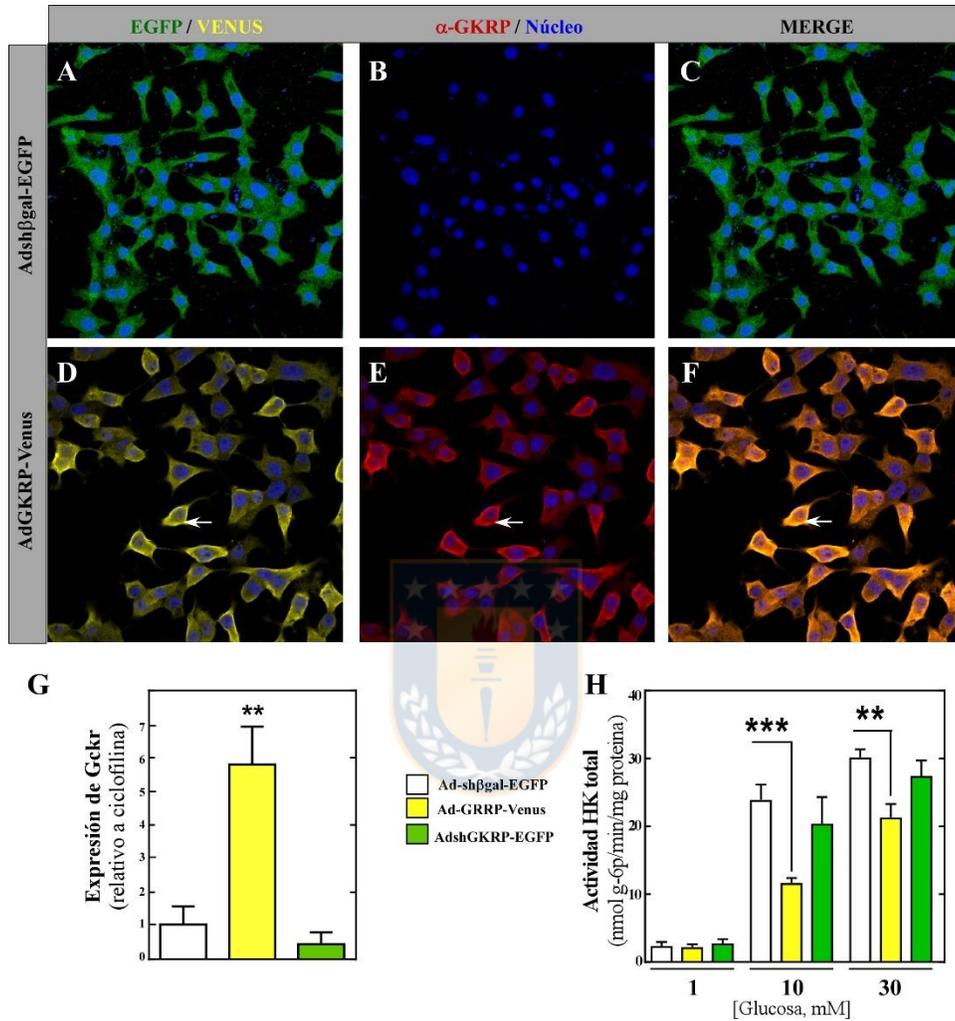


Figura 6: Efecto funcional de los virus generados. Células 832-13 fueron transducidas con 5×10^7 ifu/mL de cada virus durante 72 h y luego procesadas para microscopia confocal (A-F), extracción de ARN y cuantificación mediante RT-qPCR (B) y determinación de la actividad HK (C). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. $n = 6$

Para ello, se transdujeron células 832-13 con 5×10^7 ifu/mL de este virus y con la misma concentración del virus control (SHB) durante 72 h. Mediante microscopia confocal se corroboró que estas células no expresan GKRP (**Fig. 6B**). Cuando se usó el virus OEG, la tinción del reportero Venus (**Fig. 6D**) presenta un alto grado de colocalización con el inmunomarcaje de GKRP (**Fig. 6E-F**), alcanzando un coeficiente de Pearson de 0.87. A nivel de mensajero, la transducción con OEG logra una sobreexpresión de *Gckr* de cerca de 6 veces, mientras que la transducción con SHG no generó cambios significativos respecto a la condición control (**Fig. 6G**). Dado que GKRP se reconoce como un inhibidor competitivo de GK, células 832-13 se transdujeron con los virus SHB, SHG y OEG durante 72 h, se extrajeron proteínas y se evaluó la actividad hexoquinasa total en cada lisado a distintas concentraciones de glucosa, con el fin de distinguir la actividad de las HKs I-III ($K_m < 1$ mM) de la actividad GK ($K_m \sim 10$ mM). Como muestra la **Figura 6H**, a 1 mM de glucosa no existe diferencia entre las distintas condiciones evaluadas mientras que a 10 mM de glucosa se produjo una inhibición altamente significativa en la actividad HK cuando las células fueron transducidas con OEG (barra amarilla). Dado que a esta concentración de glucosa las HKs I-III se encuentran saturadas, la tasa de fosforilación de glucosa puede ser atribuida completamente a GK. La transducción con SHG no generó cambios significativos en la actividad HK respecto a la condición control (SHB). Este último hecho sumado a la nula expresión de GKRP en estas células (**Fig. 6B**), confirma los reportes que indican que en células β -pancreáticas GKRP no posee un rol funcional en el metabolismo de glucosa, dado que su silenciamiento no afecta la actividad GK (**Fig. 6H**).

Dado que de aquí en adelante estos virus se utilizarán para transducir tanicitos (*in vitro* e *in vivo*), se realizó una caracterización del efecto funcional de ellos en cultivos primarios de tanicitos cultivados a 5 mM de glucosa. Los resultados muestran que la transducción con el virus SHG permite una inhibición significativa (~68%) de la expresión de *Gckr* (**Fig. 7A**, barra verde), mientras que no afecta significativamente la expresión de *Gck* (**Fig. 7B**, barra verde). Dada la relevancia de GLUT2 en los tejidos glucosensores, se evaluó el efecto del silenciamiento de *Gckr* sobre la expresión de los mensajeros de GLUT2 (*Slc2a2*) y de la isoforma $\alpha 2$ de AMPK ($\alpha 2$ AMPK). De manera interesante, el virus SHG induce un incremento significativo en los mensajeros de ambas proteínas en estos cultivos. Por otra parte, la transducción con el virus OEG induce un incremento altamente significativo en la expresión de *Gckr*, aumentando casi 40 veces (**Fig. 7A**, barra amarilla), mientras que la expresión de *Gck* tiende a aumentar sin existir un cambio significativo (**Fig. 7B**, barra amarilla). Ni la expresión de *Slc2a2* ni de *Prkaa2* se ven afectadas por la transducción con el virus OEG (**Fig. 7C-D**). Con el fin de verificar el poder de silenciamiento del virus SHG, se transdujeron tanicitos con la misma concentración de los virus OEG y SHG. Los resultados muestran una inhibición significativa, aunque no completa, de la sobreexpresión alcanzada con el virus OEG (**Fig. 7A**, barra amarilla achurada).

A nivel proteico, los cultivos primarios de tanicitos mostraron resultados muy similares a los obtenidos por qPCR. El virus SHG induce un silenciamiento drástico de GKRP, en un 75% de la situación control (**Fig. 8A, F**), mientras que incrementa en un 50% la expresión de GLUT2 (**Fig. 8C, F**). Por su parte, el virus OEG lleva a

un aumento de cerca de 6 veces de la expresión de GGRP, sin afectar la expresión de GK (**Fig. 8B, F**) ni de GLUT2 (**Fig. 8C, F**). GFP se evaluó para demostrar la tasa de transducción adenoviral, siendo homogénea en la mayoría de los casos considerando que la afinidad entre el anticuerpo anti-GFP y Venus no es perfecta. La co-transducción OEG-SHB indujo un nivel proteico de GGRP incluso menor a la condición control, mostrando que al menos a nivel proteico, el virus SHG es capaz de inhibir la sobreexpresión mediada por el virus OEG (**Fig. 8E, J**).

2. Modulación de la expresión de GGRP en ratas adultas

Luego de demostrada la funcionalidad de los adenovirus generados *in vitro*, se inyectó cada uno de ellos al 3V de ratas adultas y luego de 72 h de transducción se procesaron para inmunohistoquímica, RT-qPCR o *western blots*. Mediante microscopia confocal se pudo observar un alto tropismo de este serotipo viral con las células endimarias, incluyendo tanicitos, lo que se ve reflejado por la alta colocalización de cada proteína reportera (EGFP y Venus) con el marcador de tanicitos vimentina (**Fig. 9C, I**). Mediante un análisis exhaustivo de las imágenes obtenidas, no se detectaron células positivas para EGFP o Venus que fueran además positivas para GFAP o NeuN, indicando que la transducción fue altamente selectiva para tanicitos, sin afectar astrocitos o neuronas, respectivamente.

Al igual como ocurre *in vitro*, la inyección icv del virus OEG permitió una alta sobreexpresión de GGRP respecto a los animales controles, (**Fig. 9M-Ñ, OEG**), llevando a una sobreexpresión del ARNm de 22 veces y de 6 veces a nivel proteico. Por su parte, la inyección del virus SHG permitió un 60% de inhibición a nivel de mensajero (**Fig. 9M**, barra verde) y un ~40% a nivel de proteína (**Fig. 9N-Ñ**).

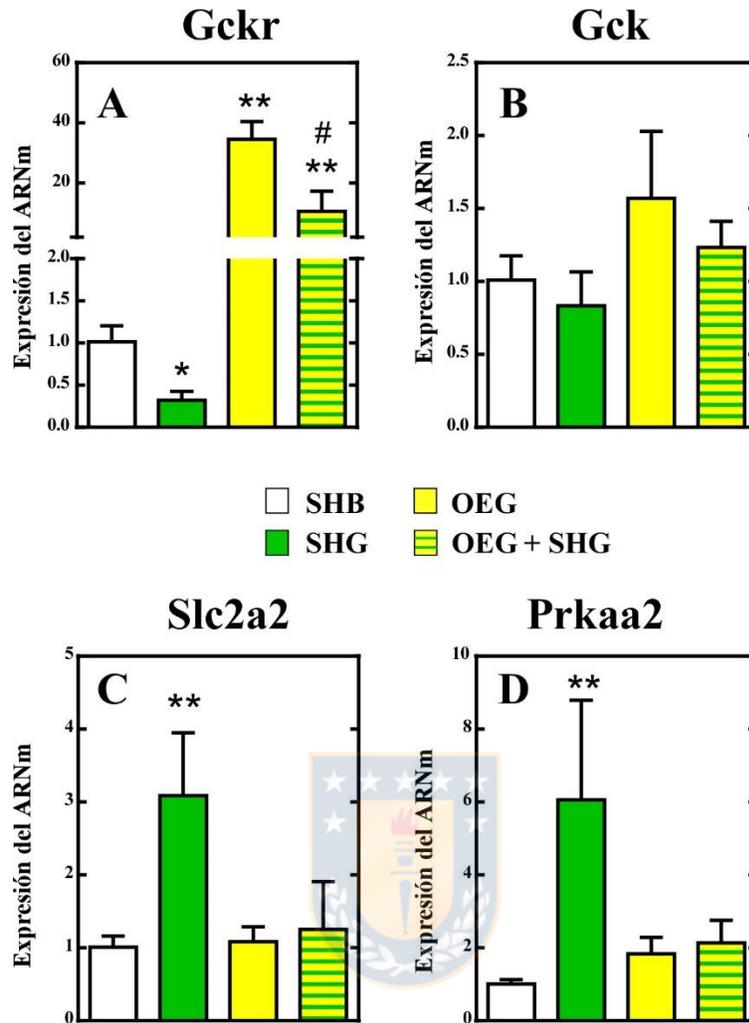


Figura 7: Efecto de la inhibición y sobreexpresión de GGRP sobre la expresión de los mensajeros de GGRP, GK, GLUT2 y α 2AMPK en tanicitos.

Cultivos primarios de tanicitos fueron transducidos con 5×10^7 ifu/mL de cada virus durante 72 h y luego procesados para extraer ARN total, realizar transcripción reversa y evaluar el nivel de expresión de *Gckr*, *Gck*, *Slc2a2* y *Prkaa2* mediante qPCR. El nivel de expresión de cada gen se normalizó respecto a ciclofilina y a la condición control (SHB). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, # $p < 0.05$ OEG vs OEG+SHG. n=5.

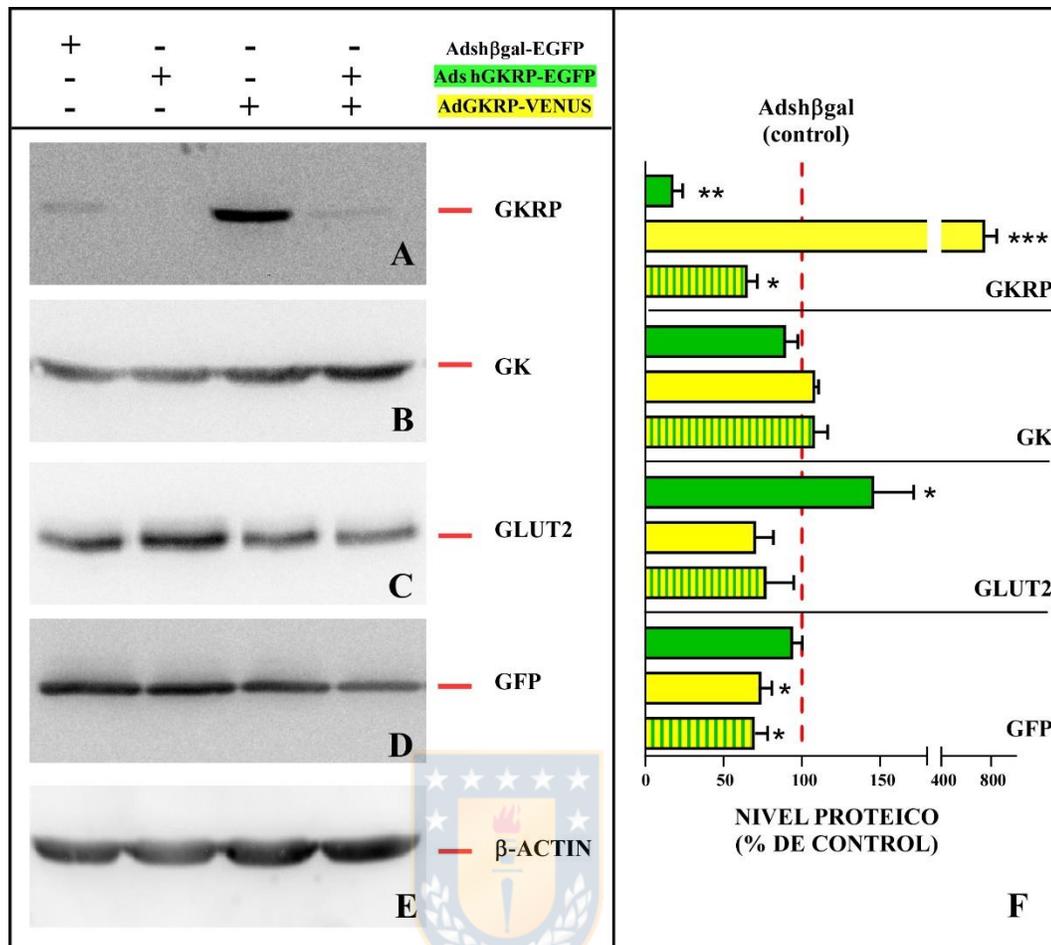


Figura 8: Los adenovirus generados inhiben o sobreexpresan eficientemente GKR en tanicitos, afectando la expresión de otras proteínas involucradas en el glucosensing. Cultivos primarios de tanicitos fueron transducidos con 5×10^7 ifu/mL de cada virus (SHB, SHG o OEG) durante 72 h y luego procesadas para *western blot*. El análisis densitométrico de la intensidad de banda de GKR (A, 69 kDa), GK (B, 52 kDa), GLUT2 (C, 58 kDa), GFP (D, 27 kDa) y β-actina (E, 43 kDa) fueron utilizadas para graficar el nivel proteico relativo a actina en cada condición (F). Cada valor se normalizó a la expresión de actina en cada condición y como porcentaje de la condición control (SHB). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. n=4.

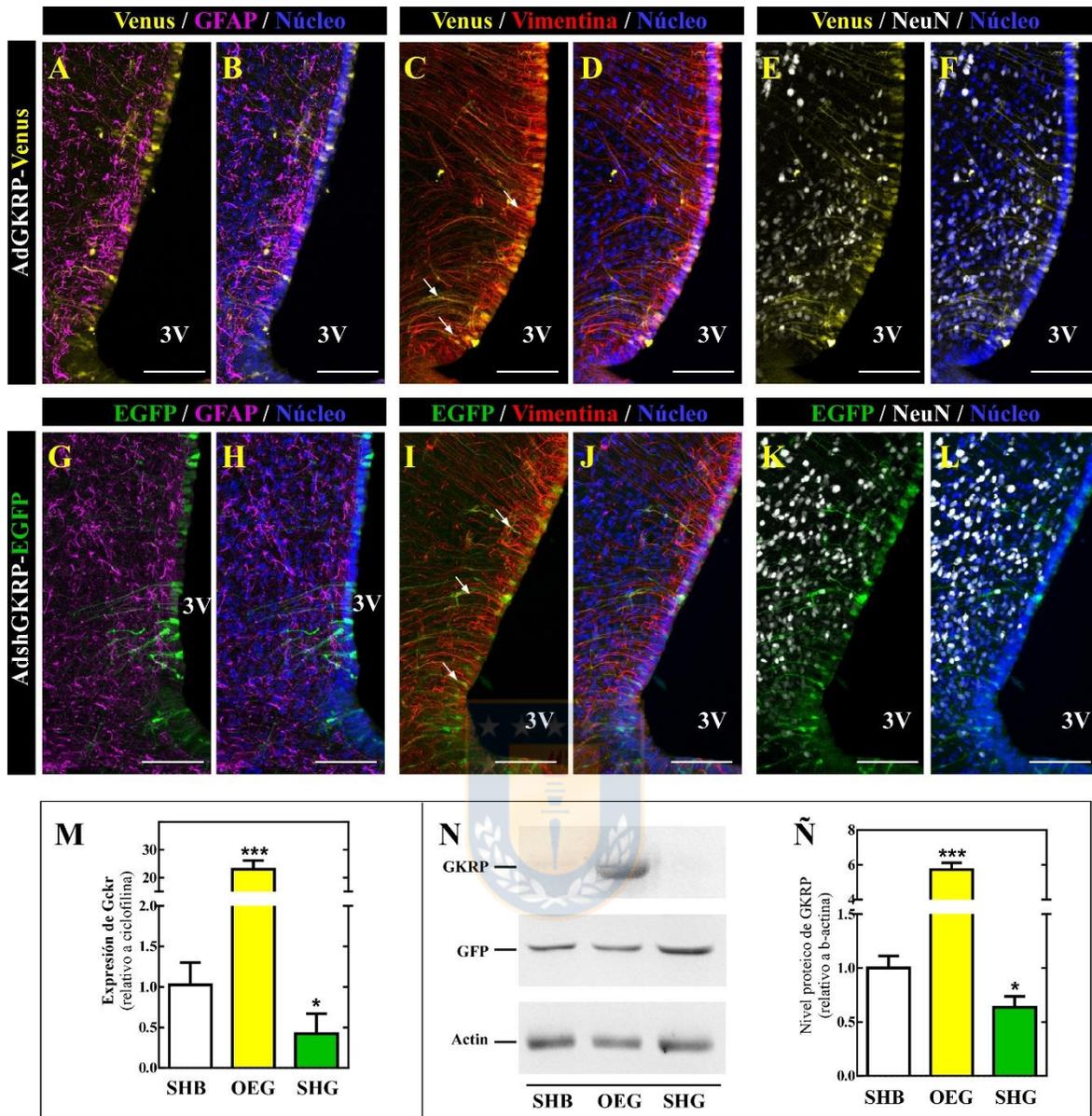


Figura 9: Ambos adenovirus transducen solo la pared ventricular, generando el efecto esperado en el hipotálamo basal. Ratas adultas fueron estereotáxicamente canuladas e inyectadas con 20 μ L de cada virus, para luego ser procesadas mediante inmunohistoquímica (A-L, n=3), RT-qPCR (M, n=4) o western blot (N, n=4). Barra: 150 μ m. Ñ: Cuantificación densitométrica de la intensidad de cada banda de GKR respecto a actina y respecto a la condición control. * p <0.05 vs SHB, *** p <0.001 vs SHB.

3. Perfil de expresión de neuropéptidos hipotalámicos en respuesta a glucosa

Nuestro grupo de investigación y otros (Bady *et al.* 2006; Elizondo-Vega *et al.* 2016) hemos demostrado que luego de 2 h de una inyección icv de glucosa es posible detectar cambios en el perfil de expresión de neuropéptidos hipotalámicos, lo que representa una respuesta compensatoria a la secreción de las proteínas respectivas. Para conocer si el nivel de expresión de GGRP en tanicitos afecta estos parámetros, ratas macho adultas fueron transducidas con los virus SHB, SHG u OEG durante 72h para finalmente inyectar 10 μ L de glucosa 50 mM en el 3V basal, como muestra el esquema (**Fig. 10A**). En primer lugar, se evaluó si el protocolo efectuado induce un cambio *per se* en la expresión de GGRP o GK. Los resultados muestran que no existen diferencias entre la condición ayunada y realimentada (**Fig. 10B-C**), como era de esperar para proteínas que no se secretan. Cabe destacar que, a diferencia de lo observado en cultivo primario de tanicitos, la inyección del virus OEG icv en ratas ayunadas por 48 h generó un aumento significativo en la expresión de *Gck*, aumentando al doble del grupo control (**Fig. 10C**, barra amarilla versus barra gris, no achuradas).

En los animales controles (SHB) se obtuvo la respuesta esperada al aumento de la concentración de glucosa icv. Los neuropéptidos que inducen hambre tienen altos niveles de expresión en ayuno los que caen significativamente en respuesta a glucosa icv, 56% de caída para NPY (**Fig. 11A**) y un 44% para AgRP (**Fig. 11B**). Los neuropéptidos que inducen saciedad presentan un comportamiento opuesto, bajos niveles en ayuno y un aumento significativo en respuesta a glucosa (2.5 veces de aumento para *Pomc* y 7.2 veces para *Cartpt*, **Fig. 11C-D**, barras grises).

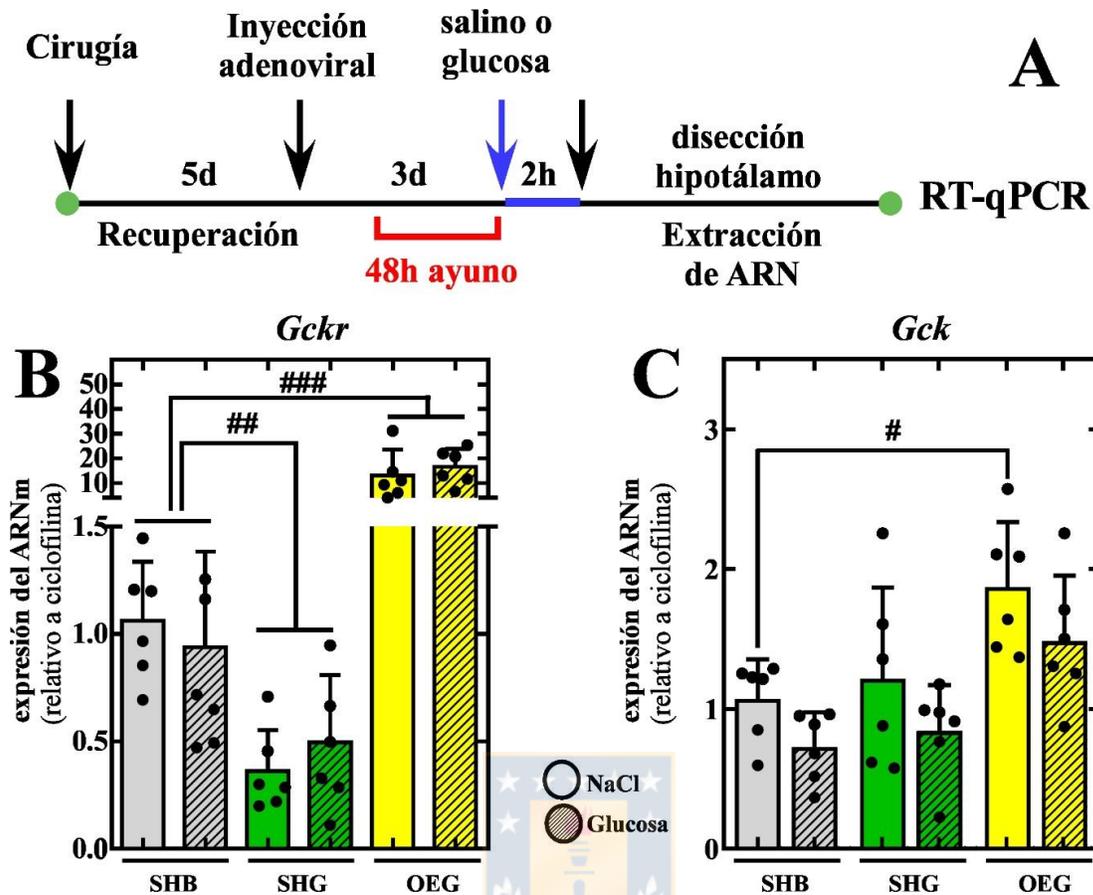


Figura 10: Efecto sobre la expresión de GK y GKR del protocolo usado para evaluar neuropéptidos en respuesta a glucosa. A. Esquema experimental del protocolo para determinar el perfil de expresión de neuropéptidos hipotalámicos en respuesta a glucosa. Luego de los 3 días de transducción viral, los animales fueron inyectados icv con 10 μ L de NaCl 0.9% o 10 μ L de glucosa 50 mM, esperando alcanzar una hiperglucorraquia. **B.** Expresión del mensajero de GKR en respuesta a glucosa y a la inyección icv de SHB, SHG u OEG. **C.** Expresión del mensajero de GK en respuesta a glucosa y a la inyección icv de SHB, SHG u OEG. N=6 por condición. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$.

De manera interesante, una evaluación general de los niveles de expresión de neuropéptidos orexigénicos y anorexigénicos evidencia una falta de respuesta al incremento de glucosa icv, tanto en animales knock down (KD) para GGRP como en aquellos que la sobreexpresan (**Fig. 11**). Un análisis más detallado en los animales KD (SHG), muestra que en la condición de ayuno la expresión de neuropéptidos orexigénicos es significativamente menor que en el grupo control (**Fig. 11A-B**, barras verdes y plomas no achuradas). Para ambos neuropéptidos, la expresión del ARNm fue comparable a la obtenida luego de la inyección de glucosa en animales controles. Este resultado sugiere que la expresión de GGRP en tanicitos podría tener una función relevante en la inducción de hambre.

Con relación a neuropéptidos anorexigénicos, se observó que ambos mostraron un nivel de expresión significativamente mayor al presentado en animales controles aun en ayuno (**Fig. 11C**, barras grises y verdes no achuradas). De los 4 neuropéptidos analizados, solo *Cartpt* incrementó significativamente en respuesta a glucosa en las ratas KD para GGRP, sin embargo, previo a la inyección de glucosa los animales ayunados presentaron un nivel significativamente mayor de este mensajero que los animales controles (**Fig. 11D**, barra gris y verde, no achuradas).

Adicionalmente, cuando se sobreexpresó GGRP en tanicitos se generaron desregulaciones relevantes en la respuesta hipotalámica al ayuno y a glucosa. En ayuno, sólo los niveles del ARNm de AgRP fueron significativamente menores que en los animales controles (**Fig. 11B**, barra gris vs barra amarilla), sin presentar diferencias con el grupo inyectado con glucosa (**Fig. 11B**, barras amarillas), tal como ocurre para *Npy* (**Fig. 11A**, barras amarillas).

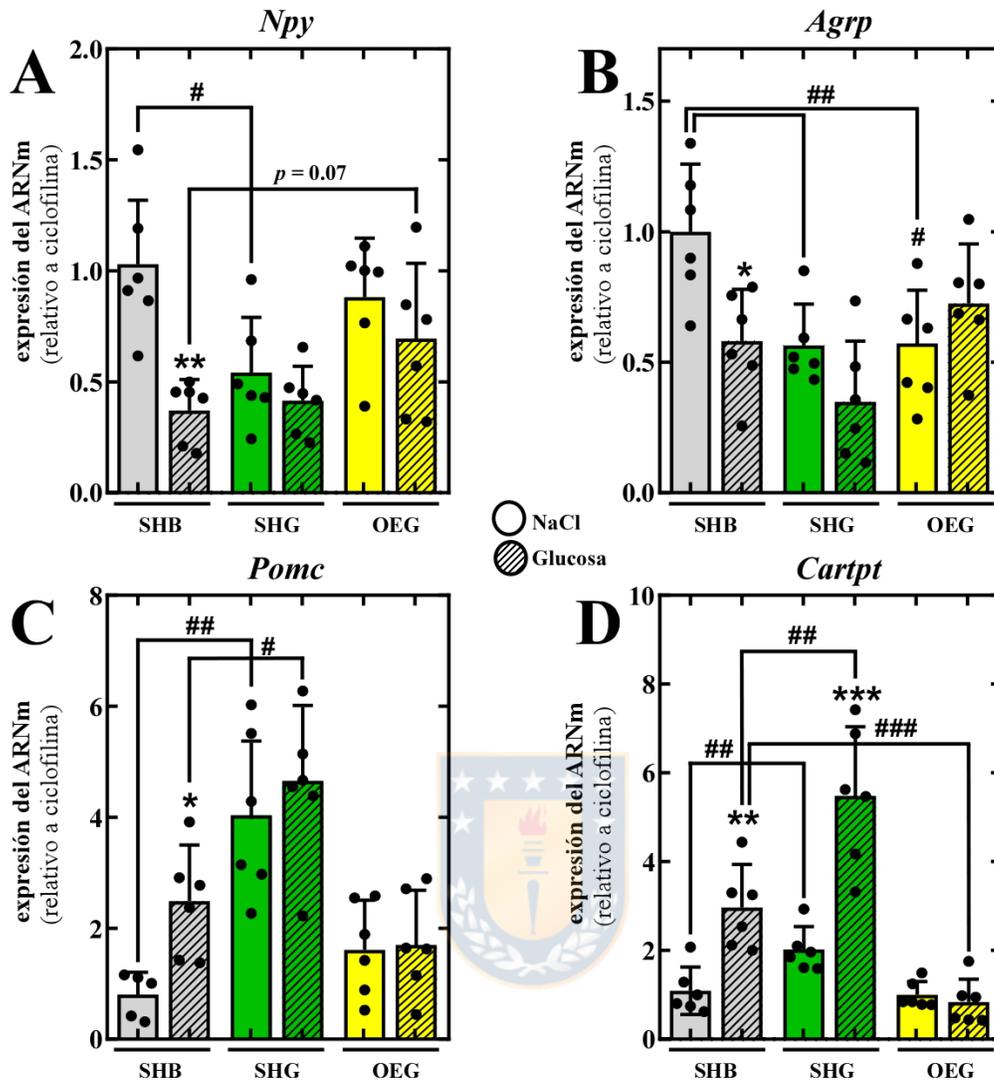


Figura 11: Perfil de expresión de neuropéptidos, en respuesta a glucosa en ratas con pérdida y ganancia de función de GGRP. Según el protocolo de la figura 6A, se evaluó en ratas ayunadas la expresión de los mensajeros de NPY (A), AgRP (B), POMC (C) y CART (D) luego de 2 h de inyección de salino o glucosa. Las barras achuradas corresponden a ratas a las que se les inyectó glucosa luego del periodo de ayuno. N=6 por condición. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.01$, inyección de salino versus glucosa. # representa un valor equivalente de p , comparando salino o glucosa respecto a la misma condición en el grupo control.

Respecto a los neuropéptidos anorexigénicos, queda de manifiesto que no responden al incremento de glucosa icv como los animales controles (**Fig. 11C-D**, barras amarillas), no mostrando diferencias significativas con animales controles inyectados con salino (**Fig. 11C-D**, barras amarillas vs barra gris no achurada).

4. Cambios en el comportamiento alimenticio en animales con pérdida y ganancia de función de GKR.

Siguiendo el protocolo esquematizado en la **figura 12A**, se procedió a evaluar si estos animales sufrían alteraciones en el comportamiento alimenticio. En concordancia con lo observado en la expresión de neuropéptidos, solo se detectaron alteraciones relevantes en los animales KD. Los animales inyectados con el virus SHG presentaron una caída significativa de peso corporal en comparación a los animales controles (**Fig. 12B**, 15.4 ± 2.1 vs 9.2 ± 3.7 g, $p = 0.008$). Los animales inyectados con el virus OEG, sin embargo, no presentaron variaciones en el peso corporal respecto a los animales inyectados con el virus SHB (**Fig. 12B**, barra amarilla vs barra blanca).

Concomitante con los cambios señalados en el peso corporal, las ratas inyectadas con el virus SHG presentaron una disminución significativa en la ingesta alimenticia acumulada, consumiendo en promedio casi la mitad del alimento ingerido por los animales controles (**Fig. 12C**, 20.9 ± 2.9 vs 11.2 ± 4.8 g, $p = 0.002$). Al igual como ocurre con el peso corporal, la ingesta alimenticia de los animales OEG no presentó cambios en relación con los animales controles, a pesar de una leve tendencia al aumento (**Fig. 12C**, barra amarilla vs barra blanca, $p = 0.111$).

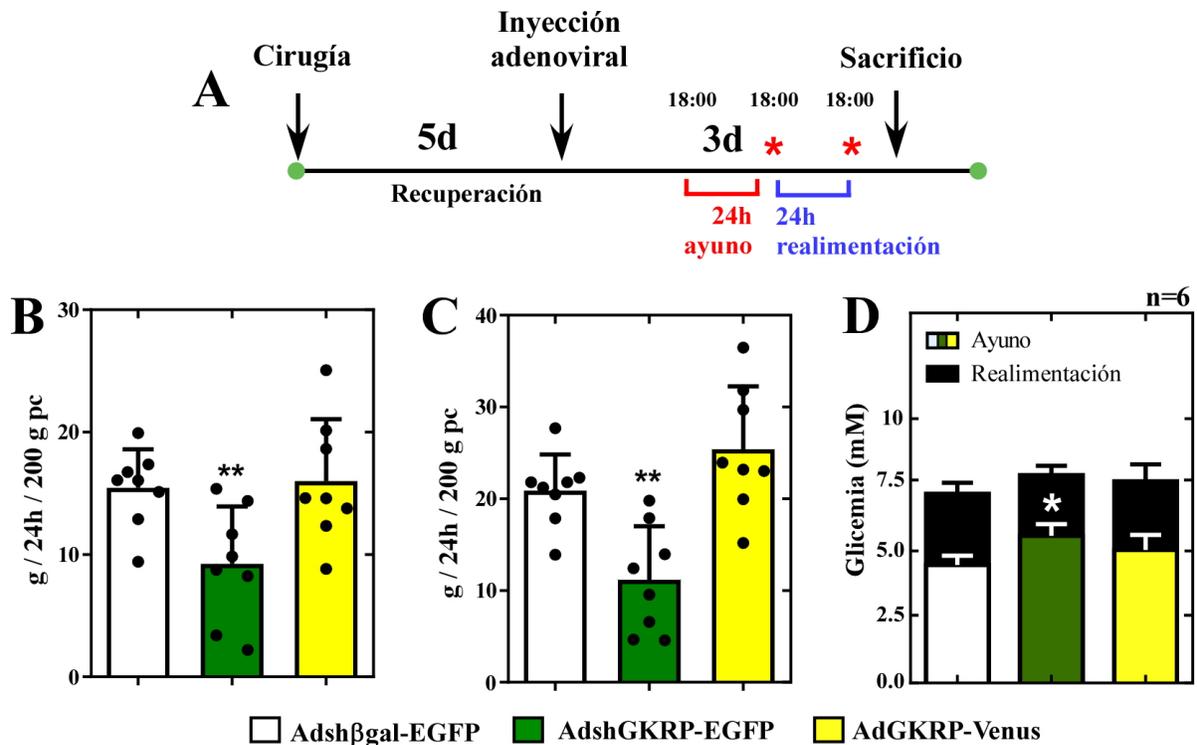


Figura 12: Rol de GKRPs en la macroestructura de la alimentación en ratas. A. Protocolo de manejo de los animales de experimentación. Las ratas fueron estereotáxicamente canuladas al 3V basal con el fin de inyectar cada virus (8 SHB, 7 SHG y 6 OEG) luego de 5 días de recuperación. Luego de 2 días, las ratas fueron sometidas a un ayuno de 24 h, periodo de tiempo al cabo del cual se les ofrecieron 40 g de alimento por 24 h adicionales. Los animales fueron pesados antes y después del periodo de realimentación (asteriscos). B. Cambio en el peso corporal durante el periodo de realimentación, normalizado por cada 200 g de peso corporal inicial. C. Ingesta alimenticia acumulada de cada animal por cada 200 g de peso inicial. D. Glucemia de los animales antes (barras blancas) y después (barras negras) de la realimentación en animales SHB, SHG y OEG. N=8 por condición en B y C. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Con el fin de evaluar si la modificación del nivel de expresión de GKRP en tanicitos afecta el metabolismo periférico de glucosa, se midió la glicemia de estos animales antes y después del periodo de realimentación. Los resultados muestran que los animales inyectados con el virus SHG presentan una glicemia post ayuno mayor que los animales controles (4.5 vs 5.6 mM, $p=0.029$), mientras que los animales inyectados con el virus OEG no presentan diferencias significativas en este parámetro en relación con el grupo control (**Fig. 12D**, barras coloreadas). Luego de las 24 h de realimentación, la glicemia alcanzada fue la misma para los 3 grupos de animales evaluados.

Un análisis más detallado del comportamiento alimenticio de estos animales se logra, por ejemplo, determinando el número de eventos de alimentación (EA), lo que permite además calcular la duración de los intervalos inter-comidas, parámetro que se relaciona directamente con el establecimiento de la saciedad. Los resultados muestran una disminución significativa en el número de EA y de los intervalos durante las 24 h de realimentación en los animales knock down, sin presentar cambios cuando se induce la sobreexpresión de esta proteína (**Fig. 13A-B**).

Con el fin de analizar el avance en la frecuencia alimenticia (FA), se calculó el número de EA por cada 3 h de realimentación. Los resultados muestran que, entre las 9 y 12 h de realimentación (fase oscura), se presenta una disminución significativa en la FA de los animales SHG respecto al grupo control, mientras que no existen diferencias significativas entre los animales SHB y OEG (**Fig. 13C**). Sin embargo, cuando se graficó la frecuencia alimenticia por cada h, durante las

primeras 3 h de realimentación, los animales OEG presentaron una mayor frecuencia de ingesta, lo que puede interpretarse como una mayor avidez alimenticia al inicio del periodo de realimentación (**Fig. 13D**). Aun cuando los animales SHG presentan una caída significativa en la FA en la segunda hora de realimentación, esta caída se hace sostenida y significativa solo después de 9 h, como se adelantó en la **figura 13C**.

Posteriormente, realizamos una evaluación de los principales parámetros de la microestructura de la alimentación; como las cajas de alimentación que disponemos no nos permiten cuantificar el alimento consumido en cada EA, los valores que se entregan son los promedios por animal de los valores obtenidos durante las 24 h. El tiempo que tardan los animales en realizar la primera comida (latencia) fue significativamente mayor en los animales KD respecto al grupo control, mientras que la duración de esta primera comida fue menor (**Fig. 14A-B**). A pesar de que los animales inyectados con el virus OEG presentan una latencia equivalente al grupo control (**Fig. 14A**, barra amarilla vs barra blanca), la duración de la primera comida fue significativamente mayor (**Fig. 14B**), reforzando la mayor avidez alimenticia de este grupo de animales. Sin embargo, tanto el tamaño como la duración promedio de las comidas de las ratas OEG no fue distinta al del grupo control (**Fig. 14C-D**), indicando que la sobreexpresión de GKRP sólo afecta el inicio del periodo de realimentación, particularmente la primera comida.

En las ratas KD el tamaño promedio de las comidas fue significativamente menor que en el grupo control (**Fig. 14C**), sin afectar el tiempo promedio que pasan en el comedero (**Fig. 14D**), lo que se relaciona directamente con la menor velocidad de

alimentación que muestran (**Fig. 14E**). Sumado a esto, los animales KD presentaron una duración promedio de intervalos significativamente mayor que el grupo control, sugiriendo que, tras cada EA, la saciedad se establece más rápidamente (**Fig. 14F**). Por otro parte, la sobreexpresión de GKRP no afectó significativamente los parámetros de macroestructura de la ingesta, sin embargo, cabe destacar que la duración y el tamaño de las comidas mostraron una tendencia al aumento (**Fig. 14B- C**). Tampoco fue posible observar cambios en el número ni la duración de los intervalos de alimentación (**Fig. 14E**, barra amarilla vs barra blanca), dando como resultado una velocidad de alimentación idéntica al grupo control (**Fig. 14F**).

Todos los parámetros de alimentación obtenidos, para los 3 grupos experimentales analizados, se resumen en la **tabla 5** que permite comparar la ganancia con la pérdida de función de GKRP. En algunos de ellos, es posible detectar efectos opuestos sobre los parámetros alimenticios, destacando que los cambios, en relación con el grupo control e inducidos por el silenciamiento de GKRP, son los que producen efectos de significancia estadística.

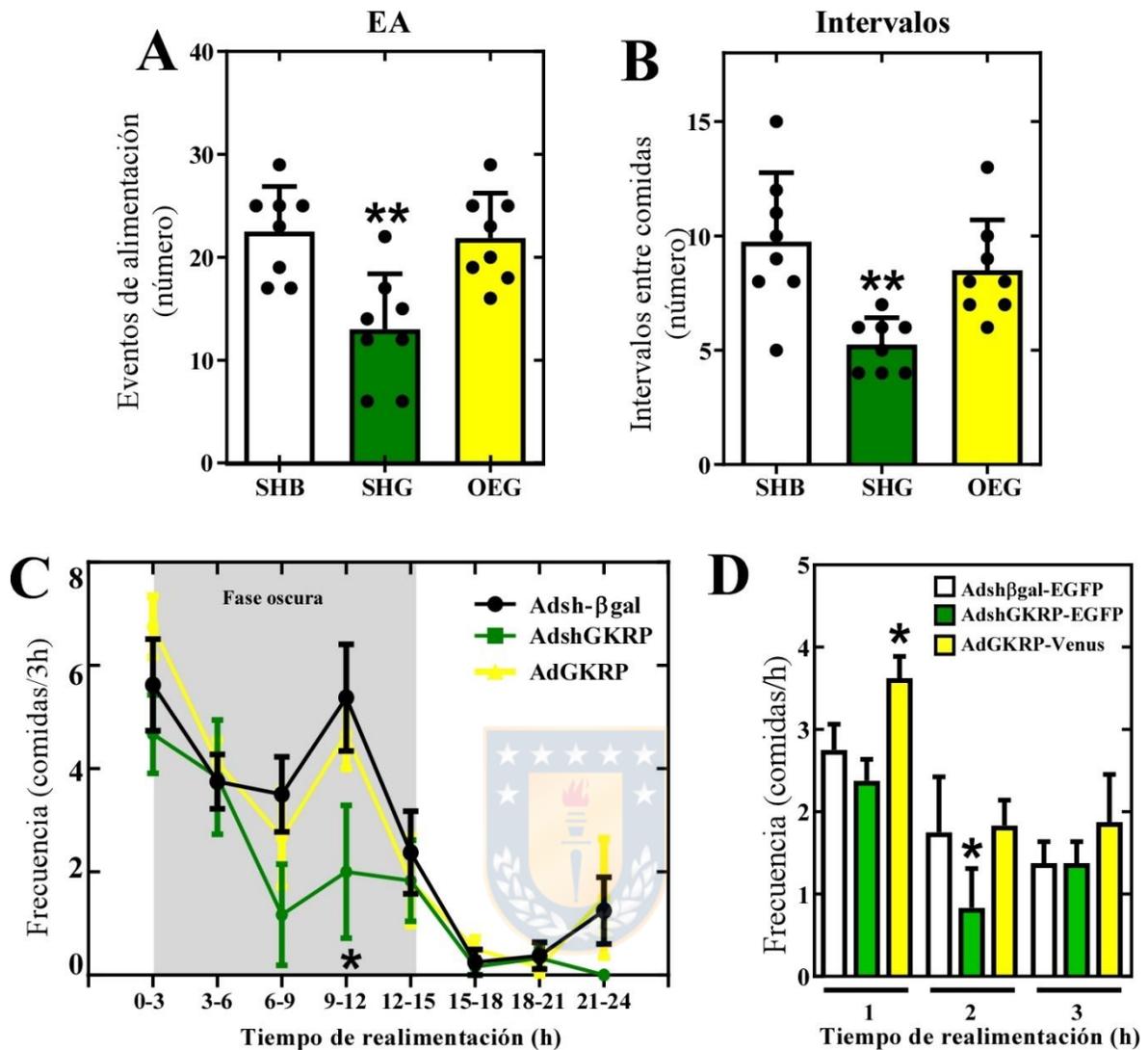


Figura 13: Perfil de alimentación en ratas con distintos niveles de GKR. A. Número de eventos de alimentación (definición en metodología) en cada grupo de animales. **B.** Número de intervalos inter-comidas en cada grupo experimental. **C.** Frecuencia de alimentación de cada grupo de animales, determinada como el número de eventos de alimentación por cada 3 h de realimentación. **D.** Frecuencia de alimentación por hora durante las primeras 3h de realimentación. n=8 por condición. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

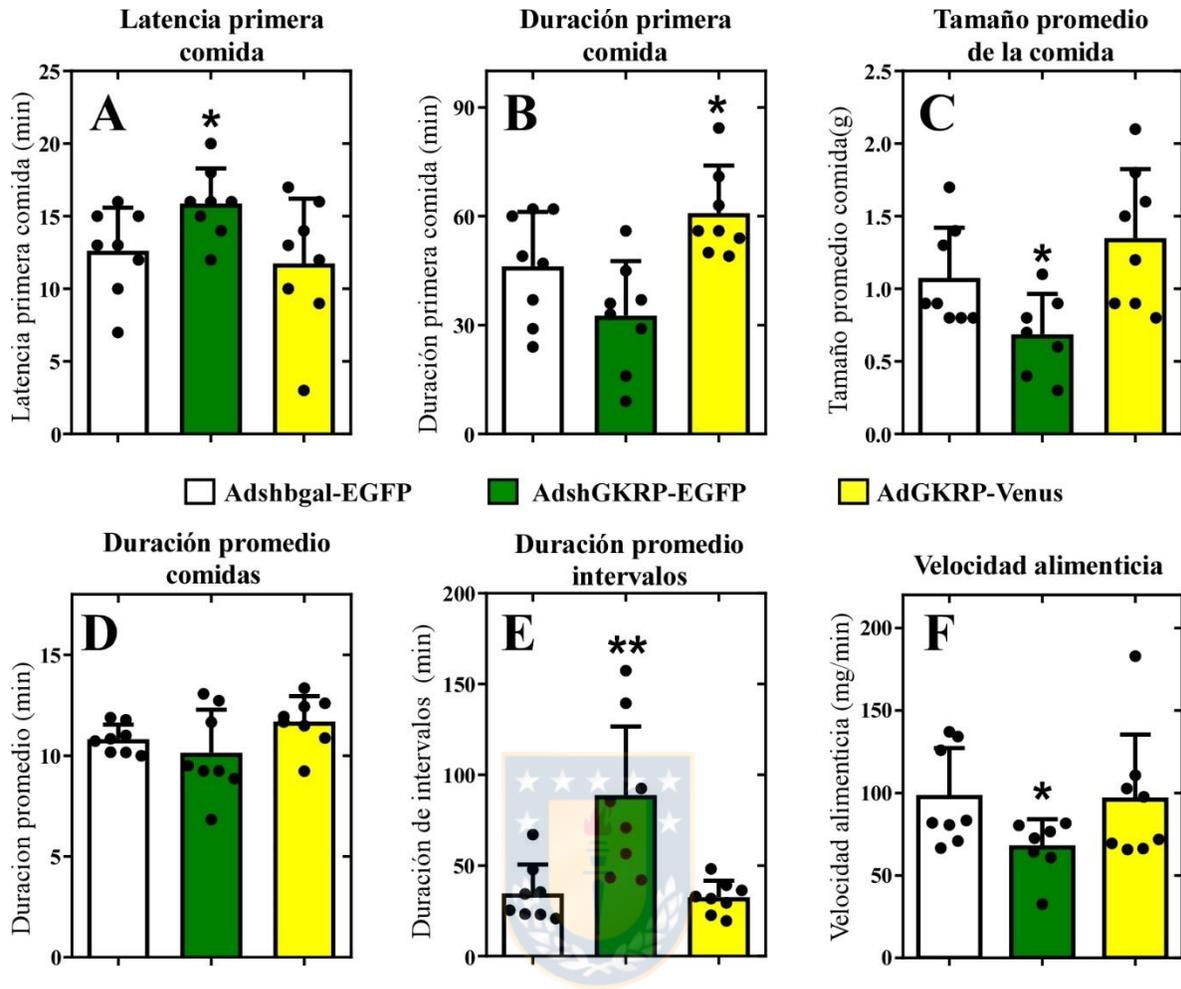


Figura 14: Microestructura de la alimentación en ratas KD y que sobreexpresan GGRP. **A.** Retardo en el inicio de la alimentación luego de presentar la comida. **B.** Duración promedio del primer evento de alimentación. **C.** Tamaño promedio de la comida, calculado como ingesta acumulada / número de eventos de alimentación. **D.** Duración promedio de cada evento de alimentación. **E.** Número de intervalos inter-comidas en cada grupo experimental. **F.** Duración promedio de los intervalos inter-comidas. N=8 por condición. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Tabla 5: Principales parámetros alimenticios de ratas inyectadas con los adenovirus Adsh β gal (SHB), AdshGKRP (SHG) y AdGKRP (OEG).

PARÁMETRO	SHB	SHG	OEG
Δ Peso corporal (g)	15.4 \pm 2.1	9.2 \pm 3.7 **	16.0 \pm 4.0
Ingesta alimenticia acumulada (g)	20.9 \pm 2.9	11.2 \pm 4.8 **	25.5 \pm 5.6
Eventos alimenticios (EA), # / 24h	22.5 \pm 4.3	13.0 \pm 5.4 *	21.9 \pm 4.3
Intervalos (Int), # / 24h	9.8 \pm 3.0	5.2 \pm 1.2 **	8.5 \pm 2.2
Duración EA (min)	10.8 \pm 0.7	10.1 \pm 2.1	11.7 \pm 1.2
Duración Int (min)	34.7 \pm 15.9	88.7 \pm 47.6 **	32.5 \pm 9.1
Latencia (min)	12.6 \pm 2.9	15.9 \pm 2.4 *	11.8 \pm 4.4
Duración 1ª comida (min)	46.3 \pm 14.9	32.6 \pm 15.0	60.9 \pm 13.0 *
Tamaño comida (g)	1.075 \pm 0.34	0.686 \pm 0.28 *	1.350 \pm 0.47
Velocidad alimentación (mg/min)	97.57 \pm 29.6	66.96 \pm 17.0 *	95.91 \pm 39.4

Promedio + desviación estándar de cada parámetro analizado. * p <0.05 respecto a grupo control; ** p <0.01 respecto a grupo control.

5. Rol de GKRP sobre la traslocación nucleocitoplasmática de GK, estudios *in vitro*

Previamente, hemos demostrado que los tanicitos expresan GKRP y que, en ellos, GK experimenta una traslocación nucleocitoplasmática opuesta a lo que ocurre en el hígado. Específicamente, utilizando inmunolocalización en cortes de rata, demostramos que en tanicitos, GK se observa en el núcleo a los 30 min de inducir hiperglicemia, mientras que, en el hígado de los mismos animales, se detecta principalmente en el citosol (Salgado *et al* 2014, Salgado *et al* 2019). Con el fin de evaluar si el nivel de expresión de GKRP afecta la dinámica de traslocación de GK, establecimos cultivos primarios de tanicitos de rata y los transdujimos con los adenovirus SHG y OEG. Como control de infección utilizamos un adenovirus que expresa solo la proteína fluorescente venus (**Fig. 15**).

En concordancia con nuestros resultados previos, los resultados muestran un aumento progresivo y significativo de la localización nuclear de GK en respuesta a un aumento extracelular de glucosa desde 0.5 a 15 mM. Debido a que los tanicitos aun en condiciones de cultivo presentan un extenso citoplasma, realizamos la cuantificación de la intensidad de fluorescencia en el núcleo y en el citoplasma y la razón núcleo- citoplasma de la intensidad de fluorescencia fue graficada en función del tiempo (**Fig. 15N**). En la figura 14A se muestra el detalle del protocolo experimental, las imágenes confocales se tomaron usando los mismos parámetros de ganancia e intensidad de fluorescencia. Al tiempo inicial, la inmunorreacción de GK (rojo) se detecta en todas las células en el citoplasma y en el núcleo como lo demuestra el doble marcaje con el marcador nuclear (**Fig. 15D**). La fluorescencia asociada a venus (amarillo) es intensa y en todas las células, evidenciando la alta

eficiencia de la transducción (**Fig. 15C**), sin embargo, la colocalización con GK es discreta, (**Fig. 15E**, naranja). La colocalización de anti-GK con el marcador nuclear Hoechst (azul), permite observar en violeta un aumento significativo de la localización nuclear de GK, a los 30 min y 60 min de incubación con glucosa 15 mM (**Fig. 15H, L**). Mediante la colocalización del reportero venus y anti-GK se distinguen las células que fueron transducidas con el adenovirus utilizado y además permite definir el citoplasma de los tanicitos, lo que fue utilizado en la cuantificación de fluorescencia empleando el *software ImageJ*. Resultados similares se obtuvieron transduciendo tanicitos en cultivo con el adenovirus Adsh β gal-EGF (datos no mostrados).

Siguiendo el mismo protocolo experimental, se transdujeron cultivos primarios de tanicitos con el virus que sobreexpresa GKRP. Al tiempo inicial, la localización de GK es evidentemente más intensa (**Fig. 16B**), con un marcado predominio nuclear (**Fig. 16D**). A diferencia de la situación control (**Fig. 15**) se detecta una alta colocalización de anti-GK con venus (**Fig. 16E**, naranja) lo que sugiere una interacción entre estas proteínas. Los resultados muestran claramente como, luego de 60 min de incubación con glucosa 15 mM, la localización nuclear de GK cae significativamente, mientras que la marca fluorescente se difunde al citoplasma de las células transducidas (**Fig. 16J, L-M**). La cuantificación de la razón núcleo-citoplasma arrojó una caída significativa en este parámetro, desde 3.08 ± 0.95 al tiempo inicial hasta 2.15 ± 0.68 luego de 60 min de incubación con glucosa (**Fig. 16N**).

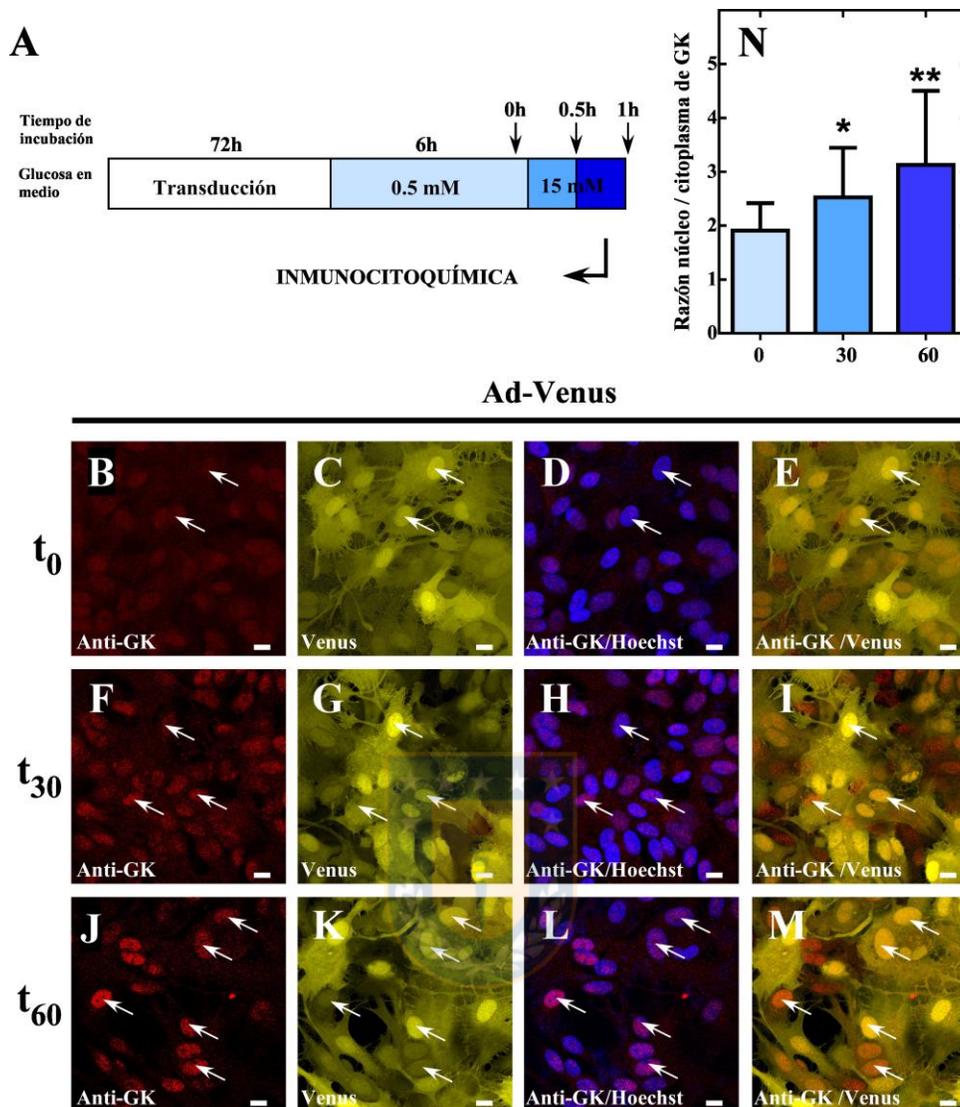


Figura 15: Aumento de localización nuclear de GK en tanicitos en respuesta a glucosa. Cultivos primarios de tanicitos se transdujeron con el virus control Ad-Venus y se procesaron según el esquema (A). **B-M:** Inmunocitoquímica anti-GK (rojo) luego de incubar los tanicitos con 15 mM glucosa durante 0 (**B-E**), 30 (**F-I**) o 60 (**J-M**) min. Como marcador nuclear se utilizó Hoechst. Las flechas indican inmunorreacción nuclear de GK. Escala: 10 μ m. N: Razón de la intensidad de fluorescencia de GK entre el núcleo y el citoplasma. N=6. * p <0.05, ** p <0.01.

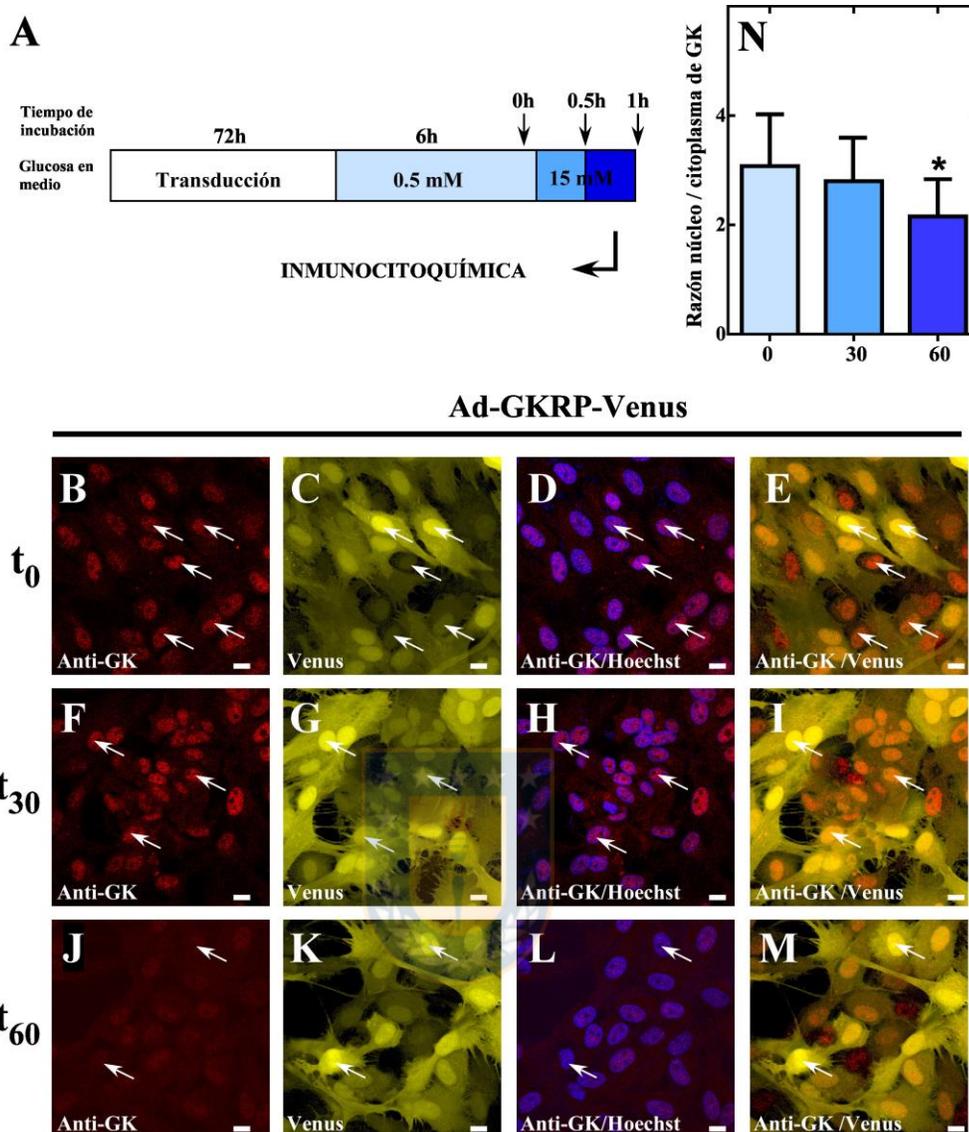


Figura 16: Disminución en la localización nuclear de GK en tanicitos que sobrepresan GGRP en respuesta a glucosa. Cultivos primarios de tanicitos se transdujeron con el virus control Ad-GKRP-Venus y se procesaron según el esquema (A). **B-M:** Inmunocitoquímica anti-GK (rojo) luego de incubar los tanicitos con 15 mM glucosa durante 0 (**B-E**), 30 (**F-I**) o 60 (**J-M**) min. Hoechst se utilizó como marcador nuclear. Las flechas indican inmunorreacción nuclear de GK. Escala: 10 μ m. N: Razón de la intensidad de fluorescencia de GK entre el núcleo y el citoplasma. N=6. * p <0.05.

Finalmente, se transdujeron tanicitos con el virus que silencia GGRP (AdshGGRP-EGFP). De manera sorprendente, cuando estos cultivos fueron transducidos con este virus la inmunorreacción de GK fue muy baja, independiente del tiempo de incubación de las células con glucosa 15 mM (**Fig. 17B, F, J**). A pesar de que una posibilidad es que el silenciamiento de GGRP en tanicitos afecte negativamente la expresión de GK, nuestros resultados no advirtieron efectos en este parámetro ni a nivel de mensajero (**Fig. 7B**) ni de proteína (**Fig. 8B**), por lo que, de nuevo, creemos que la morfología de las células afecta la visualización de la marca anti-GK. De todos modos, en estas células se realizó la cuantificación de la razón núcleo-citoplasma para GK en respuesta a glucosa. Los resultados no muestran cambios significativos en esta razón, independiente del tiempo de incubación con glucosa (**Fig. 17N**). Además, el valor de las razones obtenidas fue apenas superior a 1, lo que, sumado al fenómeno de difusión ya discutido, indica un enriquecimiento citoplasmático para GK. Estos antecedentes nos sugieren fuertemente que la baja en los niveles de expresión de GGRP en tanicitos es responsable de la localización nuclear de GK en alta glucosa.

Con el objeto de evaluar en células que no expresan GGRP, pero sí GK, una potencial traslocación de GK inducida por la sobreexpresión de GGRP, utilizamos células derivadas de insulinoma de rata, línea INS-1 clon 832.13, las cuales localizan GK sólo en el citoplasma. Ellas fueron transducidas con el virus control (Ad-Venus) o con el virus que sobreexpresa GGRP (AdGGRP-Venus) durante 72 h y procesadas de manera idéntica a los tanicitos a excepción de la concentración de glucosa usada.

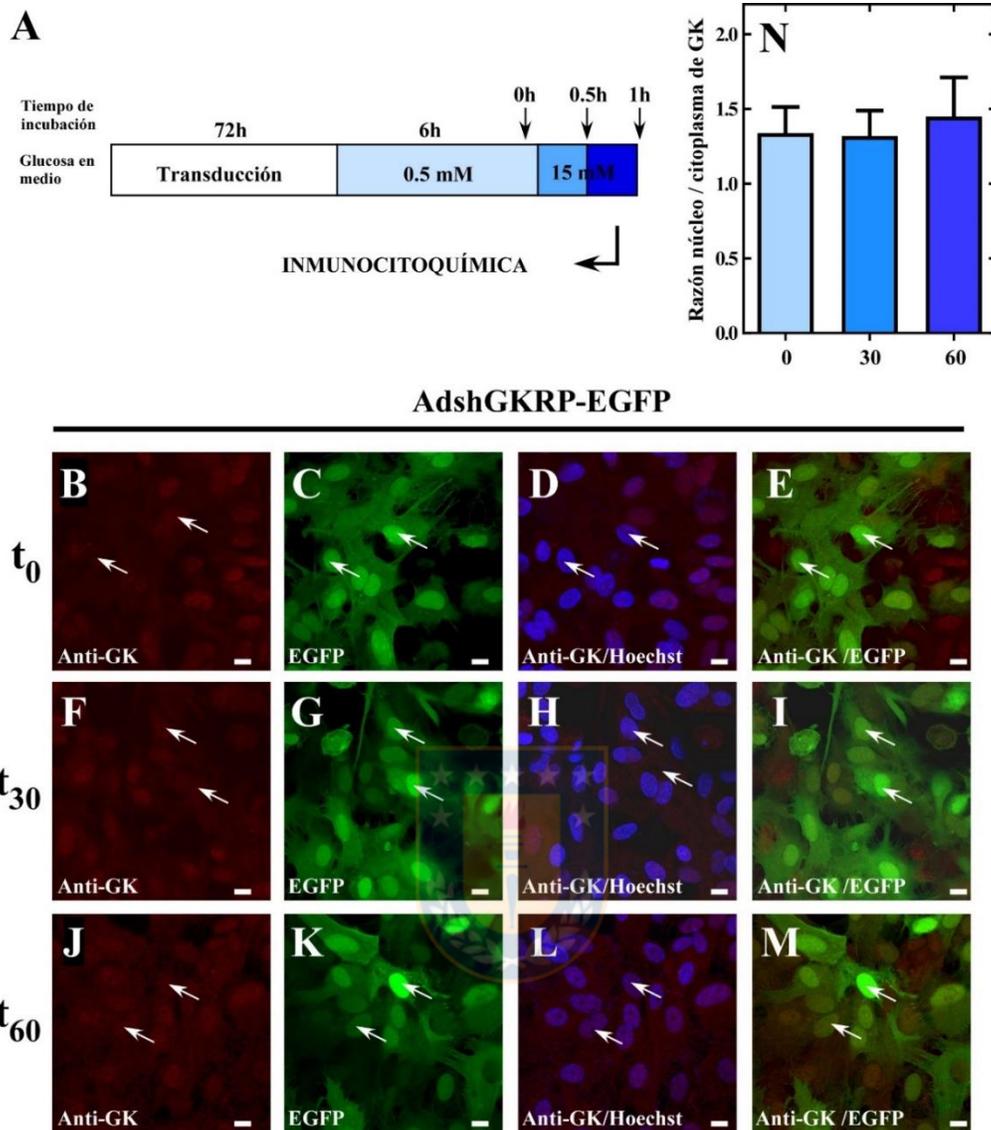


Figura 17: Inhibición de la traslocación núcleo-citoplasma de GK en ausencia de GGRP. Cultivos primarios de tanicitos se transdujeron con el virus Ad-shGGRP-EGFP y se procesaron según el esquema (A). **B-M:** Inmunocitoquímica anti-GK (rojo) luego de incubar los tanicitos con 15 mM glucosa durante 0 (**B-E**), 30 (**F-I**) o 60 (**J-M**) min. Hoechst se utilizó como marcador nuclear. Las flechas indican inmunorreacción nuclear de GK. Escala: 10 μ m. N: Razón de la intensidad de fluorescencia de GK entre el núcleo y el citoplasma. N=6.

A pesar de que la hiperglicemia que alcanza el sistema portal es de 20 mM, utilizamos 30 mM glucosa en estas células intentando guardar la proporción con la concentración utilizada en cultivos de tanicitos que fue de 15 mM, en circunstancias que la concentración mas alta de glucosa en el LCR en hiperglicemia es de 8 mM (Salgado et al 2014). Las células transducidas con el virus control, mostraron una localización eminentemente citoplasmática para GK y como era de esperar, no se logró detectar GGRP (**Fig. 18A-J**). Cabe destacar que esta localización citoplasmática no fue afectada por la concentración de glucosa con la que se estimularon las células, observándose una exclusión nuclear de esta enzima (**Fig. 18A, F**). En cambio, cuando GGRP fue sobrepresada se detecta una ligera localización nuclear para GK a 0.5 mM glucosa (**Fig 18K-L**). Al calcular la razón núcleo/citoplasma de GK, se aprecia una caída leve pero significativa en este parámetro en respuesta a la incubación con 30 mM glucosa durante 30 min (**Fig. 18T**). La localización de GGRP no experimenta cambios en respuesta a la concentración de glucosa del cultivo (**Fig. 18M-N y Q-R**), lo que fue ratificado mediante la cuantificación de la razón N/C (**Fig. 18U**).

Para validar estos resultados, se utilizó el mismo protocolo experimental aplicado en la figura 17, pero esta vez con el fin de realizar fraccionamiento núcleo-citoplasma de las células (**Fig. 19A**) y detección de ambas proteínas a través de *western blots*. Cuando se comparó la intensidad de banda de GK relativa a cada control de carga, observamos que aquellas células incubadas con 30 mM glucosa poseen una localización de GK mayoritariamente citoplasmática (**Fig. 19B**), mientras que cuando las células se incubaron a 0.5 mM glucosa, la localización

nuclear de GK aumenta significativamente, a expensas de una caída en la localización citoplasmática (**Fig. 19C**). Aun cuando la localización de GKRP fue escasa en el citoplasma, esta presenta una traslocación nucleo-citoplasmática similar a la observado para GK, disminuyendo su localización nuclear y aumentando la citoplasmática en respuesta a la incubación con alta glucosa (**Fig. 19B-D**).

Con el fin de entregar más data que avale la traslocación nucleo-citoplasma observada, realizamos un seguimiento en la localización de GK en respuesta a glucosa en función del tiempo. Para ello, fijamos las células cada 5 min luego de incubarlas con 30 mM glucosa. Los resultados muestran que producto de la incubación con glucosa, la localización nuclear de GK cae significativamente en las células que sobreexpresan GKRP, lo que va de la mano con un aumento de la localización citoplasmática de GK. Al cuantificar la razón núcleo/citoplasma de GK, se aprecia que los primeros 25 min ésta se mantiene relativamente constante y cae abruptamente entre los 25 y 30 min de incubación con glucosa 30 mM, detectándose una casi completa exclusión nuclear para GK desde los 30 min de incubación con alta glucosa (**Fig. 20A-B**).

Con el objetivo de evaluar la especificidad de esta respuesta y tener un control de tonicidad, realizamos el mismo protocolo experimental, pero incubamos las células con 30 mM de sacarosa. En estas circunstancias, la razón núcleo/citoplasma no se ve afectada, manteniéndose en valores cercanos a 0.9 durante los 35 minutos analizados (inserto).

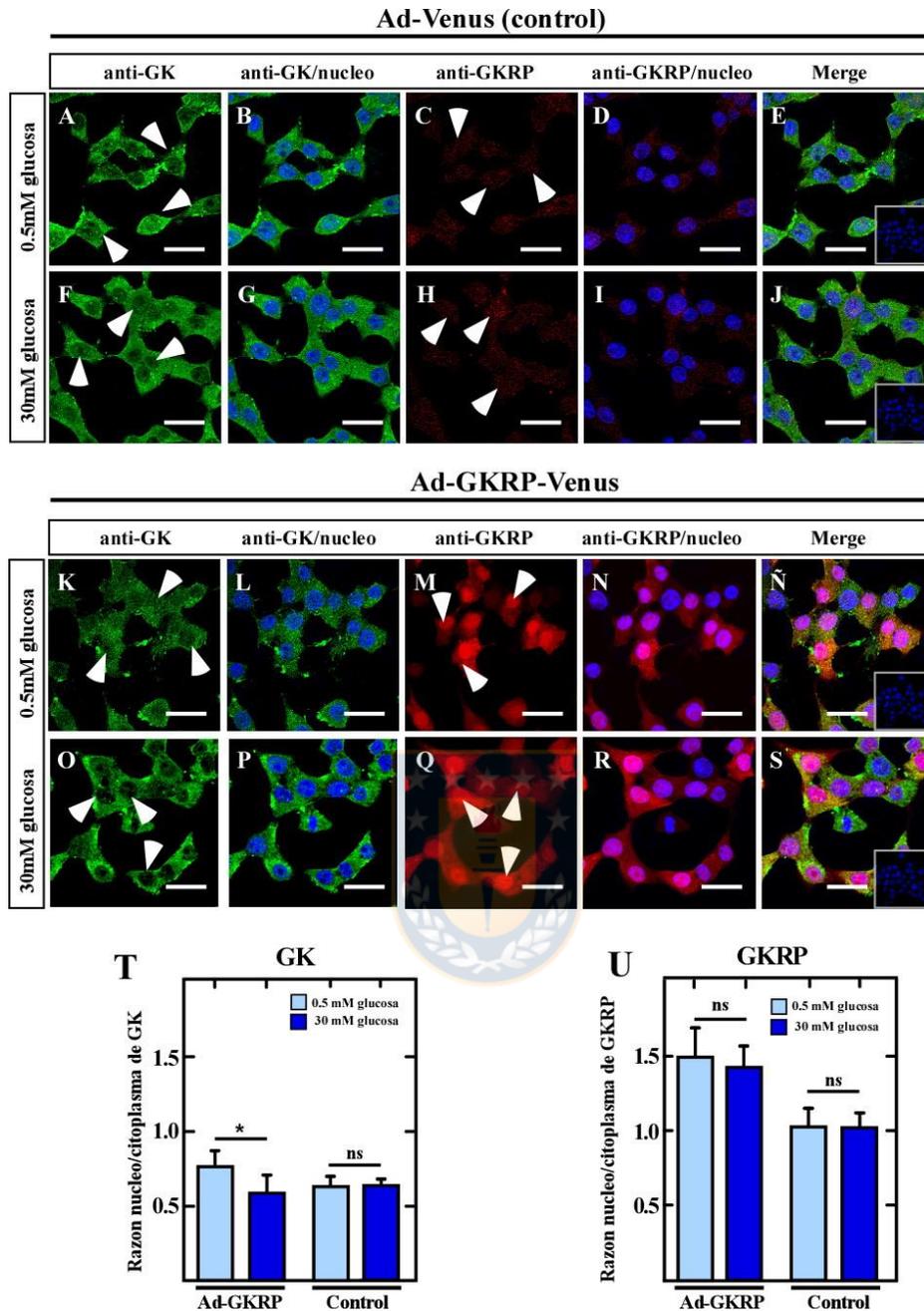


Figura 18: Traslocación nucleocitoplasma de GK pancreática en células que sobreexpresan GKR en respuesta a glucosa. Inmunofluorescencia anti-GK (Verde) y anti-GKRP (rojo) de células 832-13 transducidas con los virus Ad-Venus (A-J) o AdGKR-Venus (K-S). Hoechst fue utilizado como marcador nuclear. Escala: 10 μ m. N=5. * p <0.05

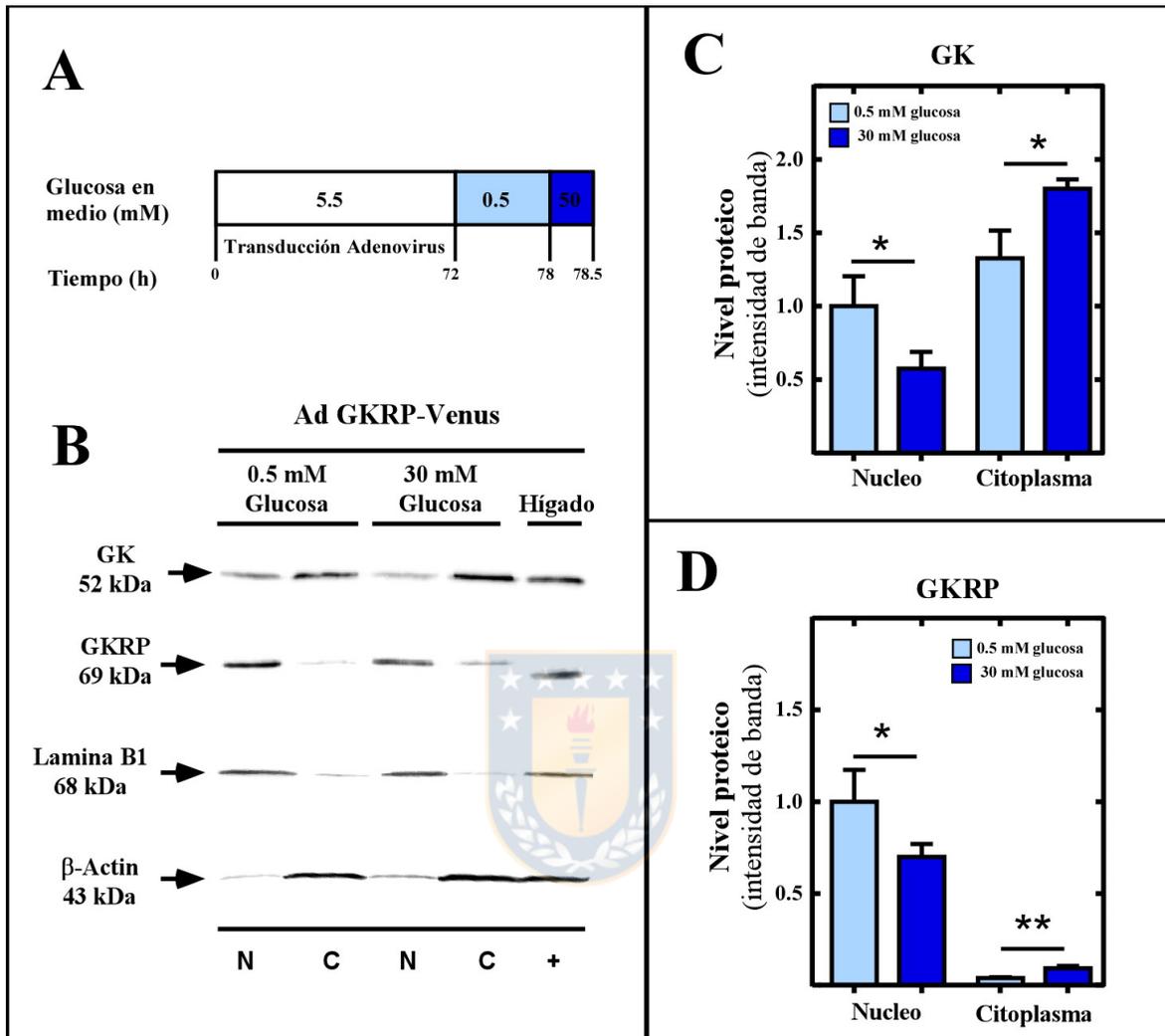


Figura 19: GK y GKR se translocan desde el núcleo hasta el citoplasma en respuesta a incrementos de glucosa. A: Protocolo utilizado para procesar las células previo al fraccionamiento celular. **B:** Western blot de las fracciones nucleares (N) y citoplasmáticas (C) de células transducidas con el virus OEG en respuesta a glucosa 30 mM. **C-D:** Análisis densitométrico de la intensidad de cada banda relativa al control de carga respectivo. N=5. * p <0.05, ** p <0.01.

Para comprobar que la concentración de glucosa ejerce un efecto sobre la traslocación en células que expresan endogenamente GK y exogenamente GKRP, se realizó el protocolo de incubación inverso, es decir, reduciendo la concentración de glucosa desde 30 a 3 mM. De manera interesante, la intensidad de fluorescencia se mantiene relativamente constante hasta los 15 min que aumenta la localización nuclear ligeramente para finalmente aumentar de manera abrupta entre los 25 y los 30 min (**Fig. 20C-D**). De igual forma al experimento anterior sacarosa no induce cambios en la localización de GK y la reversibilidad del comportamiento ayuda a reconocer esta traslocación como específica.

Tomados juntos, estos antecedentes nos hacen suponer que existe una relación directa entre el nivel de expresión de GKRP en un tipo celular en particular y la capacidad de traslocación de GK en respuesta a glucosa. Como una evidencia adicional que respalde esta teoría, evaluamos mediante RT-qPCR el nivel de expresión de los mensajeros de GKRP y GK en hígado, páncreas, hipotálamo y tanicitos, con el fin de obtener un cociente entre ambos valores y relacionarlo con la traslocación de GK. Los resultados muestran que este cociente es significativamente menor en tanicitos respecto a lo obtenido en hígado, sin embargo, en páncreas esta disminución es aún mayor, dada la muy baja expresión del mensajero de GKRP (**Fig. 21A**).

Cuando estos tipos celulares sobreexpresan GKRP, sin embargo, la situación cambia drásticamente. Como lo muestran los resultados, la razón *Gckr/Gck* en tanicitos transducidos con el virus OEG es comparable a la obtenida en hígado (**Fig. 21B**), mientras que en células 832-13 este valor es significativamente mayor

al obtenido en hígado (24.7 ± 3.6 vs 4.9 ± 0.6 , $p=0.005$). En definitiva, podemos concluir que cuando la expresión de GGRP es al menos 4 veces mayor que el de GK, GK se moviliza entre el núcleo y el citoplasma en respuesta a glucosa, tal como ocurre en hígado, mientras que cuando la relación es inversa y existe 5 veces más GK que GGRP, la traslocación es inversa, como ocurre en tanicitos. Finalmente, cuando solo existe GK y no GGRP, la localización de GK es principalmente citoplasmática, sin ser afectada por la concentración de glucosa a la que las células son expuestas (**Fig. 21C**).

6. Evaluación de la interacción de GK y GGRP en tanicitos

En hepatocitos, se ha propuesto que GGRP “atrae” a GK hacia el núcleo celular cuando la concentración de glucosa es baja, sin embargo, no se conoce a ciencia cierta de qué forma esta atracción se lleva a cabo. Se ha demostrado, no obstante, que una vez que GK entra al núcleo puede interactuar con GGRP, la cual la mantiene secuestrada en este compartimento para evitar su actividad catalítica en el citoplasma en condiciones de privación energética y, por tanto, en necesidad de exportar glucosa. Dada la traslocación de GK opuesta observada en tanicitos, nos preguntamos si GK y GGRP interactúan en estas células y si esta putativa interacción depende de la concentración de glucosa a la que estas células son expuestas. Para este fin, se utilizaron dos técnicas, se evaluó “proximidad estrecha” de estas proteínas mediante la técnica de PLA (del inglés, *Proximity Ligation Assay*) y coimmunoprecipitación. Para estos efectos, cultivos primarios de tanicitos fueron procesados siguiendo el protocolo de la **figura 22A**.

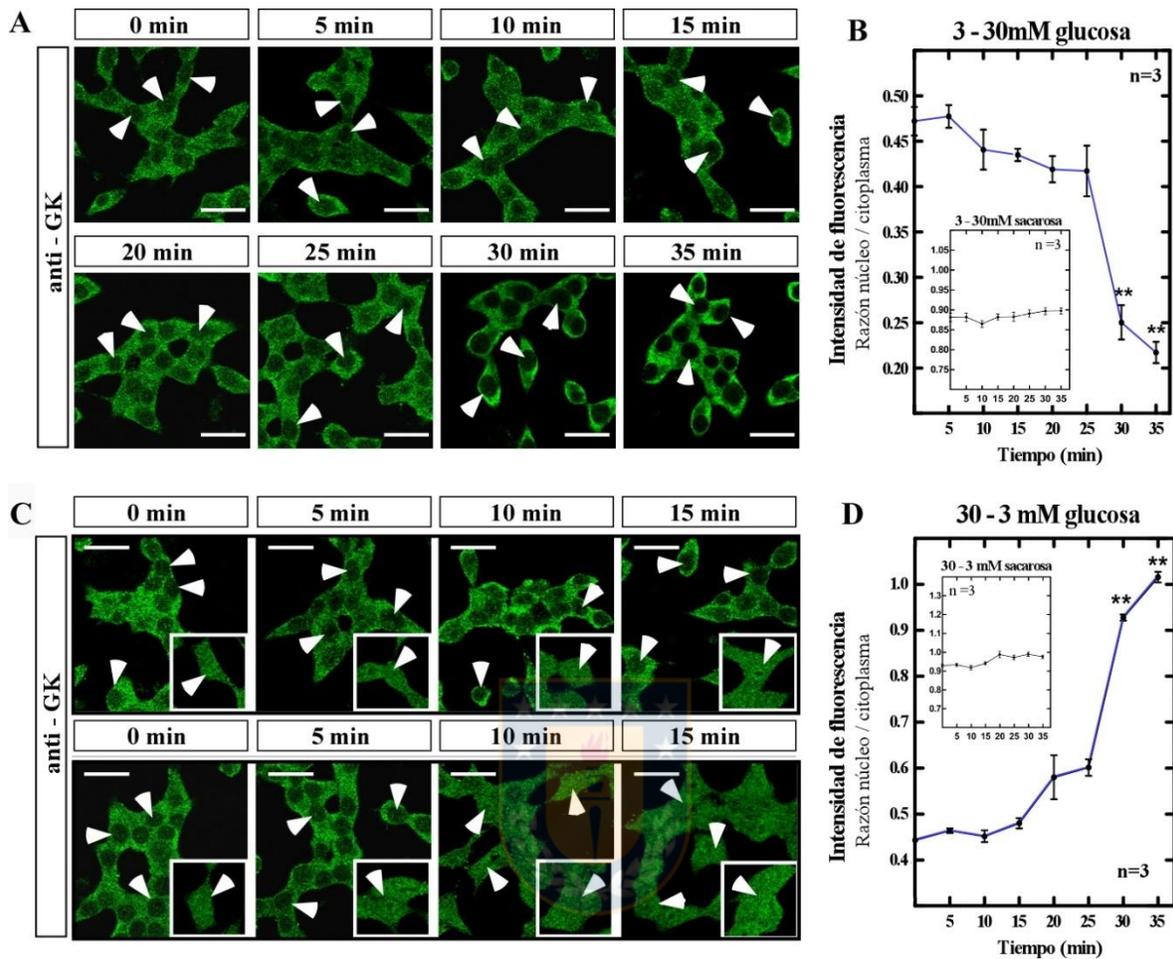


Figura 20. Cinética de traslocación de GK en respuesta a glucosa en células 832-13 que sobreexpresan GKRP. **A:** Siguiendo el esquema de la figura 18A, las células fueron fijadas cada 5 min luego de incubadas con 30 mM glucosa, con el fin de realizar inmunocitquímica para GK. **C:** Células preincubadas con 30 mM glucosa que luego fueron fijadas cada 5 min luego de incubadas con 3 mM glucosa, con el fin de realizar inmunocitquímica para GK. **B, D:** Relación núcleo citoplasma de GK en cada tiempo analizado, según las figuras A y C, respectivamente. N=3. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

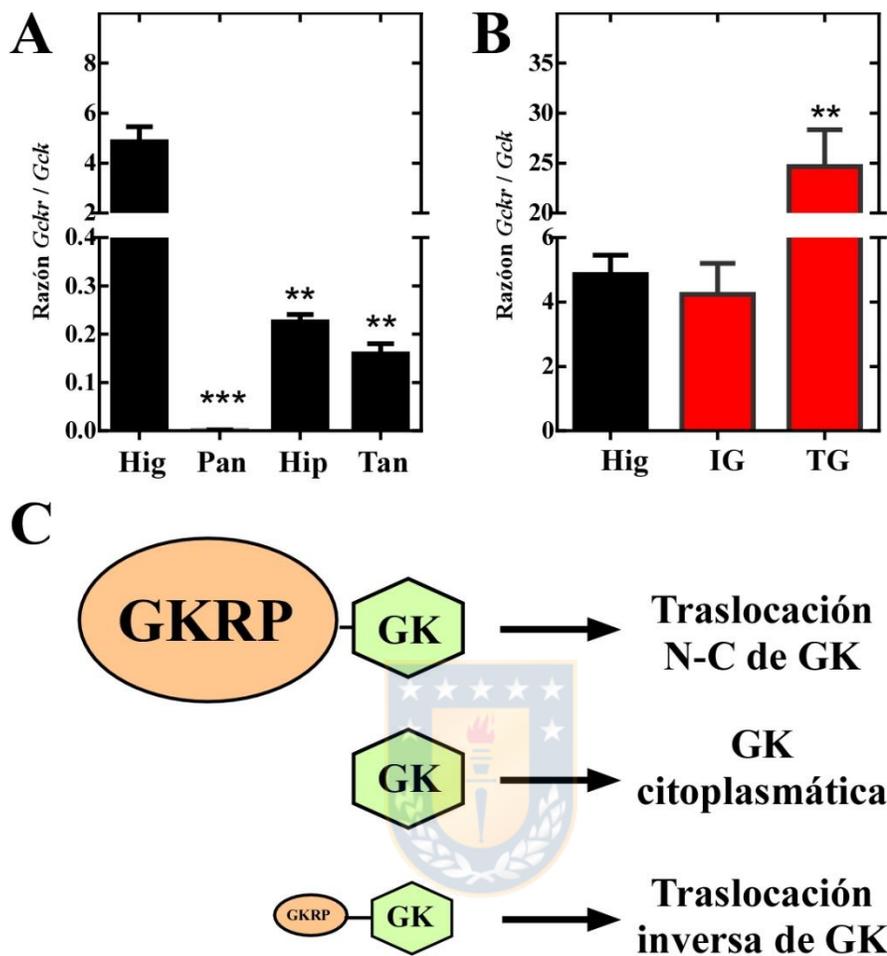


Figura 21: Expresión relativa de *Gckr* y *Gck* en distintos tejidos glucosensores. A: Razón de expresión de *Gckr* y *Gck* en hígado (Hig), páncreas (Pan), hipotálamo (hip) y tanicitos. **B:** Comparación de la razón *Gckr*/*Gck* entre hígado, células 832-13 que sobreexpresan GKR (IG) y tanicitos que sobreexpresan GKR (TG). **C:** Modelo que representa los niveles relativos de expresión de GKR y GK y la posibilidad de que GK transloque entre el citoplasma y el núcleo de las células. N=3. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Los resultados muestran que el número de eventos PLA, indicadores de sitios donde GK y GGRP se encuentran a una distancia menor a 40 nm, aumentó significativamente luego de 30 min de incubación con 15 mM de glucosa (**Fig. 22B**) lo que se relaciona con nuestros resultados previos. Luego de 60 min de tratamiento, el número de eventos PLA resultó comparable al obtenido previo a la incubación con glucosa (**Fig. 22B-C**). Sin embargo, cuando los eventos PLA fueron desglosados entre los que ocurren dentro del núcleo y los citoplasmáticos, se observa un aumento significativo respecto al tiempo inicial en los eventos nucleares tanto luego de 30 como de 60 min de incubación con glucosa 15 mM (**Fig. 22C**).

Posteriormente, se extrajeron proteínas totales luego de incubación durante 30 min, con glucosa 0.5 y 15 mM y se inmunoprecipitaron utilizando un anticuerpo anti-GK. Acto seguido de este tratamiento, los precipitados se resolvieron mediante SDS-PAGE con el fin de analizarlos mediante *western blot*. Se evidenció que GGRP co-precipita con GK, de manera débil pero detectable, sin embargo, el nivel de detección de GGRP en cada precipitado no presentó cambios significativos entre sí, esto es, entre 0.5 y 15 mM de glucosa en el cultivo de tanicitos (**Fig. 22D**).

A pesar de la falta de diferencia significativa en la co-precipitación, es posible que, de existir, esta diferencia no pueda ser observada mediante esta técnica debido a diferencias entre el núcleo y el citoplasma. Para evaluar esta posibilidad, seguimos el mismo protocolo descrito en la **Figura 22A**, pero esta vez previo a la coimmunoprecipitación realizamos fraccionamiento núcleo-citoplasma de los cultivos. Los resultados muestran que a pesar de que en los lisados totales la incubación con glucosa 15 mM generó un aumento de GGRP en la fracción nuclear

(*input* 0.5 vs *input* 15), el nivel de coimmunoprecipitación que esta proteína presentó con GK no presentó diferencias significativas entre los cultivos incubados a 0.5 y 15 mM de glucosa (**Fig. 23A-B**). Además, el nivel de coprecipitación entre estas proteínas fue significativamente menor en el compartimento citoplasmático respecto al nuclear, sin existir diferencias significativas entre las fracciones citoplasmáticas incubados a 0.5 y 15 mM glucosa (**Fig. 23C**, fracción citoplasmática). Tal como se discutió previamente, la menor co-precipitación observada en el citoplasma de las tanicitos se puede deber al tamaño de este compartimiento y no necesariamente a una falta de interacción.



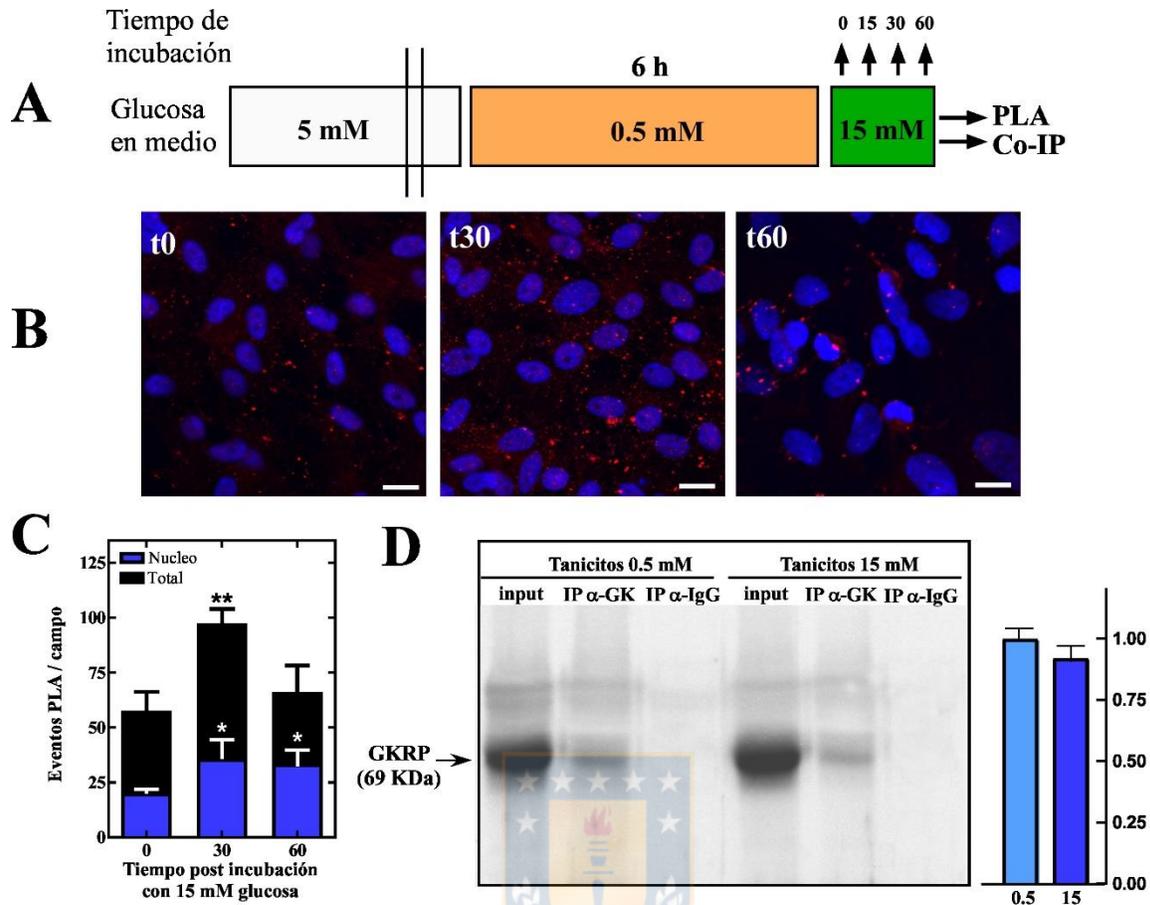


Figura 22: Interacción endógena de GK-GKRP en tanicitos en respuesta a glucosa. **A.** Protocolo experimental mediante el cual se procesaron las células para evaluar interacción GK-GKRP mediante PLA (**B**) y co-IP (**D**). **C.** Cuantificación del número de eventos PLA en el núcleo (azul) y en el total de la célula (negro) luego del tratamiento con glucosa. **D:** 300 μ g de cada lisado proteico fueron inmunoprecipitados con anti-GK y luego ensayados con anti-GKRP. Un anticuerpo anti-IgG normal fue utilizado como control negativo mientras que en input se cargaron 100 μ g de cada lisado antes de la precipitación. El gráfico de columnas lateral muestra la intensidad de banda de GKRP inmunoprecipitada con anti-GK. N=3. * p <0.05, ** p <0.01.

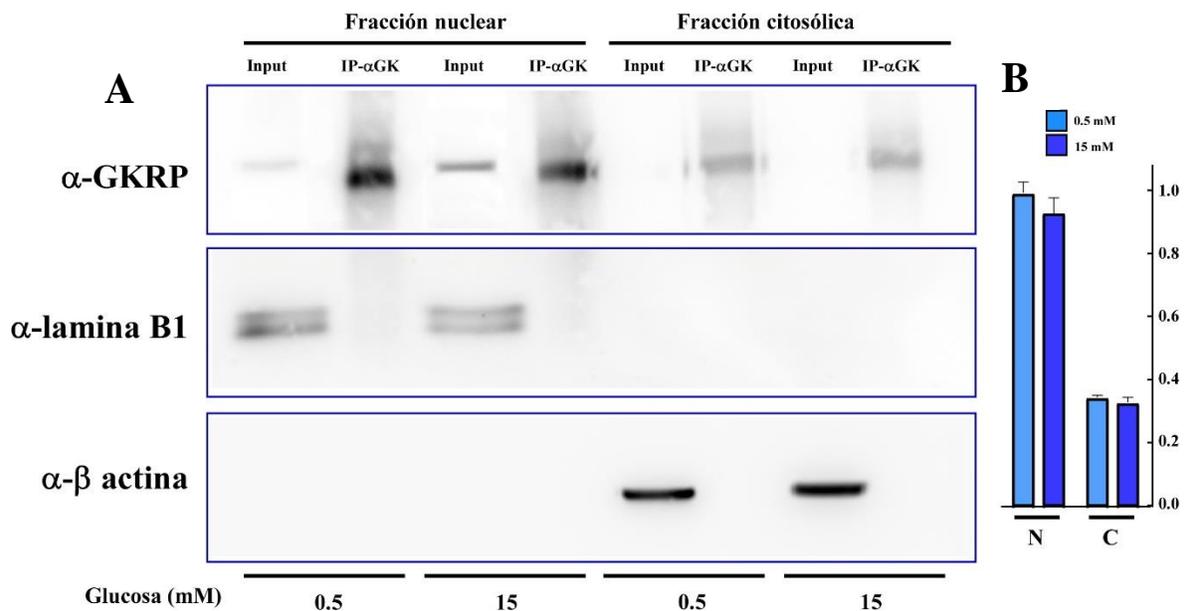
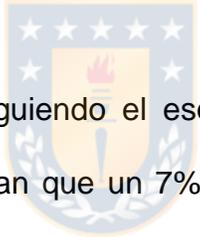


Figura 23: Co-inmunoprecipitación de GK y GGRP en fracciones subcelulares de tanicitos incubados a distintas concentraciones de glucosa. A: Cultivos primarios de tanicitos fueron procesados igual que en la figura 22A, con la excepción que previo a la colP se realizó fraccionamiento núcleo-citoplasma de las proteínas. Como input se cargaron 50 μ g de cada lisado previo a la precipitación. Los lisados fueron inmunoprecipitados con anti-GK hecho en oveja, los precipitados resueltos mediante *western blot* evaluando la presencia de GGRP en ellos. Lamina B1 y β actina fueron utilizados para evaluar la pureza de las fracciones generadas. **B:** Cuantificación relativa a cada control de carga de la intensidad de banda de GGRP, inmunoprecipitada con anti-GK. N=3.

7. Respuesta neuronal a metabolitos gliales.

7.1. Tipos de respuesta neuronal a glucosa en el HVM

Con el fin de poner a prueba nuestra hipótesis que indica que las neuronas pueden responder a glucosa a través de un mecanismo indirecto, evaluamos mediante electrofisiología el efecto de glucosa y de lactato sobre la actividad de neuronas del ARC. En una primera etapa, se realizó una caracterización de la respuesta a glucosa que experimentan las neuronas del HVM (ARC + NVM), medidos como función de las ondas de calcio intracelular generadas. Para esto, se trabajó con rebanadas coronales de hipotálamo de ratón, las cuales se preincubaron con Fluo4 durante 15 min disuelto en LCRa 5 mM glucosa, condición que fue utilizada como condición basal.



Las neuronas fueron tratadas siguiendo el esquema de la parte superior de la **figura 24**. Los resultados muestran que un 7% de las neuronas responden a 0.5 mM glucosa con incrementos de la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[Ca^{2+}]_i$), relacionado a un aumento de su actividad, por lo que siguiendo la nomenclatura de literatura (Fioramonti *et al* 2007) fueron catalogadas como neuronas GI (*glucose-inhibited*). Por contraparte, un 8% de las neuronas evaluadas respondieron aumentando las ondas Ca^{2+}_i cuando las rebanadas fueron incubadas con 15 mM glucosa, por lo que fueron catalogadas como neuronas GE (*glucose-excited*). La gran mayoría de las neuronas evaluadas no respondieron a los cambios de glucosa efectuados, por lo que fueron catalogadas como neuronas NR (*Non-response*).

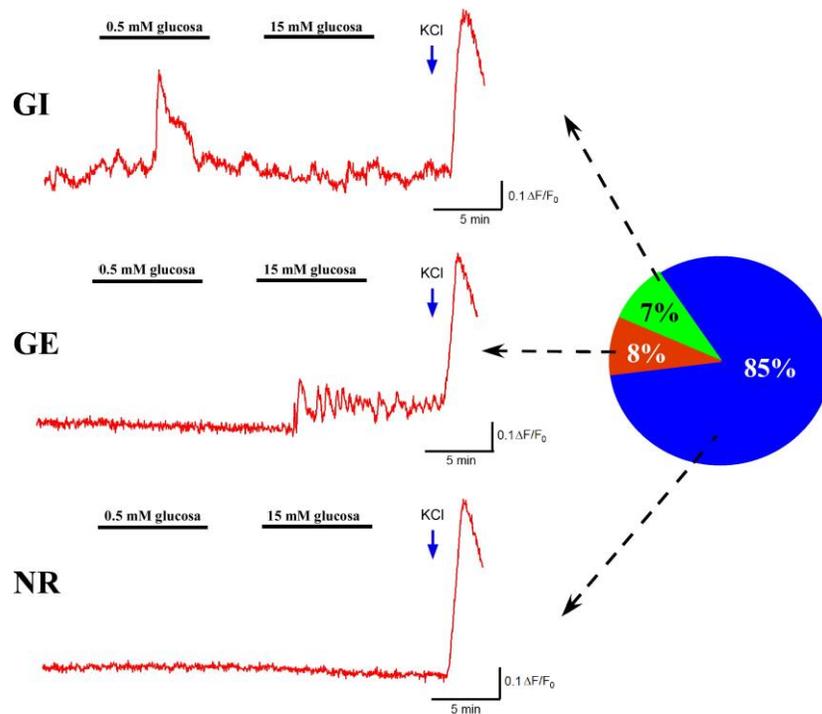


Figura 24: Tipos de neuronas hipotalámicas en relación con su respuesta a glucosa. Se realizaron rebanadas coronales de ratón de 250 μm , con el fin de evaluar la generación de ondas de calcio en el HVM como respuesta a la perfusión con glucosa. Para esto, las rebanadas fueron preincubadas con LCRa 5 mM glucosa, para luego ser perfundidas con glucosa 0.5 mM durante 8 min. Luego de 5 min de retorno a la condición basal, las rebanadas fueron incubadas con LCRa 15 mM glucosa durante 8 min adicionales. Con el fin de evidenciar la vitalidad neuronal, se realizó un estímulo final agudo con 100 mM de KCl en el LCRa, generando un *peak* de calcio robusto en todas las neuronas evaluadas. Las neuronas que respondieron a 0.5 o 15 mM glucosa fueron catalogadas como neuronas GI (Glucosa inhibidas) o GE (glucosa excitadas), respectivamente, mientras que las que no responden a ninguna de ellas como neuronas NR (no responden). N= 3, trazos representativos.

7.2. Uso de ratones POMC-EGFP como modelo de estudio

Dado el bajo porcentaje de neuronas que responden a glucosa sobre el total de neuronas del HVM, se hizo necesario utilizar un modelo transgénico, el cual expresa la proteína fluorescente EGFP bajo el promotor de POMC, de aquí en adelante, llamados ratones POMC-EGFP.

Como se muestra en la **figura 25A-B**, bajo excitación a 480 nm las neuronas POMC fueron claramente distinguibles de las células vecinas no fluorescentes. En concordancia con lo reportado previamente (Cowley *et al.* 2001), la localización de las neuronas POMC-EGFP fue preferentemente medial, próximo al tercer ventrículo, hecho levemente distinto a lo que ocurre en rata donde la localización de estas neuronas es más lateral (Cortes-Campos *et al.* 2013). El doble marcaje con vimentina muestra que estas neuronas se localizan próximas a la porción más ventral del 3V, tomando contacto preferente con procesos de tanicitos $\alpha 2$ y $\beta 1$.

Eléctricamente, las neuronas POMC registradas presentaron un potencial de reposo de entre -50 a -55 mV, generando potenciales de acción espontáneos de manera frecuente (~2.5 Hz). Cuando las neuronas fueron sometidas a pulsos crecientes de corriente desde -20 a 40 pA durante 1 s, estas respondieron con un aumento proporcional en la frecuencia de potenciales de acción durante el estímulo (**Fig. 25C-D**). A pesar de que no fue abordado en mayor detalle, destaca la generación de potenciales de acción inducidos por hiperpolarización, conocidos como “potencial de rebote” (**Fig. 25C**, línea azul), lo cual ha sido previamente reportado para neuronas POMC (Ma *et al.* 2007b)

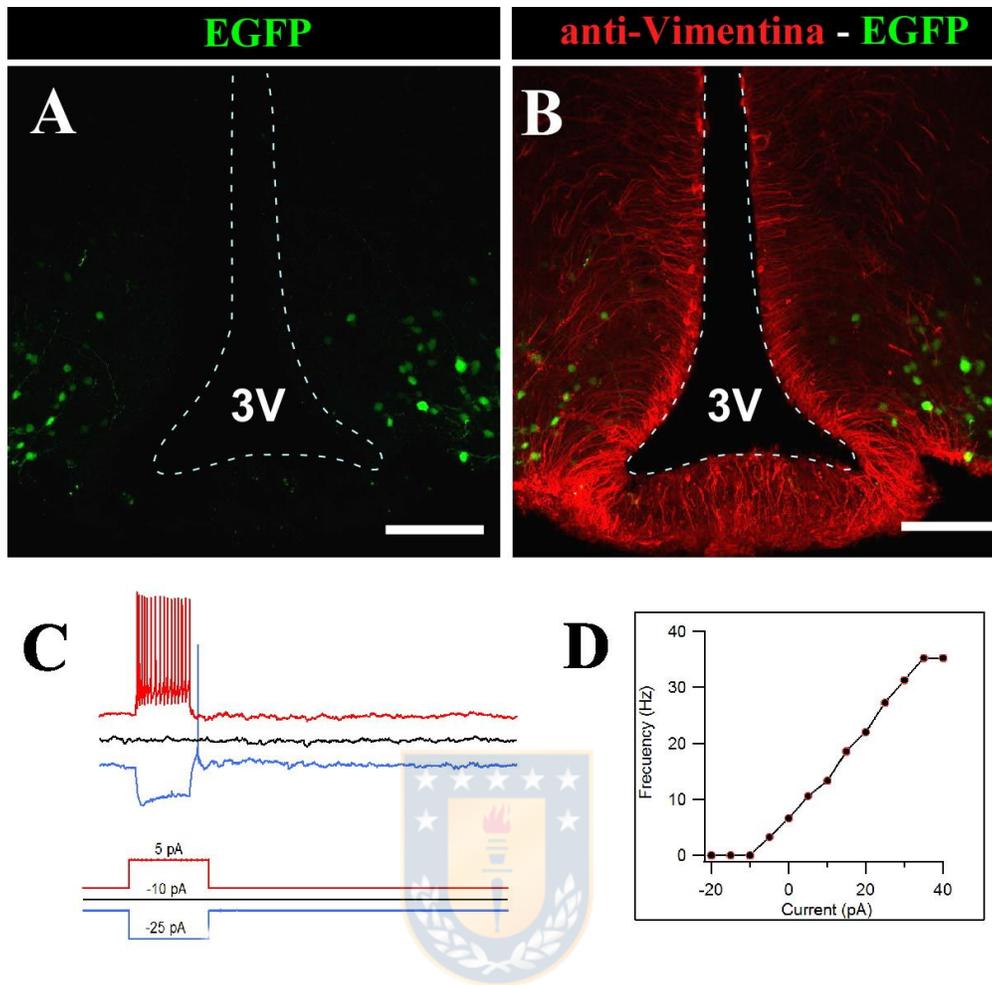


Figura 25: Localización de neuronas POMC-EGFP en ratón y su comportamiento eléctrico. A-B: Inmunofluorescencia asociada a microscopia confocal de un corte frontal de ratón a nivel del 3V basal (bregma -1.79 anteroposterior, 5.5 mm bajo el bregma), mostrando la distribución de neuronas POMC-EGFP (verde) y de anti-vimentina (rojo). **C:** Trazos representativos que muestran el potencial de membrana y los potenciales de acción evocados producto de distintos pulsos de corriente desde -20 a 40 pA. **D:** Dependencia de la frecuencia de potenciales de acción respecto a la corriente inyectada en neuronas POMC.

7.3. Respuesta de neuronas POMC de ratón a glucosa y lactato

Con el fin de poner a prueba nuestra hipótesis de glucosensing metabólico indirecto, en primer lugar, evaluamos mediante WCCC (*whole cell current-clamp*) la frecuencia de los potenciales de acción de neuronas POMC al ser preincubadas con LCRa (15 mM glucosa) y luego ensayar el efecto de reducir la concentración de glucosa del LCR a 0.5 mM y ajustando osmolaridad con sacarosa. Los resultados muestran que esta reducción en glucosa induce una hiperpolarización neuronal de entre 5-7 mV, acompañado de una disminución robusta en la frecuencia de potenciales de acción (FPA), disminuyendo desde 4.9 ± 1.8 Hz a 0.3 ± 0.2 Hz (Promedio \pm SD, **Fig. 26A**).

Con el objeto de ensayar los posibles efectos inducidos por lactato sobre la actividad de neuronas POMC, en primer término, se evaluó el efecto de 10 mM de L-lactato sobre neuronas preincubadas con glucosa 5 mM en el LCRa. Los resultados muestran un aumento significativo en la FPA inducido por este metabolito, desde 1.9 ± 1.0 hasta 3.8 ± 0.8 Hz (**Fig. 26B**). De manera interesante, junto con este aumento en la FPA, un 85% de las neuronas evaluadas experimentó una depolarización de entre 5-6 mV en promedio.

A pesar de que al menos un 75% de las neuronas evaluadas respondió a una disminución en la concentración de glucosa como la representada en el trazo A, hiperpolarizándose, solo un 5% de ellas respondió a un aumento desde 5 a 15 mM en la concentración de glucosa. Por este motivo, redujimos la concentración de glucosa a 0.5 mM, reportado como la concentración mínima a la que una neurona puede mantener su actividad basal (Fioramonti *et al.* 2007). Los resultados

muestran que cuando las células fueron pre-incubadas a 0.5 mM glucosa, un 92% de ellas (22/24) responden a glucosa 15 mM aumentando significativamente la FPA desde 1.5 ± 0.8 hasta 7.9 ± 0.4 Hz (**Fig. 26C**). Una vez que las neuronas fueron nuevamente incubadas con la condición basal (0.5 mM glucosa), la FPA se redujo bruscamente, llegando a cero en 18/24 neuronas evaluadas. Luego de 8 min en LCRa 0.5 mM glucosa, las rebanadas fueron perfundidas con 10 mM lactato durante 8 min adicionales. De manera interesante, 23/24 neuronas POMC responden a lactato de manera más robusta que a glucosa (FPA 9.2 ± 1.1 Hz), mientras que el tiempo promedio que tardan en comenzar a espigar, es aproximadamente la mitad (64 ± 11 vs 118 ± 31 s).

Con el fin de evaluar si las neuronas POMC pueden detectar la glucosa directamente (glucosensing directo) o necesitan del metabolismo glial hasta lactato para su detección (glucosensing indirecto), preincubamos las rebanadas con 0.5 mM glucosa y luego ensayamos mediante WCCC (**Fig. 27A**) y *cell attached* (**Fig. 27B**) el efecto de glucosa 15 mM sobre las neuronas POMC, cuando la actividad de los transportadores MCT1 y MCT4 estaba inhibida con 4 hidroxicinamato (4-Cin). Los resultados muestran que la inhibición de MCTs en el hipotálamo impidió que las neuronas POMC respondieran a glucosa en todas las células evaluadas, sugiriendo fuertemente que en estas neuronas opera un mecanismo de glucosensing indirecto. Al analizar los trazos obtenidos, podemos observar que, por el contrario, la incubación con 4-Cin induce una hiperpolarización transitoria de las neuronas POMC, lo que va acompañado de una caída en la FPA.

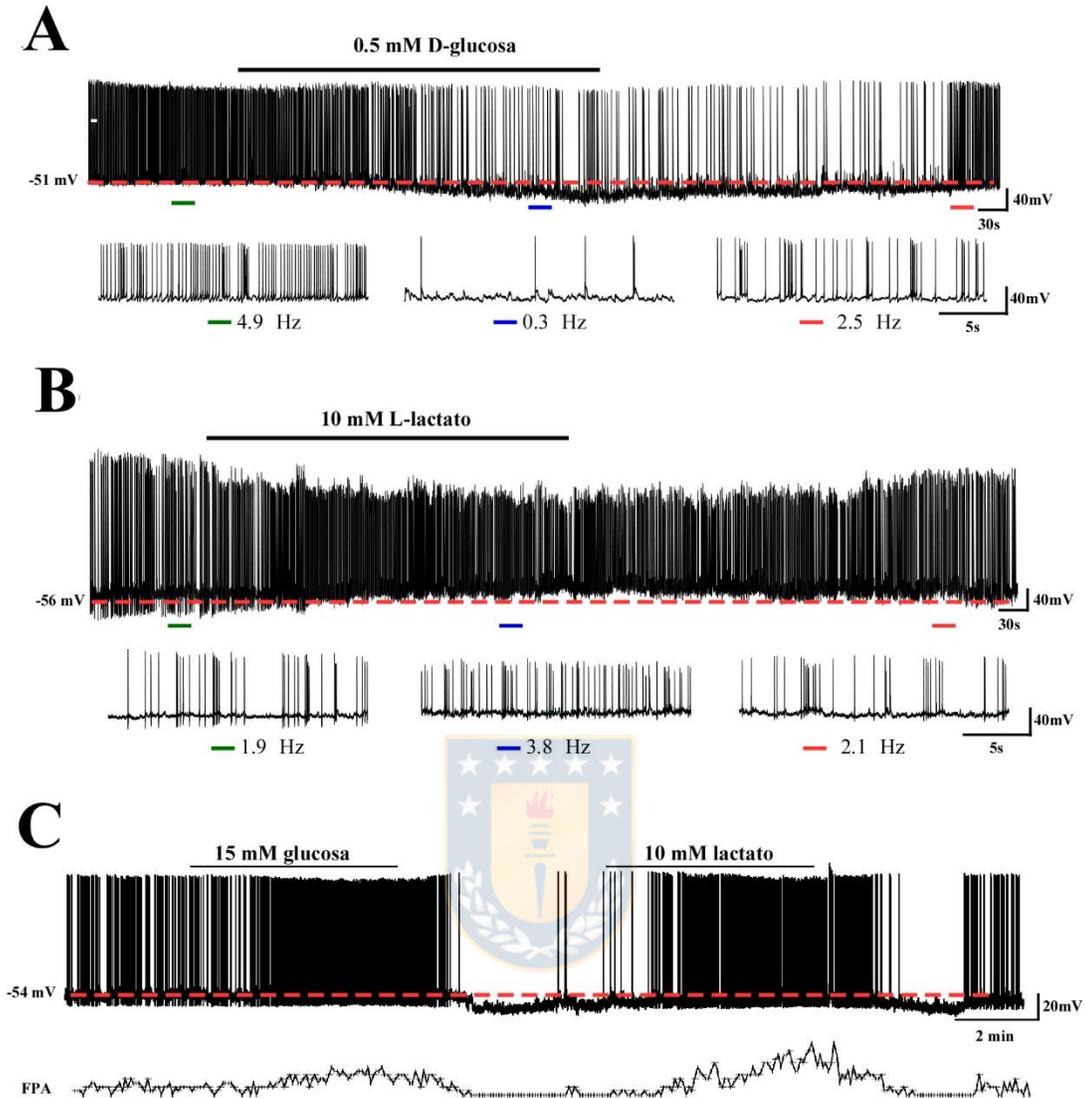


Figura 26: Aumento de actividad de neuronas POMC en respuesta a glucosa y lactato. WCCC de neuronas POMC-EGFP cambiando la concentración de glucosa en el LCRa perfundido desde 15 a 0.5 mM (**A**), aumentando la concentración de lactato en el LCRa (5 mM glucosa) desde 0 a 10 mM (**B**) y aumentando las concentraciones de glucosa (15 mM) y lactato (10 mM) desde un LCRa 0.5 mM glucosa (**C**). La línea roja punteada en cada trazo señala el potencial de reposo de la neurona registrada. FPA: Frecuencia de Potenciales de acción, calculada con la extensión Neuromatic del software Igor6.

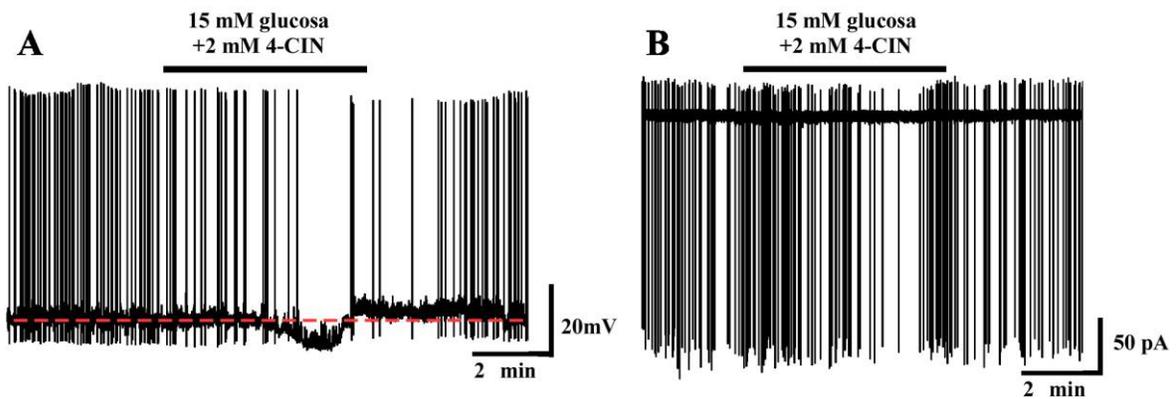


Figura 27: Respuesta de neuronas POMC a glucosa depende de la actividad de los transportadores de monocarboxilato. A: WCCC de neuronas POMC preincubadas con LCRa 0.5 mM glucosa y luego estimuladas durante 8 min con LCRa 15 mM glucosa suplementado con 2 mM de 4-CIN, un potente inhibidor de MCT1 y MCT4. La línea roja punteada señala los cambios en el potencial de reposo de la neurona registrada. N=2. **B:** Siguiendo el mismo esquema experimental de A, se evaluó mediante *cell attached* la FPA inducidos por glucosa en presencia de 4-CIN. N=3.

8. Metabolismo y señalización de cuerpos cetónicos a nivel hipotalámico

Nuestros resultados al generar ratas knockdown para MCT1 sugieren que existe un metabolito distinto al lactato, transportado por MCT1, que a nivel hipotalámico se encarga de inducir hambre luego de un periodo de ayuno prolongado. En estas circunstancias, creemos que las neuronas glucosensoras del ARC podrían sentir la producción de cuerpos cetónicos del organismo, ya sea de origen periférico cruzando la barrera hemato-encefálica, o mediante producción glial. Para abordar esta última alternativa, en primer lugar, evaluamos, mediante RT-PCR, la expresión hipotalámica de proteínas claves para la síntesis y metabolismo de cuerpos cetónicos.

Para esto, extrajimos ARN total y sintetizamos ADNc desde hipotálamo total (H), cultivo primario de tanicitos (T) y cultivo primario de neuronas hipotalámicas (N). En estos tipos celulares, encontramos que la expresión del mensajero de hidroximetilglutaril sintasa 2 (HMGCS2), enzima clave para la síntesis de cuerpos cetónicos, es altamente específica de tanicitos, obteniéndose niveles muy reducidos a nivel de hipotálamo total y cultivo neuronal (**Fig. 28A**). β -hidroxibutirato deshidrogenasa (BHBDH), por su parte, es una enzima involucrada tanto en la síntesis como en la oxidación de cuerpos cetónicos y su expresión fue encontrada en las 3 muestras analizadas (**Fig. 28B**). Análogamente, la expresión de carnitina palmitoil transferasa 1A (Cpt1a), la cual participa en la lanzadera de ácidos grasos mitocondriales, fue detectada en todas las muestras analizadas (**Fig. 28C**).

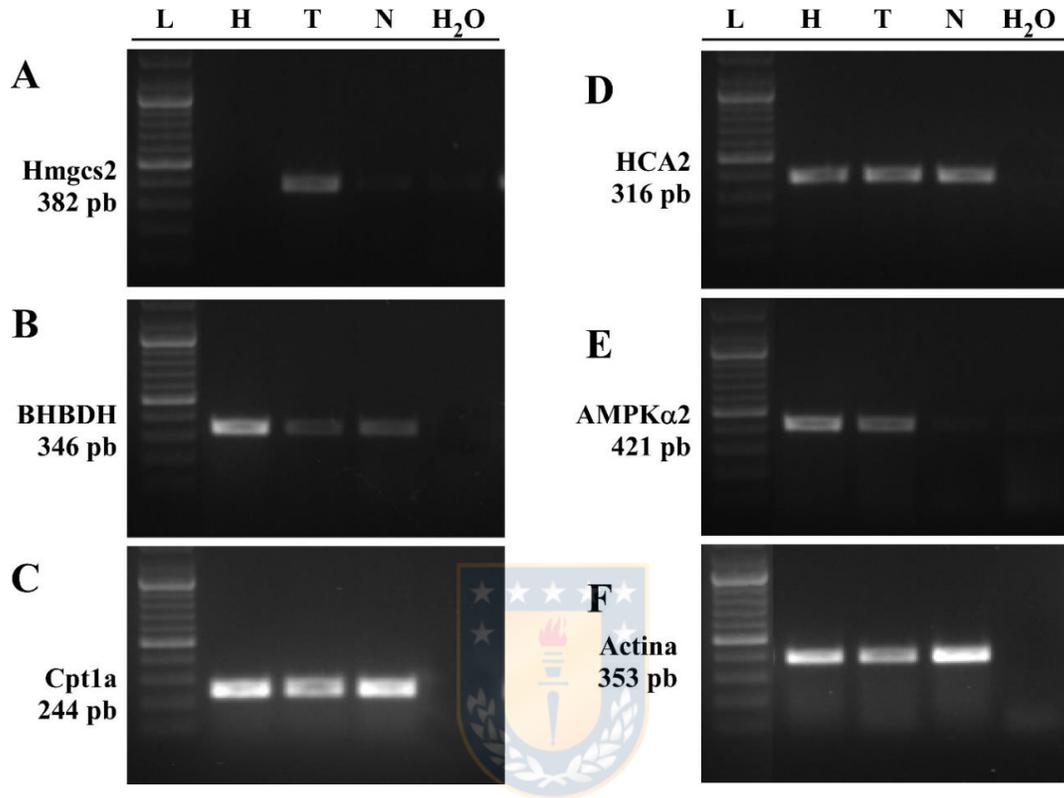


Figura 28: Expresión de proteínas relevantes para el metabolismo y señalización de cuerpos cetónicos en el hipotálamo de ratas. Se extrajo ARN total desde hipotálamo total (H), cultivo primario de tanicitos (T) y cultivo primario de neuronas hipotalámicas (N), desde los cuales se sintetizó ADNc (RT). Utilizando cada ADNc como templado se realizó PCR para Hmgcs2 (A), BHBDH (B), Cpt1a (C), HCA2 (D), AMPKα2 y β-actina como control de carga.

A la fecha, los astrocitos son el único tipo celular del SNC reconocido por su capacidad de realizar cetogénesis, proceso activado por la enzima AMPK (Blazquez *et al* 1999). De manera interesante, solo los tanicitos y no las neuronas hipotalámicas expresan niveles detectables de la isoforma $\alpha 2$ de AMPK (**Fig. 28E**), la que participaría en los mecanismos de glucosensing hipotalámico como se comentó previamente (Stark *et al.* 2013). Finalmente, existe la posibilidad de que las neuronas glucosensoras no incorporen β HB, principal cuerpo cetónico, sino que este señalice extracelularmente a través del receptor HCA2. Nuestros resultados muestran que tanto en neuronas como en tanicitos se detecta la banda de 351pb, específica para este receptor (**Fig. 28D**).

Con el objeto de analizar si los tanicitos en cultivo son capaces de producir y liberar cuerpos cetónicos, utilizamos un kit colorimétrico que permite seguir la producción de β HB con alta sensibilidad (25 μ M). Para estos efectos, cultivos primarios de tanicitos fueron incubados durante 4h en DMEM suplementado con 5 mM glucosa, para luego ser incubados durante 4h adicionales con DMEM suplementado con palmitato de sodio como fuente lipídica como se indica en la Figura 28A. Luego de este periodo, se almacenó medio extracelular para determinar la liberación de β HB mientras que las células fueron lisadas para extraer proteínas totales y realizar *western blot* (**Fig. 29A-B**).

En primer lugar, se evaluó si en tanicitos la liberación de β HB depende de la concentración de glucosa a la que estos son expuestos, como ocurre a nivel hepático. Los resultados muestran que luego de incubar las células durante 4h con 0.5 mM de glucosa, se obtiene un máximo de producción de β HB de cerca de 60

nmol/10⁶ cels, el cual cae significativamente cuando las células son incubadas a 5 o 15 mM de este azúcar (**Fig. 29C**). De manera interesante, cuando se evaluó la presencia de AMPK fosforilada en los cultivos, se obtuvo que esta caída en la liberación de β HB se acompaña de una caída significativa en el nivel de fosforilación de AMPK (**Fig. 29D**), lo que sugiere fuertemente que estos eventos están funcionalmente relacionados.

8.1. Producción de β HB en tejidos controles

Para controlar la especificidad de esta respuesta, implementamos cultivos primarios de astrocitos corticales, en los que se ha demostrado que se produce cetogénesis desde ácidos grasos de cadena larga, producción que es activada por AMPK (Blazquez *et al.* 1999). Los resultados muestran que a 0.5 mM glucosa en el medio extracelular estos cultivos no modifican significativamente la tasa de producción de β HB cuando son incubados con las mismas concentraciones de glucosa que los tanicitos, mientras que cuando las células son incubadas con 0.5 mM Aicar, aumenta significativamente (28.7 ± 7.4 vs 93.4 ± 15.1 nmol / 10⁶ cels, $p=0.004$). Como control negativo usamos células 832-13, comprobando que no se detecta β HB, incluso bajo la estimulación con Aicar (**Fig. 30A**).

8.2. Dependencia de AMPK, MCTs y GKRP en la producción de β HB en tanicitos.

De igual manera como fue evaluado en los cultivos controles, en cultivos primarios de tanicitos mantenidos a 5 mM de glucosa se analizó en primer lugar si la activación de AMPK modula la tasa de producción de β HB. Como lo muestran los resultados, la incubación de estas células con Aicar induce un aumento en la

producción de β HB comparable a la obtenida en cultivo primario de astrocitos (97.5 ± 4.5 vs 93.4 ± 15.1 nmol / 10^6 cels), mientras que CpC la inhibe respecto a la incubación con el vehículo (29.2 ± 2.5 vs 40.2 ± 3.8 nmol / 10^6 cels, $p=0.021$) (**Fig. 30B**, control).

Nuestra hipótesis es que los tanicitos producen β HB y lo liberan a través de MCTs. Para verificar esto, hemos ensayado la tasa de producción de β HB en tanicitos previamente transducidos durante 96h con una mezcla de dos adenovirus encargados de silenciar MCT1 y MCT4 (**Fig. 30B**, AdshMCT1/4). Los resultados muestran que la inhibición de ambos transportadores genera una inhibición de la liberación de β HB ya sea utilizando el vehículo o en la presencia de AICAR. No se detectaron diferencias al usar CpC. Estos resultados apoyan fuertemente que MCT1 y/o MCT4 están involucrados en la liberación de β HB desde los tanicitos.

Luego, quisimos evaluar si la inhibición de la oxidación de glucosa afecta la producción de β HB en tanicitos. Para esto, transdujimos cultivos de tanicitos durante 72h con el virus OEG y evaluamos en ellas la producción de β HB, siguiendo el mismo procedimiento experimental antes descrito. Los resultados muestran un aumento significativo en la liberación de β HB al sobreexpresar GKRP, aun sin la necesidad de activar AMPK con Aicar (83.2 ± 7.9 vs 40.2 ± 3.8 nmol / 10^6 cels, $p=0.002$) (**Fig. 30B**, AdGKRP). Aún más, cuando se inhibió la actividad de AMPK con CpC, la tasa de liberación de β HB no fue afectada, siendo comparable a la obtenida tras la incubación con Aicar.

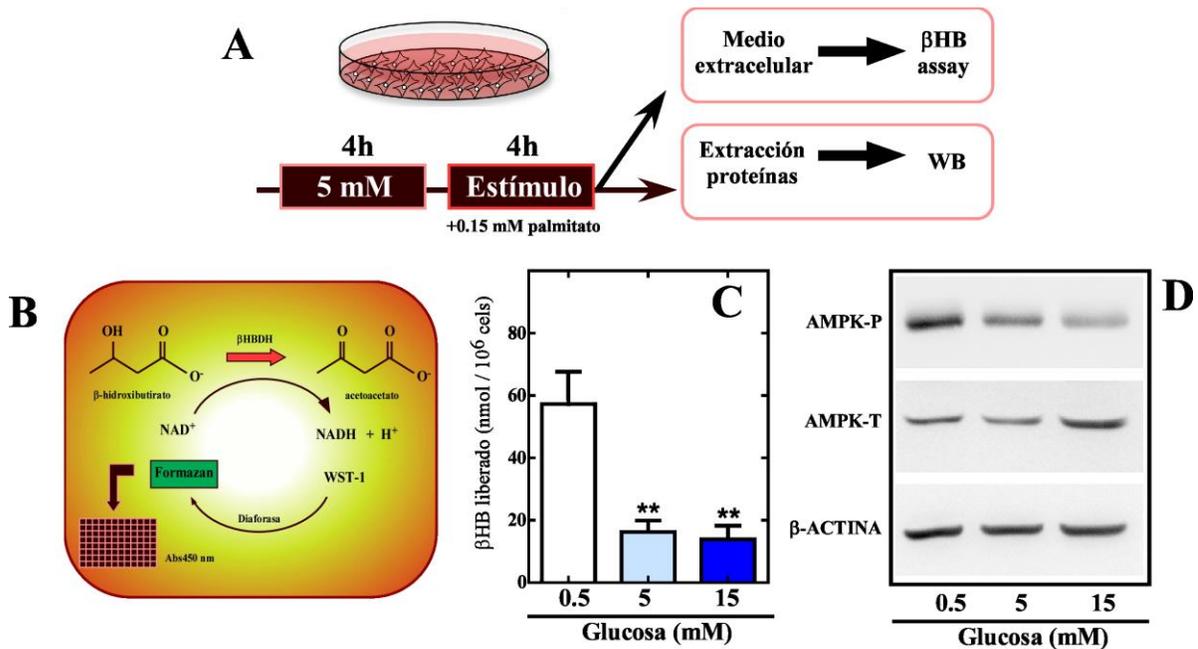


Figura 29: Efecto de la concentración de glucosa sobre la liberación de β HB y la activación de la AMPK en tanicitos. **A.** Protocolo experimental realizado para medir la liberación de β HB. Los cultivos se incubaron por 4 h en DMEM (5 mM glucosa), luego por 4 h adicionales con DMEM más palmitato de sodio y con cada estímulo a analizar. Posteriormente, se determinó la concentración de β HB en el medio de cultivo y desde el lisado celular se extrajo las proteínas totales para realizar western blot. **B:** Ecuación en que se fundamenta la medición de β HB. **C.** Liberación de β HB desde cultivos primarios de tanicitos incubados durante 4 h con glucosa 0.5 (barra blanca), 5 (barra celeste) o 15 (barra azul) mM. Los resultados fueron normalizados por cada millón de células sembradas. **D:** Western blot de proteínas totales obtenidas desde los mismos cultivos primarios de tanicitos, mostrando el nivel de fosforilación de AMPK como una medida de su activación. N=3. ** $p < 0.01$.

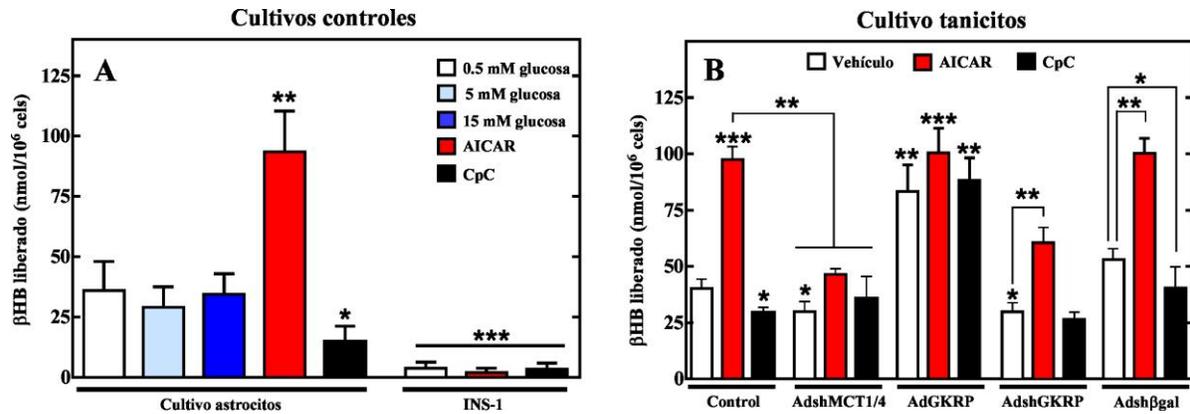


Figura 30: Liberación de β HB en cultivo primario de tanicitos. **A.** Liberación de β HB desde cultivo primario de astrocitos corticales y desde células 832-13, suplementados con 0.5 (barra blanca), 5 (barra celeste) o 15 (barra azul) mM glucosa, AICAR (barra roja) o compuesto C (CpC, barra negra). Todas las condiciones se evaluaron estadísticamente respecto a astrocitos incubados a 0.5 mM glucosa (barra blanca). N=3. **B.** Liberación de β HB desde cultivos primarios de tanicitos sin transducir (control), o transducidos con los virus AdshMCT1-AdshMCT4 (AdshMCT1/4), AdGKRP-Venus, AdshGKRP o Adsh β gal, en respuesta a la incubación durante 4 h con el vehículo (barra blanca), Aicar (barra roja) o CpC (barra negra). Los resultados fueron normalizados por cada millón de células sembradas y se muestra la diferencia estadística respecto a la condición control incubada con vehículo, a menos que se señale otra comparación. N=5. * p <0.05 ** p <0.01, *** p <0.001.

Por el contrario, el silenciamiento de GGRP indujo una disminución significativa en la producción de β HB respecto a la condición control, esto tanto en las células incubadas con vehículo (29.3 ± 4.1 nmol/ 10^6 cels, $p=0.010$) como en aquellas incubadas con Aicar (60.0 ± 5.8 nmol/ 10^6 cels, $p=0.002$) (**Fig. 30B**, AdshGGRP), manteniéndose una diferencia significativa entre ellas ($p=0.006$). Para controlar el posible efecto de la transducción viral sobre la tasa cetogénica, transdujimos tanicitos con el virus SHB, obteniéndose resultados muy similares a los generados en las células sin transducir (**Fig. 30B**, control vs Adsh β gal). En resumen, estos resultados sugieren que el nivel de expresión de GGRP modula la generación de ATP en tanicitos, afectando la actividad de la enzima AMPK y a su vez la capacidad cetogénica de estas células.

8.3. Efecto de β HB sobre la actividad de neuronas POMC

En virtud de estos antecedentes, evaluamos mediante WCCC si β HB es capaz de afectar la actividad de neuronas POMC. Para esto, rebanadas hipotalámicas de ratón POMC-EGFP fueron preincubadas con LCRa 5 mM glucosa y luego estimuladas con β HB 2 mM. Aunque los cambios en la FPA (2.7 ± 0.5 vs 1.4 ± 0.6 Hz) no fueron tan drásticos como los vistos para glucosa y lactato, los resultados muestran que β HB lleva a una hiperpolarización desde -53 hasta -59 mV (**Fig. 32**). De manera interesante, una vez que las rebanadas fueron incubadas nuevamente en la condición basal, 5/8 neuronas mostraron un aumento significativo en la FPA respecto a la condición inicial (7.9 ± 0.8 vs 1.4 ± 0.6 Hz), lo que se asoció a un incremento en el voltaje de membrana hasta un *peak* de -45 mV. Los resultados sugieren que β HB puede inhibir neuronas POMC, ya sea directa o indirectamente.

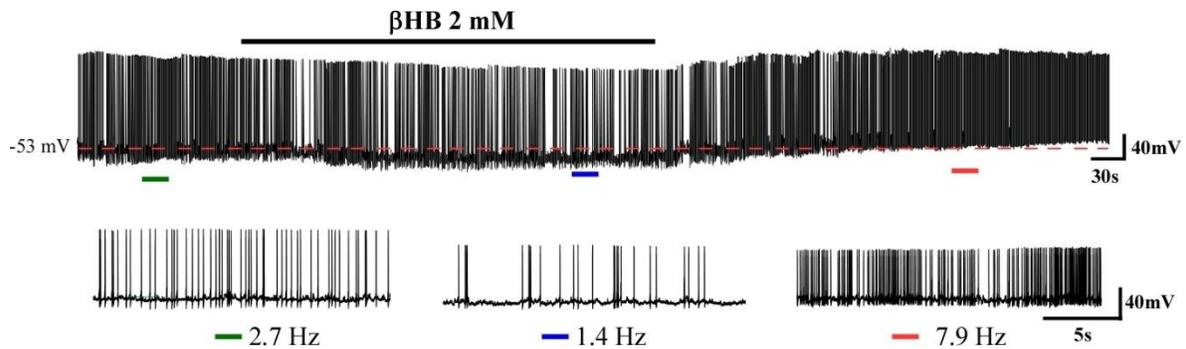


Figura 31: βHB reduce la actividad de neuronas POMC de ratón. WCCC de neuronas POMC preincubadas con LCRa 5 mM glucosa y luego estimuladas durante 8 min con βHB 2 mM. La línea roja punteada señala los cambios en el potencial de reposo de la neurona registrada. Los trazos inferiores representan periodos representativos del registro previo, durante y después de la estimulación con βHB . N= 8.

8.4. β HB antagoniza los efectos producidos por lactato sobre la expresión de neuropéptidos hipotalámicos.

Para estudiar si además de reducir la FPA y el voltaje de membrana de neuronas POMC, β HB es capaz de modificar la expresión de neuropéptidos hipotalámicos encargados de la regulación del comportamiento alimenticio, establecimos cultivos primarios de precursores de neuronas hipotalámicas desde prenatal 17, las que fueron mantenidas en cultivo hasta su diferenciación neuronal (aprox. 7d). Luego de este periodo, las neuronas se mantuvieron durante 6 h a 1 mM glucosa y luego incubadas durante 4h con los distintos estímulos analizados (**Fig. 33 A**).

Los resultados muestran que cuando los cultivos fueron incubados con glucosa 25 mM, no se generaron diferencias significativas respecto a la condición control, indicando que, en este cultivo enriquecido de neuronas, glucosa no es capaz de favorecer la expresión de neuropéptidos anorexigénicos (**Fig. 33B**, barras negras). Sin embargo, en respuesta a lactato, la expresión de este neuropéptido aumenta significativamente y de manera concentración dependiente (**Fig. 33B**, barras azules), potenciando la noción de que este metabolito es capaz de actuar de manera directa sobre las neuronas POMC. Además, la incubación con β HB 1 mM lleva a una disminución significativa de *Pomc* mientras que 10 mM de β HB no genera cambios significativos cuando se comparan con la condición control (**Fig. 33B**, barras rojas). Interesantemente, cuando las neuronas se incubaron con una combinación de lactato y β HB a 10 mM c/u (L10B10), se produjo una disminución significativa en la expresión de POMC.

En relación con NPY, los resultados muestran que glucosa ni lactato, poseen efecto alguno sobre la expresión de este neuropéptido, a ninguna de las concentraciones ensayadas (**Fig. 33C**). De manera interesante, una incubación con 1 ó 10 mM de β HB son suficientes para inducir un aumento significativo en la expresión del mensajero de NPY respecto a la condición control. La combinación L10B10, por su parte, mantuvo alta la expresión de NPY, a niveles comparables a la obtenida exclusivamente con β HB.



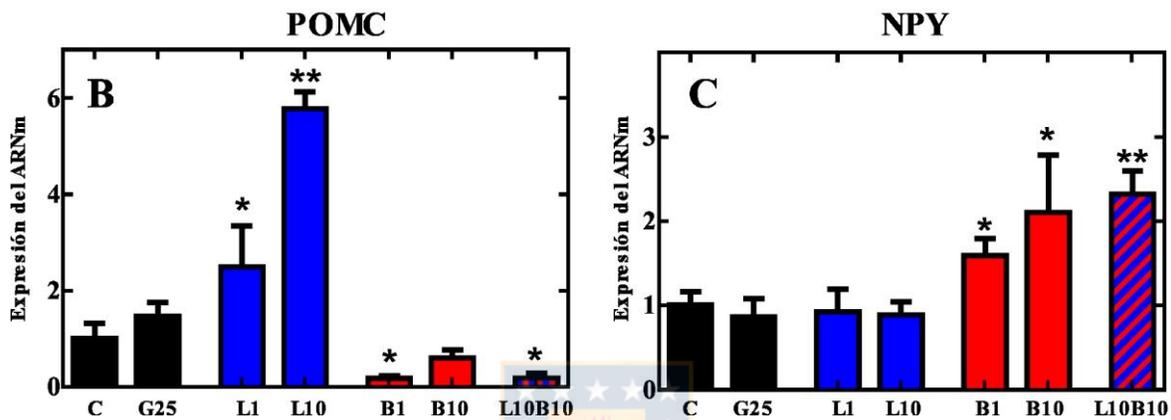
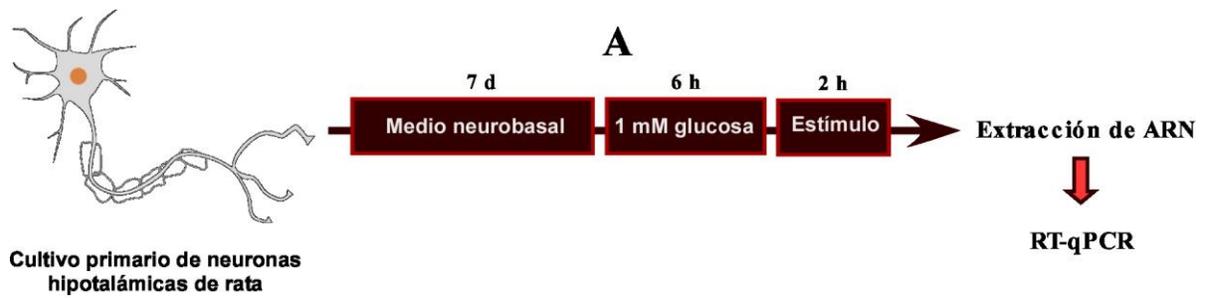


Figura 32: Lactato y β HB cumplen un rol antagónico sobre la expresión de neuropéptidos en cultivo primario de neuronas hipotálamicas. A: Protocolo experimental aplicado. B-C: RT-qPCR de POMC (B) y NPY (C) desde cultivos primarios de neuronas hipotálamicas incubadas 2h con glucosa 25 mM (G25), lactato 1 (L1) y 10 (L10) mM, β HB 1 (B1) y 10 (B10) mM y una mezcla de lactato y β HB 10 mM c/u (L10B10). La condición control (C) se estableció incubando las células con 1 mM glucosa. N=3. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

8.5. Comportamiento alimenticio en ratas inyectadas icv con β HB.

Considerando que β HB induce una inhibición en la liberación de POMC al menos en neuronas en cultivo, analizamos posteriormente comportamiento alimenticio. Para ello canulamos estereotáxicamente ratas adultas y luego de un periodo de recuperación se inyectó icv 10 μ L de β HB 50 mM o 10 μ L de LCRa suplementado con el vehículo (etanol 0.02%), esperando alcanzar una concentración ventricular de este metabolito cercana a 5 mM. Con el fin de evitar que la producción hepática de β HB afecte los resultados, realizamos esta inyección al mediodía, en animales alimentados *ad libitum*. Durante las primeras 6 h post inyección de β HB, se realizó un seguimiento manual del alimento ingerido por cada animal a cada hora, mientras que las horas restantes hasta completar un día fueron monitoreadas automáticamente (**Fig. 33A**).

Desde la segunda hora post inyección, se puede ver como los animales inyectados con β HB ingieren significativamente más alimento que el grupo control (**Fig. 33B**). No cuantificamos el peso corporal al término de las 6 h, ya que es poco probable que se detecten variaciones y la manipulación constante de los animales podría generar errores asociados al estrés. Al cabo de las 6 primeras horas, estos animales presentaron una ingesta acumulada significativamente mayor que los inyectados con el vehículo, variando desde 2.9 ± 0.6 a 4.2 ± 0.5 g por cada 200 g de peso corporal (**Fig. 33C**). A pesar de esto, el número de EA durante este periodo no fue significativamente distinto entre los dos grupos experimentales (**Fig. 33D**). De manera interesante, en los animales inyectados con β HB se produce un menor número y una menor duración de los intervalos respecto al grupo control (**Fig. 33E-**

F) sugiriendo una disminución de la saciedad. Por otra parte, se detecta un tamaño promedio de las comidas significativamente mayor, sugiriendo un aumento del hambre, lo que se correlaciona con resultados reportados que indican que β HB promueve el inicio de la alimentación (**Fig. 33G**).

Posteriormente, analizamos estos mismos indicadores incorporando el comportamiento alimenticio en la fase oscura hasta completar 24 h post inyección. Los resultados fueron muy diferentes a los obtenidos durante las primeras 6 h post inyección, ya que la ingesta alimenticia acumulada durante las 24 h de registro resultó ser significativamente menor en animales inyectados con β HB (**Fig. 34B**), asociado a un aumento en el peso corporal (**Fig. 34C**). A pesar de que esta contradicción sugiere una alteración en el gasto energético de los animales, nuestro sistema de registro no permite evaluar este parámetro. Aun cuando el número total de EA es significativamente menor en animales inyectados con β HB (**Fig. 34D**), al analizar en más detalle la frecuencia alimenticia (EA cada 3 h), observamos que ésta comienza alta, sin embargo, desde la sexta hora y hasta casi el final del monitoreo, este valor permanece significativamente menor que en los animales controles (**Fig. 34A**), lo que fundamenta la disminución global del número de eventos, observada en la figura 34D. Respecto a los intervalos entre comidas, estos fueron menos en número pero de mayor duración que en animales controles (**Fig. 34F-G**), indicando que pasaron más tiempo sin visitar el comedero, lo que podrían indicar que estaban más saciados. Por otra parte, el tamaño medio de la comida, que se determinó como la ingesta total de alimentos dividida por el número de eventos alimenticios, muestra una tendencia al aumento ($p=0.06$) en las ratas

inyectadas con β HB. Un mayor tamaño de las comidas puede explicar por que, a pesar de presentar menor número de EA, estos animales suben de peso, lo cual sugiere que cuando entran al comedero ingieren mayor cantidad de alimento; es decir, necesitan mas comida para saciarse lo que es un indicador de que los animales tenían mas hambre, pero cuando se sacian lo hacen por mas tiempo (**Fig. 34H**).

Todos estos resultados nos hacen plantear la hipótesis de que la inyección icv de β HB genera un aumento significativo, pero acotado, en la ingesta alimenticia de ratas, aumentando el tamaño de cada comida y por tanto disminuyendo la duración de los intervalos inter-comidas. Adicionalmente, nuestros resultados indican que los animales inyectados icv con β HB ingieren alimentos en un tiempo significativamente menor que los animales del grupo control (menor latencia, **Fig. 35B**), hecho que sustenta al menos en parte la mayor frecuencia alimenticia observada al inicio del monitoreo (**Fig. 33B**).

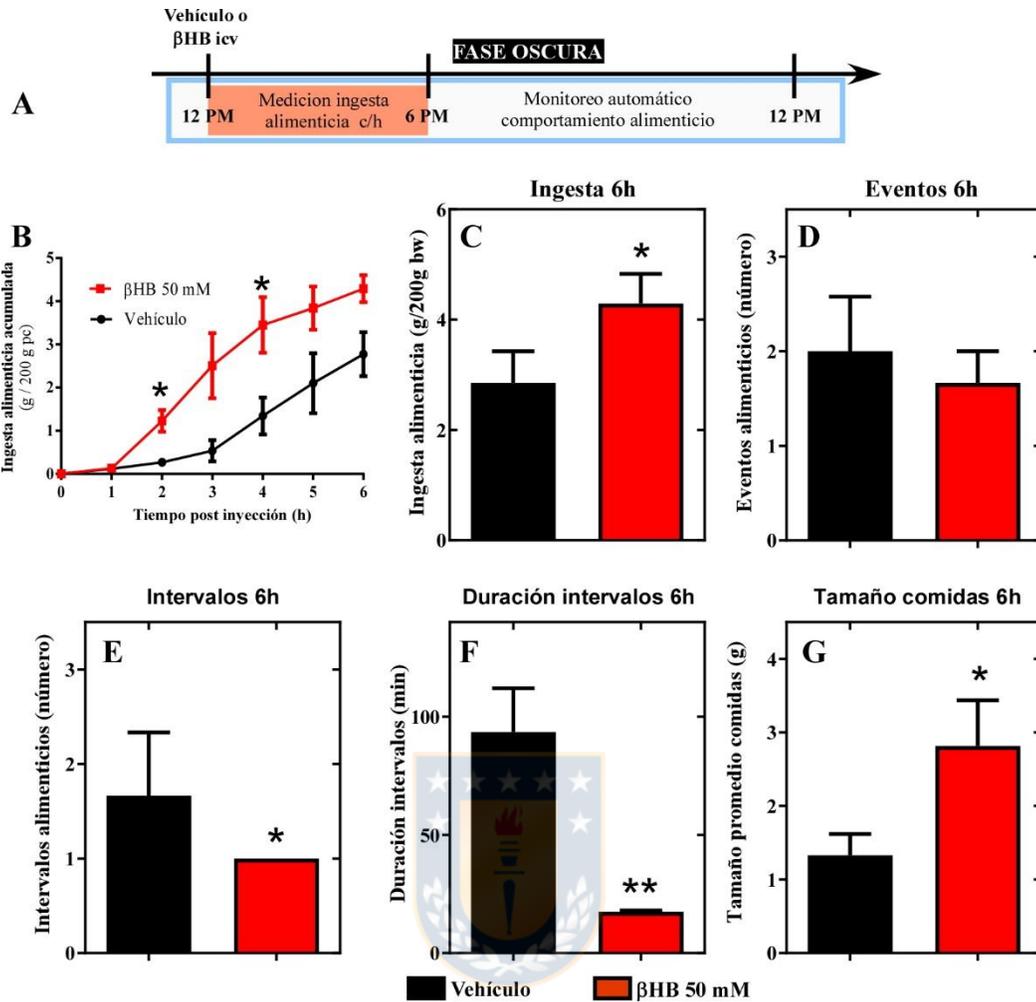


Figura 33: Comportamiento alimenticio de ratas inyectadas con βHB. **A.** Ratas macho adultas fueron canuladas al 3V basal y luego de 5 d inyectadas icv con 10 μL de βHB 50 mM o LCRa + vehículo. Durante las primeras 6h post inyección, se realizó un seguimiento manual de la ingesta alimenticia mientras que el resto del tiempo se realizó un monitoreo automático. **B:** Cambios en la ingesta alimenticia acumulada en animales inyectados con vehículo (línea negra) o βHB (línea roja). **C:** Ingesta alimenticia acumulada al cabo de las primeras 6h de monitoreo. **D-E:** Numero de EA (D) e intervalos (E) en cada condición. **F:** duración promedio de los intervalos. **G:** Tamaño promedio de cada comida. N=3. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

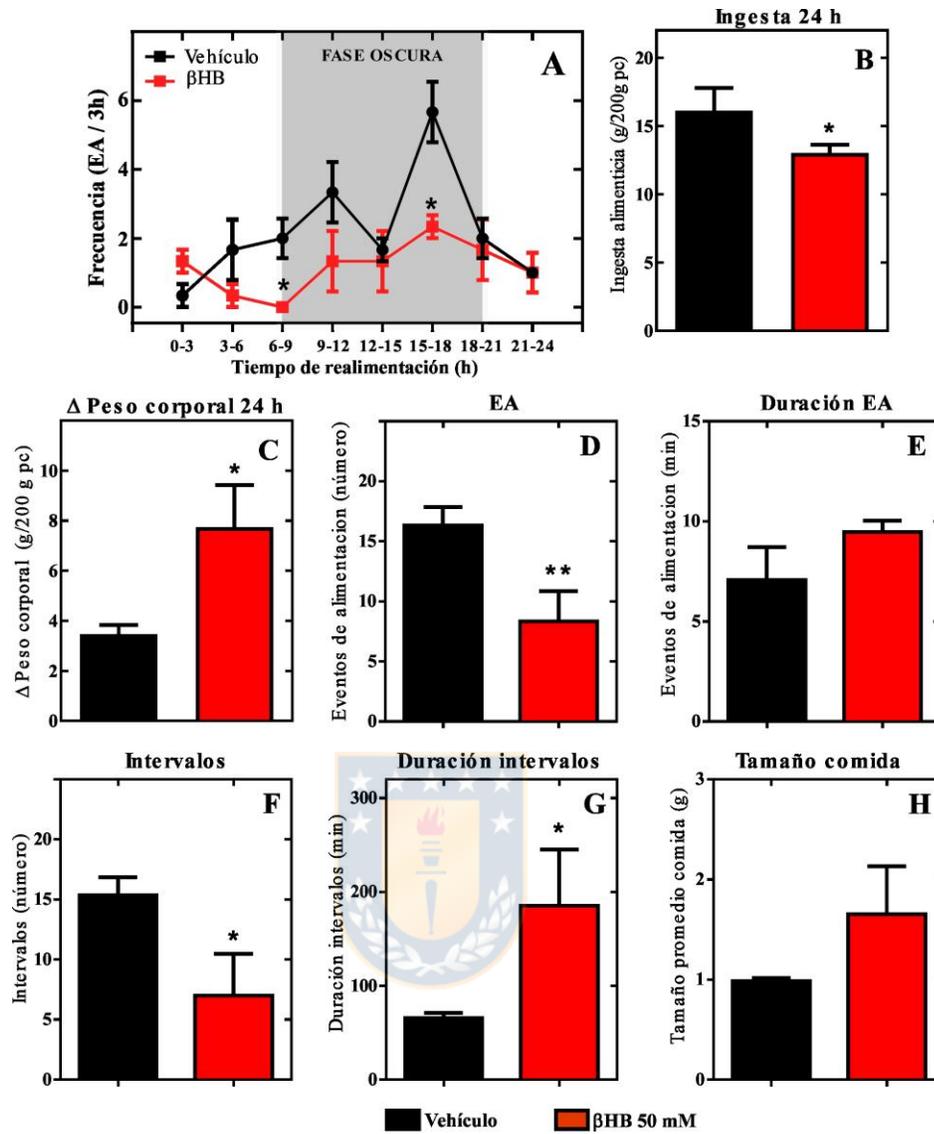


Figura 34: Cambios en el comportamiento alimenticio de ratas inyectadas con β HB durante 1 día post inyección. A: Frecuencia alimenticia (EA/3h) durante las 24 h post inyección con vehículo (línea negra) o β HB (línea verde). **B-G:** Ingesta alimenticia acumulada (B), cambio en el peso corporal (C), número de eventos alimenticios (D), duración de los EA (E), número de intervalos inter-comidas (F), duración promedio de estos últimos (G) y tamaño promedio de las comidas (H). n=3. * p <0.05, ** p <0.01.

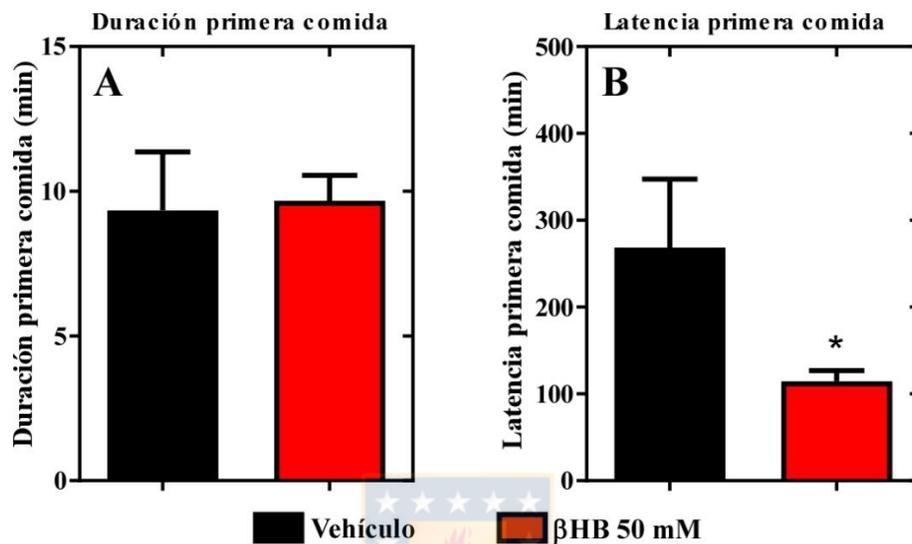


Figura 35: Efectos de β HB icv sobre la avidez alimenticia de ratas. Luego de la inyección icv de vehículo (barras negras) o β HB (barras rojas), se midió la duración promedio (A) y la latencia (B) de la primera comida. N=3, * p <0.05

9. Inmunolocalización de HCA2 en hipotálamo de rata y ratón.

Dados estos resultados, sumado a la detección por RT-PCR del mensajero de HCA2 en hipotálamo total de rata (**Fig. 27D**), creemos que β HB sería capaz de inhibir la actividad de neuronas POMC a través de la señalización sobre estos receptores. Mediante inmunofluorescencia, hemos observado una fuerte inmunorreacción de HCA2 tanto en tanicitos α 2 como en las neuronas con las que sus procesos toman contacto (**Fig. 36A-C**). En una porción más ventral del hipotálamo, la reacción glial descende, existiendo un predominio de la expresión parenquimal de este receptor (**Fig. 36D-F**).

Debido a que no conocemos la identidad de las células positivas para HCA2, evaluamos mediante microscopia confocal la colocalización de HCA2 con neuronas POMC, lo que indicaría que estas neuronas pueden recibir señalización de β HB (glial o periférico) de manera directa. Para esto, utilizamos el ratón transgénico POMC-EGFP e hicimos marcación doble anti-HCA2 / anti-vimentina. Los resultados muestran diferencias importantes en relación con la localización de este receptor en rata. En primer lugar, destaca una prácticamente nula expresión de este receptor en los tanicitos (α o β), no existiendo colocalización con el marcador vimentina (**Fig. 37A, B, E**). En segundo lugar, a nivel del ARC existe una mínima detección de somas neuronales positivos para HCA2, mientras que si se detectan procesos neuronales que rodean neuronas POMC (**Fig. 37C**). En este núcleo no logramos detectar somas de neuronas POMC que expresaran en sus membranas este receptor, por lo que es poco probable que, en esta especie, las neuronas POMC reciban señalización de β HB en forma directa (**Fig. 37B-C**).

Al analizar la EM de estos ratones, destaca una fuerte expresión para HCA2 (**Fig. 37A, E**), sin embargo, tal como ocurre en el ARC la inmunorreacción de este receptor no colocaliza con vimentina (**Fig. 37E, G**), por lo que no correspondería a tanicitos $\beta 2$. A diferencia del ARC, sin embargo, en esta zona si existen neuronas POMC que son también positivas para HCA2 (**Fig. 37D**, flechas). Cabe destacar que en esta región existen otros tipos celulares aun no identificados, que también son positivos para este receptor.



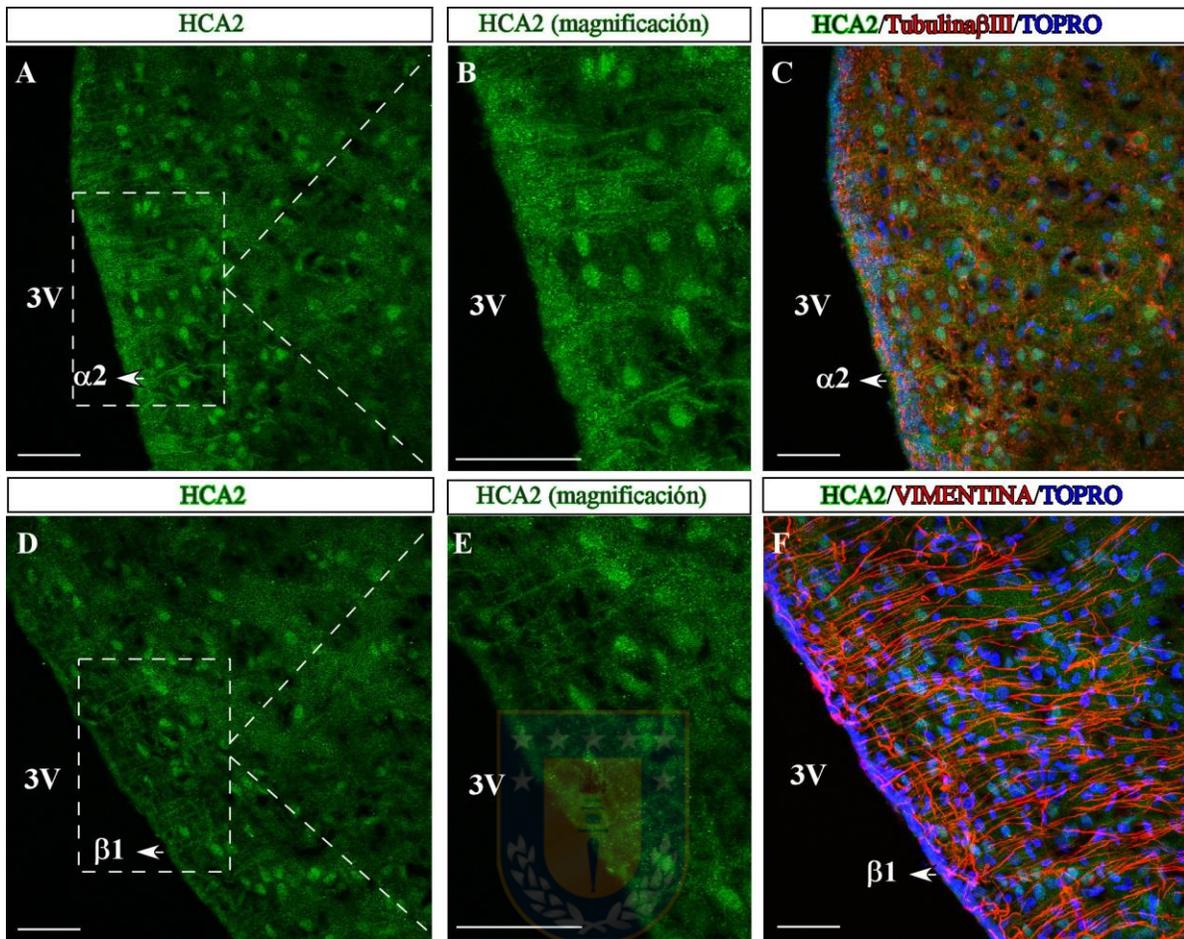


Figura 36: Inmunolocalización de HCA2 en hipotálamo basal de ratas. A-C: Inmunofluorescencia asociada a microscopía confocal de cortes coronales de hipotálamo de rata al nivel de tanicitos α , inmunomarcados con anti-HCA2 (verde) y anti-tubulina β 3 (rojo). **D-F:** Inmunofluorescencia asociada a microscopía confocal de cortes coronales de hipotálamo de rata a nivel de tanicitos β , marcadas con anti-HCA2 (verde) y anti-vimentina (rojo). B y E son magnificaciones 1:2 de A y D, respectivamente. Se utilizó topro-3 como marcador nuclear (azul). **3V:** tercer ventrículo. Barra: 50 μ m.

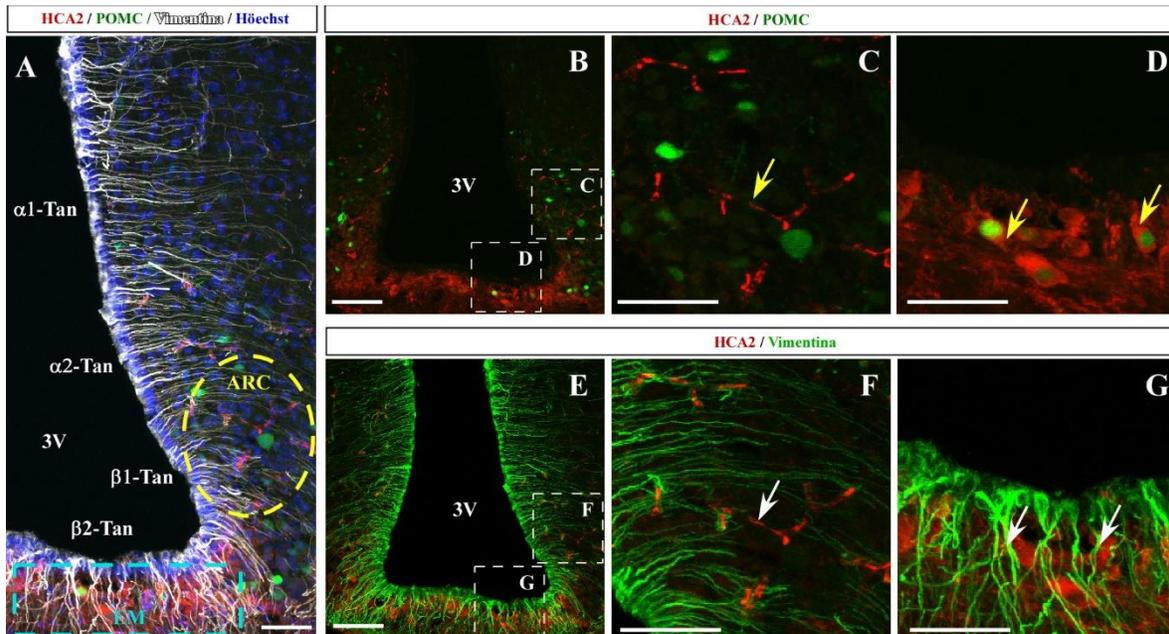


Figura 37: Inmunolocalización de HCA2 en hipotálamo de ratones POMC-EGFP. **A.** Inmunofluorescencia asociada a microscopía confocal de cortes coronales de ratón marcados con anti-HCA2 (rojo), anti-vimentina (blanco), EGFP como marcador de células POMC (verde) y Hoechst como marcador nuclear (azul). Barra 50 μm . **B.** Colocalización de HCA2 (rojo) con EGFP (verde) en el hipotálamo basal. Barra 100 μm . **C-D.** Magnificación de B a nivel del ARC (C) y de la EM (D). Barra 50 μm . **E.** Colocalización de HCA2 (rojo) con vimentina (verde) en el hipotálamo basal. Barra 100 μm . **F-G.** Magnificación de E a nivel del ARC (F) y de la EM (G). Barra 50 μm .

V. DISCUSIÓN

Capítulo 1: Participación de GGRP en el glucosensing hipotalámico

1.1. Rol de GGRP en la traslocación de GK dependiente de glucosa

Nuestros resultados previos indican que, en los mismos animales, 30 min de hiperglicemia inducen una localización celular de GK opuesta entre hepatocitos y tanicitos (Salgado *et al.* 2014). Asociado a esto, en esta tesis observamos que, en forma endógena, los tanicitos en cultivo expresan 5 veces más GK que GGRP a nivel de mensajero, mientras que en hepatocitos la relación es inversa. Además, demostramos que la sobreexpresión de GGRP en tanicitos vuelca esta dinámica de traslocación en la dirección en la que ocurre en hígado, esto es, GK saliendo del núcleo en respuesta a hiperglicemia. Estos resultados sugieren que la diferencia de expresión relativa podría ser responsable, al menos en parte, de la traslocación opuesta que experimenta GK en tanicitos y hepatocitos.

Por otro lado, cuando GGRP se silencia en los cultivos de tanicitos pareciera que existe una caída global en la inmunorreacción de GK, sin embargo, nuestros resultados indican que la expresión de GK no se modifica significativamente cuando se silencia GGRP. Postulamos que esta caída en la inmunorreacción de GK se debe principalmente a un aumento en la localización citoplasmática de esta enzima que se traduce en una dilución de la señal detectada. Por esta razón, la cuantificación de la relación de intensidad de fluorescencia entre el núcleo y el citoplasma fue una buena elección para evaluar traslocación de GK. Sumado a esto, cuando GGRP fue silenciada en tanicitos la relación N/C de la localización intracelular de GK no cambia significativamente en respuesta a glucosa y se

asemeja a lo informado en células beta pancreática (Bosco *et al.* 2000). Aun cuando este es el primer reporte que muestra que el silenciamiento de GGRP impide la traslocación de GK, estos resultados están en concordancia con reportes en literatura que señalan que: i) en hígado de gatos, los que endógenamente no expresan GGRP, GK siempre se localiza en el citosol (Hiskett *et al.* 2009); ii) GK no posee la capacidad de entrar al núcleo por si sola cuando GGRP presenta mutaciones críticas para su interacción con GK (Farrelly *et al.* 1999; Noma *et al.* 1996; Toyoda *et al.* 1999); y iii) en estudios en los que se ha inducido la expresión exógena de GK y GGRP en sistemas sin capacidad gluconesora, se ha demostrado que GGRP es indispensable para favorecer la traslocación nuclear de GK en baja glucosa (Bosco *et al.* 2000; Shiota *et al.* 1999).

Por otra parte, nuestros resultados muestran que sobreexpresando GGRP clonada desde tanicitos en las células 832-13, se induce una localización nuclear de GK. El hecho que esta traslocación nuclear se presente cuando las células son cultivadas a baja glucosa, como ocurre en hepatocitos (Brown *et al.* 1997; Chu *et al.* 2004), refuerza la idea que la proporción de ambas proteína es más importante que el origen de la GGRP que se sobreexpresa (Salgado *et al.*, 2019).

Aun cuando nuestros resultados indican que GGRP puede salir del núcleo, la mayoría de los autores señala que, al menos en hepatocitos, GGRP permanece en el núcleo y sólo GK posee la capacidad de translocarse entre núcleo y citoplasma (Brown *et al.* 1997; de la Iglesia *et al.* 1999; Toyoda *et al.* 1997). Sin embargo, ha sido demostrado que GK no posee una secuencia de localización nuclear, por lo que algunos autores han propuesto un mecanismo denominado “*piggy back*”, en el

cual GGRP “acarrea” a GK al núcleo en baja glucosa, apoyando la salida transitoria de GGRP (Mukhtar *et al.* 1999; Shiota *et al.* 1999).

Nuestros resultados indican que en tanicitos, GK y GGRP pueden ser detectadas tanto en el núcleo como en el citoplasma y que a alta glucosa ambas se localizan preferentemente en el núcleo, lo cual resulta controversial desde un punto de vista estructural y funcional. A nivel estructural, se ha demostrado que, en el complejo hepático, GGRP se une a una conformación super abierta de GK, la que es más estable en baja glucosa (Choi *et al.* 2013). Funcionalmente, es ampliamente aceptado que esta regulación guarda relación con la eficiencia energética que implica favorecer la desfosforilación y el exporte de la glucosa en ayuno, situación en la que ambas proteínas interactúan en el núcleo, mientras que en hiperglicemia se requiere que GK se encuentre activa para favorecer la obtención de energía (Hale *et al.* 2015; Kaushik & Kaushik 2019). Para explicar las diferencias observadas en tanicitos, hemos planteado que en respuesta a incrementos en glucosa, luego de 30 min se induce un arresto nuclear de GK, el cual podría cumplir un rol regulatorio para frenar la señalización celular generada por incrementos de la glucosa cerebral.

En este escenario, se hizo importante dilucidar si GK y GGRP pueden interactuar en tanicitos, sin modificar la expresión relativa de estas proteínas. De este modo, evaluamos la interacción endógena de este par proteico mediante PLA y Co-IP. Mediante PLA demostramos que existe interacción GK-GGRP y mediante co-IP que ambas forman parte de un complejo. En concordancia con nuestros antecedentes que señalan que ambas proteínas colocalizan a los 30 min de incubación con alta

glucosa, detectamos que el número de eventos PLA nucleares aumenta significativamente en esta condición. Sin embargo, también aumentan los eventos citoplasmáticos, y, es más, son mas abundantes que los nucleares, apoyando fuertemente la noción de que la interacción GK-GKRP en tanicitos no sigue los mismos patrones que la interacción en hígado. A través de co-IP no detectamos diferencias en el nivel de co-precipitación de este par proteico entre baja y alta glucosa. Esta discrepancia podría atribuirse a ciclos de interacción / disociación diferenciales entre el núcleo y el citoplasma, por lo que realizamos fraccionamiento subcelular previo a la reacción de inmunoprecipitación. De igual forma que en la evaluación global, no fue posible evidenciar diferencias significativas en la coprecipitación de GK y GKRP en respuesta a glucosa en núcleo ni en citoplasma. Esta data, al igual que la obtenida mediante inmunofluorescencia, puede explicarse por el bajo nivel proteico de GKRP en tanicitos y el gran volumen de su citoplasma, lo que impediría realizar una evaluación certera del nivel de coprecipitación de proteínas citosólicas. Por otra parte, el poder de amplificación de la señal que se puede obtener por PLA, permite la detección de dichos eventos como puntos fluorescentes intensos, pudiendo observar eventos de interacción aislados y de manera endógena, lo que le ha conferido popularidad creciente en biología celular, farmacología, inmunología, proteómica, entre otros (Gomes *et al.* 2016; Gullberg *et al.* 2004; Jalili *et al.* 2018). A pesar de estas ventajas, algunos autores han reportado limitaciones asociadas con el uso de anticuerpos que bloquean los sitios de interacción entre el par proteico en estudio (Ellebaek *et al.* 2016). En un estudio que evalúa la real significancia de los eventos PLA, otro grupo de investigación ha demostrado que en una variedad de condiciones irrelevantes en términos de

interacción proteína-proteína, se pueden encontrar señales PLA positivas (Alsemarz *et al.* 2018). De esta manera, es necesario considerar la posibilidad de que existan eventos PLA inespecíficos en nuestro estudio, sin embargo, no existen razones para sospechar que estos eventos PLA, eventualmente falsos, varíen en respuesta a la concentración de glucosa en los cultivos, como indican nuestros resultados.

En base a nuestros resultados por PLA, observamos que esta interacción en tanicitos, es dependiente de la concentración de glucosa extracelular, pero de manera opuesta a lo que se ha planteado en hepatocitos (Salgado *et al.* 2014). Esta diferencia de sensibilidad a glucosa tejido específico puede deberse a que en tanicitos se expresa la isoforma pancreática de GK y no la hepática, las que difieren en 15 aminoácidos de su extremo amino terminal. Esta variación podría condicionar que la interacción GK-GKRP se module de manera distinta en respuesta a glucosa o algún subproducto metabólico de este azúcar. Al respecto, se sabe que en hígado la interacción responde a ésteres de fructosa, sin embargo, se ha demostrado que en cerebro esta modulación no tiene lugar (Alvarez *et al.* 2002).

En este trabajo de tesis utilizamos 3 modelos celulares, hepatocitos, células beta pancreáticas (832-13) y tanicitos, lo que nos permitió plantear que la respuesta a glucosa dependería de las concentraciones relativas de GK y GKRP (Salgado 2019). En el primero, la localización de GKRP es eminentemente nuclear mientras que GK trasloca en función de la concentración de glucosa, como ya mencionamos. En células 832-13 que expresan GKRP exógenamente, esta última se localiza preferentemente citosólica y GK se moviliza en respuesta a glucosa

similar a los hepatocitos. Por último, en tanicitos GGRP se localiza en ambos compartimentos y GK transloca de manera opuesta a los hepatocitos. Una explicación a esto puede estar en que el par proteico del hígado es diferente al de los otros modelos ya que en los 2 últimos GK es la isoforma pancreática y no la hepática (Roncero *et al.*, 2000; Salgado *et al.* 2014). Esto también podría condicionar que otra proteína forme parte del complejo y participe de la regulación de la localización y/o interacción en respuesta a glucosa. Podríamos especular que la presencia de esta eventual proteína podría determinar que GK adopte la conformación afin por GGRP (abierta) aún en presencia de una alta concentración de glucosa, como se muestra en la **figura 38**. Esta hipótesis está en concordancia con los resultados previos que señalan que GGRP es un inhibidor no competitivo de GK en tanicitos, potenciando la posibilidad que GK pueda tener actividad aun en presencia de GGRP.



1.2. Función de GGRP en el comportamiento alimenticio de animales

Nuestros datos indican que animales KD para GGRP en tanicitos comen significativamente menos alimento y presentan una reducción también significativa en el peso corporal, en comparación con ratas controles. Sumado a esto, los animales KD para GGRP presentaron alteraciones en la expresión de neuropeptidos que están en concordancia con la reducción de los parámetros de alimentación descritos. Si consideramos además los resultados de localización de GK obtenidos en cultivo primario de tanicitos, podríamos predecir que producto de este silenciamiento, GK permanece en el citoplasma de estas células, donde es catalíticamente activa.

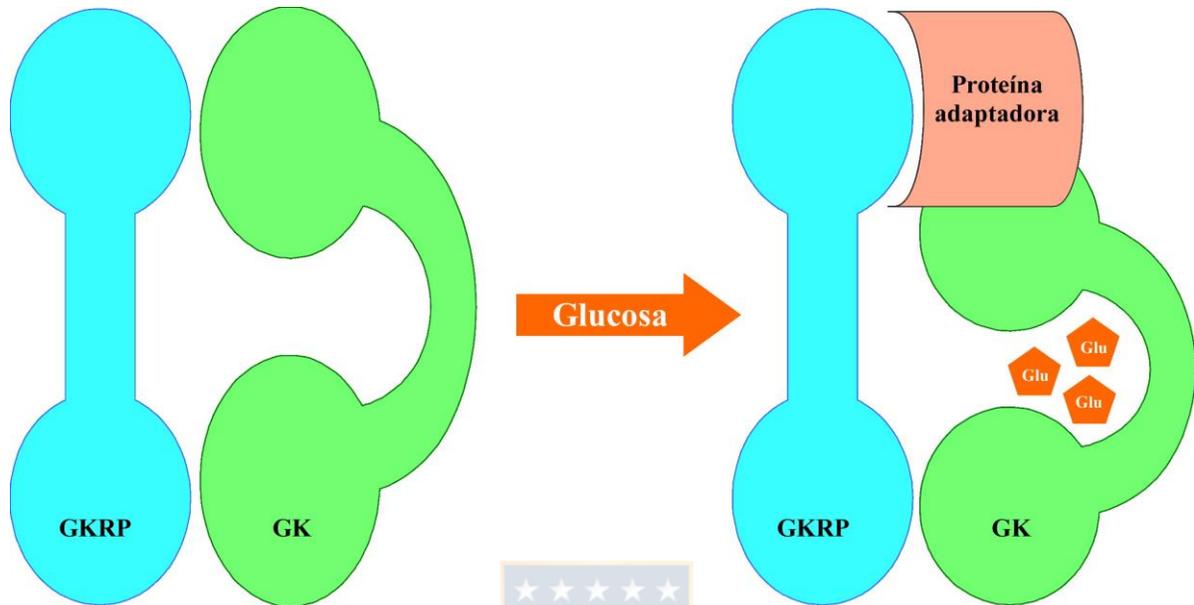


Figura 38: Modelo propuesto de interacción GK-GKRP en presencia de glucosa en tunicitos. Se ha demostrado que GKRK presenta mayor afinidad por la conformación abierta de GK la que adoptada en baja glucosa. Nuestra evidencia indica que en presencia de glucosa GK interacciona con GKRK aun cuando GK estaria en su conformación cerrada (descrita para la isoforma hepática). Una posible explicación sería la presencia de una proteína adaptadora, la que le permite a GK interaccionar con GKRK aun en la conformación cerrada. Dada la diferencia de 15 aa en el extremo N-terminal de GK de tunicitos respecto a la isoforma hepática, es posible que en esta región ocurra la eventual interacción con una proteína adaptadora.

Bajo nuestro paradigma, la glucosa sería constantemente metabolizada, aumentando de manera sostenida la producción de lactato y de esta manera favoreciendo la activación de neuronas anorexigénicas, como las que expresan POMC/CART. En este escenario, esperábamos que al sobreexpresar GGRP en tanicitos, las ratas presentarían un comportamiento opuesto, esto es, una inhibición de la respuesta anorexigénica y en consecuencia una mayor ingesta alimenticia, como se describe para el silenciamiento de GK en tanicitos (Uranga *et al.* 2017). En contraste, nuestros resultados indican que los animales solamente presentaron alteraciones en el primer evento alimenticio lo que sugiere que la sobreexpresión de GGRP promueve una mayor avidez alimenticia después del ayuno. Si consideramos los resultados de localización de GK, obtenidos en cultivo de tanicitos que sobreexpresan GGRP a niveles acordes con lo que ocurre en hígado, podríamos esperar que en los animales ayunados que sobreexpresan GGRP la enzima sufra compartimentalización nuclear, inhibiéndose, lo que guarda relación con la avidez observada en la primera comida. Sin embargo, cuando los animales superan la primera hora de realimentación, su comportamiento alimenticio es igual al del grupo control, sugiriendo que GK viaja al citoplasma y genera una respuesta anorexigénica normal.

Si consideramos que aun logrando una sobreexpresión de GGRP de más de 20 veces su nivel endógeno, no detectamos grandes cambios en el comportamiento alimenticio, podríamos especular que esta proteína no posee un rol independiente de GK en el comportamiento alimenticio. Además, el efecto de la sobreexpresión que solo se observa en ayuno, sugiere que GGRP podría regular la producción de

alguna señal metabólica que promueva la ingesta post ayuno. Apoyando este postulado, se ha demostrado que la producción hepática de cuerpos cetónicos induce una anticipación de la ingesta postayuno (Chavan *et al.* 2016). Tomados juntos, estos resultados nos indican que la inhibición de GKR en tanicitos podría ser un blanco terapéutico para potenciar la saciedad en pacientes con problemas de obesidad.

Capítulo 2: Comunicación metabólica entre tanicitos y neuronas POMC

2.1. Roles opuestos de lactato y β HB sobre la actividad de neuronas que regulan el comportamiento alimenticio.

En línea con publicaciones previas, corroboramos que en el ARC coexisten poblaciones diversas de células, de las cuales las neuronas glucosensoras corresponden a una población minoritaria (Fioramonti *et al.* 2007; Kang *et al.* 2004; Yang *et al.* 1999; Yang *et al.* 2004). Por esto, fue esencial la utilización de un modelo transgénico para poder distinguir neuronas protagonistas de esta regulación, tales como las neuronas POMC. En apoyo a nuestra teoría de acoplamiento metabólico tanicito-neurona, hemos comprobado que las neuronas POMC responden eficientemente a lactato, aumentando su FPA. Esta respuesta es más robusta y rápida que a glucosa, lo que concuerda con el mecanismo de sensing indirecto propuesto por nosotros y otros (Ainscow *et al.* 2002; Elizondo-Vega *et al.* 2015; Thorens 2012), en el cual se requiere un mayor tiempo ya que sería la glía la que metabolizaría glicolíticamente la glucosa y luego esta sería transferida a la neurona a la forma de lactato. Esto es también apoyado por las evidencias que indican que las neuronas no poseen transportadores de glucosa de

alta capacidad (Garcia *et al.* 2003) y presentan una baja actividad glicolítica (Herrero-Mendez *et al.* 2009). Además, apoya esta teoría nuestra data electrofisiológica donde demostramos que las neuronas POMC no responden a glucosa cuando se inhibe el transporte de monocarboxilatos a través de MCTs, lo que se relaciona con reportes previos que indican que la captación y metabolismo de lactato es necesario para la generación de una respuesta anorexigénica (Lam *et al.* 2008).

De manera opuesta, cuando las neuronas POMC son expuestas a β HB, se evidencia una leve hiperpolarización acompañada de una caída en la FPA. Sorprendentemente, los resultados mostraron que luego de revertido este estímulo, las neuronas POMC se activan fuertemente, aumentando su FPA casi 3 veces. Es posible que en los primeros instantes β HB induzca una respuesta inhibitoria rápida, posiblemente mediada por señalización extracelular, mientras que luego de una acumulación de este metabolito, este se incorpora a las neuronas generando una respuesta opuesta, activándolas fuertemente. Al respecto, una revisión de datos transcriptómicos publicados recientemente (Campbell *et al.* 2017), sugieren que el receptor de β HB, HCA2, no está presente en las neuronas POMC de ratón. Esto sumado al hecho de que nuestros datos de inmunolocalización *in situ* no son tan concluyentes, nos hacen pensar que es posible que β HB provoque la estimulación de neuronas AgRP y estas a su vez sean las responsables de inhibir a neuronas POMC. Aun cuando reportes en literatura han demostrado que estas neuronas no responden cuando son perfundidas con β HB 5 mM (Carneiro *et al.* 2016), es importante destacar que estos autores realizaron esta evaluación en rebanadas

hipotalámicas de ratón mantenidas a baja glucosa (2.5 mM), lo que podría indicar que las neuronas AgRP ya se encontraban mayormente activas.

Finalmente, cultivos primarios de neuronas hipotalámicas expuestas a lactato o β HB, muestran hallazgos relevantes, los cuales están en concordancia con lo previamente descrito. A pesar de que este cultivo presenta un bajo porcentaje de glía hipotalámica, destaca en primer lugar que la expresión de neuropéptidos no se ve afectada significativamente en respuesta al incremento de glucosa apoyando la noción que para que las neuronas POMC puedan responder a glucosa, es necesario que esté presente el componente glial. Sin embargo, en respuesta a lactato, observamos un aumento significativo en la expresión de POMC, lo que apoya los hallazgos obtenidos mediante electrofisiología y los reportes que indican que este metabolito induce una respuesta anorexigénica a nivel hipotalámico (Allard *et al.* 2013; Kokorovic *et al.* 2009; Lam *et al.* 2008). Además, es importante destacar que β HB produce efectos diferenciales sobre la actividad de neuronas POMC, dependiendo de la concentración a la que estas son expuestas. Cuando β HB es bajo (1 mM), las neuronas POMC se inhiben, mientras que cuando la concentración es mayor (10 mM), la expresión de POMC no cambia significativamente luego de 2 h del estímulo. Además, 1 mM de β HB fue suficiente para aumentar la expresión de NPY, siendo plausible pensar que, en estas condiciones y a diferencia de lo reportado por Carneiro *et al.* (2016), la inhibición de las neuronas POMC es dependiente de la activación de neuronas NPY/AgRP, las cuales se conoce son capaces de inhibir mediante transmisión gabaérgica a neuronas POMC (Han *et al.* 2018). Nuestros resultados no permiten descartar que exista una interneurona distinta de la población que expresa NPY/AgRP que sea

responsable de sensar la hipoglicemia y como consecuencia contribuir a la inhibición de neuronas POMC.

2.2. Cetogénesis en tanicitos

En un contexto metabólico, se ha reportado que los tanicitos son células altamente versátiles, ya que expresan enzimas claves para llevar a cabo la interconversión de diversos metabolitos u hormonas relacionadas con la homeostasis energética (Prevot *et al.* 2018). Considerando que β HB puede inhibir a las neuronas POMC, y que los tanicitos en cultivo expresan enzimas que participan en la síntesis de cuerpos cetónicos, nos preguntamos si los tanicitos, podrían realizar cetogénesis. Los resultados mostraron que tanicitos en cultivo son capaces de producir y liberar cantidades detectables de β HB, producción que depende de la actividad de AMPK, tal como ha sido informado en cultivos de astrocitos corticales (Blazquez *et al.* 1999). Adicionalmente, hemos encontrado que la producción glial de β HB depende directamente de la actividad y/o localización subcelular de GK, ya que cuando se sobre expresa GGRP, la cetogénesis aumenta drásticamente. De igual manera, cuando se inhibe el catabolismo de la glucosa en los tanicitos, al ser incubados a baja concentración de glucosa, baja la producción local de ATP, llevando a la activación de AMPK y la producción de β HB. Interesantemente, esto no se observó en cultivo primario de astrocitos, donde la incubación con distintas concentraciones de glucosa no afecta la tasa cetogénica, lo que apoya la idea de que los tanicitos y no los astrocitos cumplen una función relevante en mantener la homeostasis energética en el hipotálamo. Resulta interesante destacar que cuando se sobreexpresa GGRP, la producción de β HB es alta aun inhibiendo AMPK,

sugiriendo que en tanicitos GGRP podría además cumplir un rol cetogénico independiente de AMPK. Sin embargo, no podemos descartar que el inhibidor utilizado (CpC) no sea suficientemente selectivo para inhibir a AMPK, dado que se ha informado que a la concentración utilizada, CpC es capaz de modular AMPK, pero también otras vías de señalización dependientes de BMP y VEGF (Dasgupta & Seibel 2018). Cuando se silencia GGRP, se produce una disminución en la tasa cetogénica de los tanicitos, aun activando AMPK, lo que refuerza el postulado de que GGRP puede cumplir un rol en este proceso independiente de esta AMPK.

En hígado, es ampliamente aceptado que la ruta cetogénica se activa como consecuencia de la alta producción de acetil-coA generado producto de la β -oxidación de ácidos grasos, en circunstancias que la gluconeogénesis limita la oferta de oxalacetato para mantener el ciclo de Krebs. A pesar de que no conocemos si los tanicitos son capaces de exportar glucosa como lo hacen los hepatocitos, si hemos comprobado que estas células son altamente glicolíticas (Cortes-Campos *et al.* 2011; Orellana *et al.* 2012), a pesar del alto número de mitocondrias que ellas poseen (Rodríguez *et al.* 2005). En una situación normo o hiperglicémica, creemos que los tanicitos utilizan los ácidos grasos de sus gotas lipídicas, abundantes en ellos (Akmayev *et al.* 1973), y mediante β -oxidación contribuyen a la demanda energética del parénquima cerebral, mientras que la glucosa incorporada podría ser metabolizada a lactato, el cual es utilizado principalmente como una señal anorexigénica en el ARC. Por el contrario, bajo un ayuno prolongado, creemos que los tanicitos sensan la hipoglicemia y activan eficientemente la generación de cuerpos cetónicos, condensando el acetil-coA

producido de la β -oxidación de ácidos grasos. No conocemos a ciencia cierta si el β HB producido en la tanicitos tiene como finalidad principal la señalización homeostática o podría ser utilizado además como un sustrato metabólico relevante a nivel cerebral en ayuno, cómo ocurre durante los primeros días de vida (de Boissieu *et al.* 1995).

En una publicación muy reciente, se demostró que los tanicitos son capaces de sensor ácidos grasos liberados a la circulación en una situación de ayuno, señalizando a neuronas del ARC a través de FGF21 (Geller *et al.* 2019). De manera interesante, se ha demostrado que la expresión de esta hormona metabólica en tanicitos se favorece en presencia de palmitato y especies reactivas de oxígeno (ROS), las que actuarían como un *feed back* negativo para detener la lipólisis periférica. Resulta interesante destacar que i) la dependencia de AMPK para su síntesis; ii) la condición en la que se produce (ayuno); iii) la dependencia de ácidos grasos saturados; y iv) el efecto anti lipolítico de FGF21, son características y funciones que comparte con β HB cuando este último activa vías de señalización dependiente de HCA2 (Ahmed 2011).

Respecto a FGF21, se ha propuesto que sus efectos son mediados por señalización paracrina hacia neuronas ubicadas en núcleos hipotalámicos cercanos, tales como las que expresan TRH, AVP o GHRH. No conocemos si de manera análoga β HB pudiese generar alguna modulación sobre la actividad de estas neuronas, como si creemos ejerce de manera directa o indirecta, sobre neuronas POMC del ARC, en base a nuestros resultados.

2.3. Efectos de β HB icv sobre el comportamiento alimenticio

Finalmente, en esta tesis determinamos el efecto de β HB icv sobre el comportamiento alimenticio de ratas adultas. Nuestros resultados mostraron que en las primeras 6h post inyección, los animales comen significativamente más que el grupo control, disminuyendo drásticamente la duración de los intervalos inter-comidas lo que sugiere menor saciedad. Estos hallazgos están en concordancia con nuestros resultados de electrofisiología que indicaron que β HB genera la inhibición de las neuronas POMC. Ya que no realizamos registros electrofisiológicos sobre las neuronas AgRP, no podemos descartar que el efecto observado en los animales se sustente en la inducción directa de hambre. Transcurridas 24h de la inyección icv de β HB, al analizar la data de manera acumulativa, nos encontramos con una disminución de la ingesta alimenticia lo que paradójicamente estuvo acompañado de un aumento significativo del peso corporal. Durante ese tiempo las ratas presentaron un número menor de intervalos, sin embargo, estos intervalos fueron significativamente más largos que en el grupo control, lo cual podría indicar que alcanzan mayor saciedad en respuesta a β HB. Debido a que nuestro equipo para monitorear ingesta no permite evaluar la cantidad de comida ingerida en cada visita al comedero, creemos que sería aventurado dar una razón por la que estas ratas aumentan más de peso que los inyectados con el vehículo, sin embargo, es posible asumir que la alta ingesta observada durante las primeras 6 h fue suficiente para generar el aumento de peso corporal detectado. En línea con esta teoría, se ha reportado que el LCR ventricular sufre recambio completo 4-5 veces por día (Telano & Baker 2019), por lo que es

probable que el efecto de una inyección única de β HB se pierda a largo plazo y sólo observemos respuestas compensatorias. Aún resta por conocer el comportamiento alimenticio de estos animales producto de una infusión constante de β HB, lo que podría ayudarnos a entender el funcionamiento hipotalámico en respuesta a una condición crónica, como en la diabetes mellitus. Adicionalmente, es necesario mencionar que este estudio posee un bajo n experimental (n=3), por lo que, a pesar de las alta precisión de los datos obtenidos (DS muy pequeñas), sería relevante aumentar el tamaño muestral del estudio con el fin de obtener conclusiones más certeras.

A la fecha, el único estudio donde se analizó la relación entre cuerpos cetónicos cerebrales y la ingesta alimenticia, se llevó a cabo mediante perfusión intracarotidea de β HB en ratones (Carneiro *et al.* 2016). En este estudio, se evidenció un aumento de ingesta alimenticia luego de 12 h de infusión de β HB en ratones, lo que se asoció con un aumento en la expresión de neuropéptidos orexigénicos y activación de AMPK. A pesar de que estos investigadores demuestran que β HB no es capaz de modificar la actividad de neuronas NPY, nuestros resultados de expresión de neuropéptidos mediante qPCR indican que β HB induce un incremento en la expresión de NPY en neuronas hipotalámicas. En base a nuestros resultados electrofisiológicos, creemos que el aumento en la ingesta alimenticia generado en las primeras horas post inyección icv de β HB, se debe a la inhibición transitoria de neuronas POMC, ya sea de manera directa o indirecta. Debido a que no hemos logrado establecer que neuronas POMC-EGFP colocalicen con el receptor HCA2, creemos que esta inhibición podría ser de tipo

indirecto, posiblemente mediante la activación de una neurona gabaérgica. Ahora bien, no se puede descartar que los efectos orexigénicos observados para β HB se deban a la incorporación y metabolización intracelular de este, ya sea en neuronas POMC o NPY/AgRP.

En la figura 39 se resumen los principales hallazgos de esta tesis, relacionando el nivel de expresión de GKRP en tanicitos con la producción de gliotransmisores metabólicos y la actividad de neuronas POMC y AgRP. En la parte superior (fondo blanco), se muestra como en una situación de ayuno los tanicitos reducen su metabolismo glicolítico activando la β -oxidación de ácidos grasos hasta acetil-coA. Debido a la baja oferta de oxalacetato disponible, creemos que los tanicitos toman este acetil-coA y lo condensan hasta β HB, proceso que es potenciado, al menos en parte, por la enzima AMPK. Nuestra hipótesis original era que en estas circunstancias β HB pudiese inhibir a neuronas POMC en un mecanismo mediado por HCA2/G_i. Sin embargo, a pesar de la expresión de este receptor en el parénquima hipotalámico, su pobre colocalización con neuronas POMC nos hacen presumir que esta regulación es más compleja, siendo plausible hipotetizar la presencia de una interneurona glutamatérgica positiva para HCA2, la cual en presencia de β HB liberado por los tanicitos en ayuno, se inhiba provocando la inhibición de neuronas POMC con las que hace sinapsis. Una posibilidad alternativa es que β HB pudiese activar de manera directa una vía de señalización desconocida, que termine con la activación de neuronas NPY/AgRP, lo cual está en concordancia con nuestros resultados en cultivo primario de neuronas hipotalámicas. A pesar de que β HB pudiese ingresar a neuronas POMC a través de

MCT2 ($K_m = 1.2$ mM), desconocemos las concentraciones de β HB producidas *in vivo* por los tanicitos y, en consecuencia, la posibilidad de incorporarse a las neuronas POMC.

Cuando se silencia GGRP en tanicitos, la mayor actividad catalítica de GK y su localización preferentemente citoplasmática concuerda con una mayor producción de lactato. En tal condición las neuronas POMC son activadas incluso tras un ayuno prolongado. La mayor producción de ATP generado en estas circunstancias impactaría en una menor actividad de la enzima AMPK y en consecuencia en una menor tasa cetogénica en los tanicitos, en comparación a la situación control. A pesar de que no se determinó la producción de lactato en esta condición, creemos que esta producción es mayor que en animales controles lo que impactaría directamente en la mayor expresión de POMC y en definitiva en el comportamiento saciado que los animales KD presentan.

Finalmente, el esquema muestra que cuando se sobreexpresa GGRP en tanicitos, la producción de lactato cae significativamente producto de la inhibición de GK mientras que se potencia fuertemente la producción glial de β HB. Bajo una situación de ayuno, nuestros resultados no muestran una alteración significativa en la expresión de POMC ni de AgRP, mientras que no se produce el aumento de la expresión de neuropéptidos anorexigénicos, en respuesta a glucosa, lo que se relaciona con la idea de que al sobreexpresar GGRP, se inhibe GK y cae la producción de lactato.

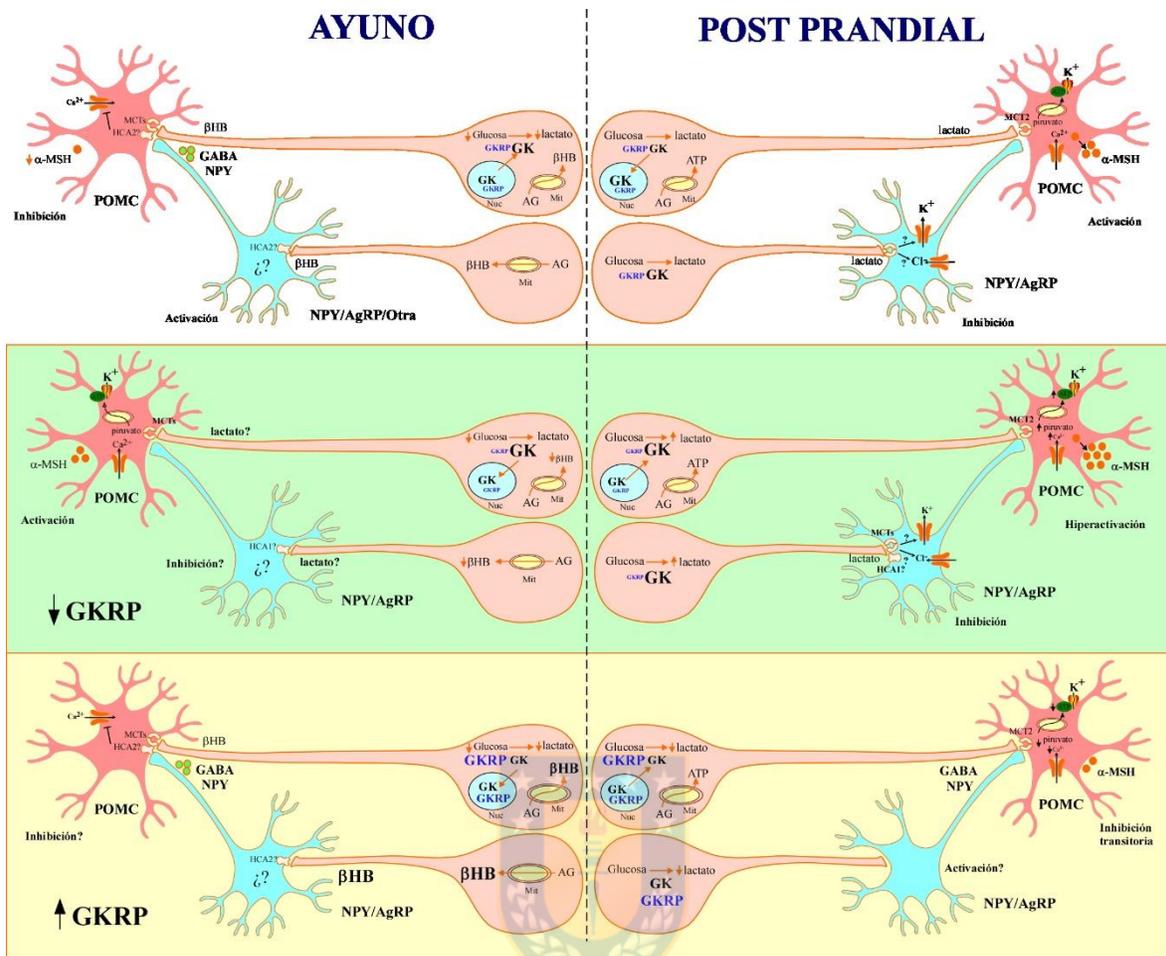


Figura 39: Modelo propuesto de interacción metabólica entre tanicitos y neuronas del ARC en situación de ayuno y post prandial. Mediante sus largos procesos, los tanicitos pueden contactar neuronas gluconsensoras del ARC, modificando su actividad y en consecuencia regulando el comportamiento alimenticio. En el recuadro verde se representa el modelo planteado producto del silenciamiento de GKR en tanicitos de rata, mientras que en el recuadro amarillo se representa lo que ocurriría como consecuencia de la sobreexpresión de esta proteína. Los signos de interrogación representan rutas o efectos funcionales que no fueron analizados en esta tesis. Mit: mitocondria. Nuc: núcleo. AG: ácido graso

VI. CONCLUSIONES GENERALES

1. El nivel de expresión de GKRP es crítico para regular la localización subcelular de GK en respuesta a glucosa. Cuando no existe GKRP, GK se localiza preferentemente en el citoplasma, independiente de la concentración de glucosa a la que estén expuestos los cultivos. Cuando la relación GKRP/GK es alta, GK se moviliza al núcleo cuando la concentración de glucosa cae.
2. El silenciamiento de GKRP en tanicitos lleva a una disminución significativa en la ingesta alimenticia de ratas, lo que se asocia con una desregulación en la liberación de neuropéptidos hipotalámicos. La sobreexpresión de GKRP aumenta la avidez alimenticia luego de un periodo de ayuno.
3. Las neuronas POMC aumentan su actividad eléctrica en respuesta a glucosa a través de un mecanismo indirecto, mediado el metabolismo de este azúcar hasta lactato. En respuesta a otros monocarboxilatos como β HB, las neuronas POMC se hiperpolarizan, inhibiéndose.
4. Los tanicitos en cultivo son capaces de producir y liberar β HB, proceso dependiente de la actividad de AMPK, de MCT1-4 y del nivel de expresión de GKRP. Creemos que β HB es capaz de inhibir a neuronas POMC, aumentando la ingesta alimenticia al inicio de una realimentación.

VII. REFERENCIAS

Ahmed, K. (2011) Biological roles and therapeutic potential of hydroxy-carboxylic Acid receptors. *Front Endocrinol (Lausanne)* **2**, 51.

Ahmed, K., Tunaru, S. and Offermanns, S. (2009) GPR109A, GPR109B and GPR81, a family of hydroxy-carboxylic acid receptors. *Trends Pharmacol Sci* **30**, 557-562.

Ainscow, E. K., Mirshamsi, S., Tang, T., Ashford, M. L. and Rutter, G. A. (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. *J Physiol* **544**, 429-445.

Akmayev, I. G., Fidelina, O. V., Kabolova, Z. A., Popov, A. P. and Schitkova, T. A. (1973) Morphological aspects of the hypothalamic-hypophyseal system. IV. Medial basal hypothalamus. An experimental morphological study. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* **137**, 493-512.

Alsemarz, A., Lasko, P. and Fagotto, F. (2018) Limited significance of the in situ proximity ligation assay. *bioRxiv*, 411355.

Alvarez, E., Roncero, I., Chowen, J. A., Vazquez, P. and Blazquez, E. (2002) Evidence that glucokinase regulatory protein is expressed and interacts with glucokinase in rat brain. *J Neurochem* **80**, 45-53.

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

Anand, B. K., Chhina, G. S., Sharma, K. N., Dua, S. and Singh, B. (1964) Activity of Single Neurons in the Hypothalamic Feeding Centers: Effect of Glucose. *Am J Physiol* **207**, 1146-1154.

Aponte, Y., Atasoy, D. and Sternson, S. M. (2011) AGRP neurons are sufficient to orchestrate feeding behavior rapidly and without training. *Nat Neurosci* **14**, 351-355.

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

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

Barahona, M. J., Llanos, P., Recabal, A. et al. (2018) Glial hypothalamic inhibition of GLUT2 expression alters satiety, impacting eating behavior. *Glia* **66**, 592-605.

Beer, N. L., Tribble, N. D., McCulloch, L. J., Roos, C., Johnson, P. R., Orholm-Melander, M. and Gloyn, A. L. (2009) The P446L variant in GCKR associated with fasting plasma glucose and triglyceride levels exerts its effect through increased glucokinase activity in liver. *Hum Mol Genet* **18**, 4081-4088.

Benyo, Z., Gille, A., Bennett, C. L., Clausen, B. E. and Offermanns, S. (2006) Nicotinic acid-induced flushing is mediated by activation of epidermal langerhans cells. *Mol Pharmacol* **70**, 1844-1849.

Blazquez, C., Woods, A., de Ceballos, M. L., Carling, D. and Guzman, M. (1999) The AMP-activated protein kinase is involved in the regulation of ketone body production by astrocytes. *J Neurochem* **73**, 1674-1682.

Bless, E. P., Yang, J., Acharya, K. D., Nettles, S. A., Vassoler, F. M., Byrnes, E. M. and Tetel, M. J. (2016) Adult Neurogenesis in the Female Mouse Hypothalamus: Estradiol and High-Fat Diet Alter the Generation of Newborn Neurons Expressing Estrogen Receptor alpha. *eNeuro* **3**.

Borg, M. A., Tamborlane, W. V., Shulman, G. I. and Sherwin, R. S. (2003) Local lactate perfusion of the ventromedial hypothalamus suppresses hypoglycemic counterregulation. *Diabetes* **52**, 663-666.

Bosco, D., Meda, P. and Iynedjian, P. B. (2000) Glucokinase and glucokinase regulatory protein: mutual dependence for nuclear localization. *Biochem J* **348 Pt 1**, 215-222.

Boschero, A. C., Tombaccini, D. and Atwater, I. (1988) Effects of glucose on insulin release and 86Rb permeability in cultured neonatal and adult rat islets. *FEBS Lett* **236**, 375-379.

Briski, K. P. and Patil, G. D. (2005) Induction of Fos immunoreactivity labeling in rat forebrain metabolic loci by caudal fourth ventricular infusion of the monocarboxylate transporter inhibitor, alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid. *Neuroendocrinology* **82**, 49-57.

Brown, K. S., Kalinowski, S. S., Megill, J. R., Durham, S. K. and Mookhtiar, K. A. (1997) Glucokinase regulatory protein may interact with glucokinase in the hepatocyte nucleus. *Diabetes* **46**, 179-186.

Campbell, J. N., Macosko, E. Z., Fenselau, H. et al. (2017) A molecular census of arcuate hypothalamus and median eminence cell types. *Nat Neurosci* **20**, 484-496.

Cardenas, M. L., Cornish-Bowden, A. and Ureta, T. (1998) Evolution and regulatory role of the hexokinases. *Biochim Biophys Acta* **1401**, 242-264.

Carneiro, L., Geller, S., Fioramonti, X., Hebert, A., Repond, C., Leloup, C. and Pellerin, L. (2016) Evidence for hypothalamic ketone body sensing: impact on food

intake and peripheral metabolic responses in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **310**, E103-115.

Clasadonte, J. and Prevot, V. (2018) The special relationship: glia-neuron interactions in the neuroendocrine hypothalamus. *Nat Rev Endocrinol* **14**, 25-44.

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

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

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

Cowley, M. A., Smith, R. G., Diano, S. et al. (2003) The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* **37**, 649-661.

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

Chen, R., Wu, X., Jiang, L. and Zhang, Y. (2017) Single-Cell RNA-Seq Reveals Hypothalamic Cell Diversity. *Cell Rep* **18**, 3227-3241.

Choi, J. M., Seo, M. H., Kyeong, H. H., Kim, E. and Kim, H. S. (2013) Molecular basis for the role of glucokinase regulatory protein as the allosteric switch for glucokinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 10171-10176.

Chu, C. A., Fujimoto, Y., Igawa, K., Grimsby, J., Grippo, J. F., Magnuson, M. A., Cherrington, A. D. and Shiota, M. (2004) Rapid translocation of hepatic glucokinase in response to intraduodenal glucose infusion and changes in plasma glucose and insulin in conscious rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **286**, G627-634.

Dahlin, M., Elfving, A., Ungerstedt, U. and Amark, P. (2005) The ketogenic diet influences the levels of excitatory and inhibitory amino acids in the CSF in children with refractory epilepsy. *Epilepsy Res* **64**, 115-125.

Dasgupta, B. and Seibel, W. (2018) Compound C/Dorsomorphin: Its Use and Misuse as an AMPK Inhibitor. *Methods Mol Biol* **1732**, 195-202.

de Boissieu, D., Rocchiccioli, F., Kalach, N. and Bougneres, P. F. (1995) Ketone body turnover at term and in premature newborns in the first 2 weeks after birth. *Biology of the neonate* **67**, 84-93.

de la Iglesia, N., Veiga-da-Cunha, M., Van Schaftingen, E., Guinovart, J. J. and Ferrer, J. C. (1999) Glucokinase regulatory protein is essential for the proper subcellular localisation of liver glucokinase. *FEBS Lett* **456**, 332-338.

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

Dencker, D., Molander, A., Thomsen, M., Schlumberger, C., Wortwein, G., Weikop, P., Benveniste, H., Volkow, N. D. and Fink-Jensen, A. (2018) Ketogenic Diet Suppresses Alcohol Withdrawal Syndrome in Rats. *Alcohol Clin Exp Res* **42**, 270-277.

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

Elizondo-Vega, R., Cortes-Campos, C., Barahona, M. J., Carril, C., Ordenes, P., Salgado, M., Oyarce, K. and Garcia-Robles, M. L. (2016) Inhibition of hypothalamic MCT1 expression increases food intake and alters orexigenic and anorexigenic neuropeptide expression. *Sci Rep* **6**, 33606.

Elizondo-Vega, R., Cortes-Campos, C., Barahona, M. J., Oyarce, K. A., Carril, C. A. and Garcia-Robles, M. A. (2015) The role of tanycytes in hypothalamic glucosensing. *J Cell Mol Med* **19**, 1471-1482.

Ellebaek, S., Brix, S., Grandal, M., Lantto, J., Horak, I. D., Kragh, M. and Poulsen, T. T. (2016) Pan-HER-An antibody mixture targeting EGFR, HER2 and HER3 abrogates preformed and ligand-induced EGFR homo- and heterodimers. *Int J Cancer* **139**, 2095-2105.

Farrelly, D., Brown, K. S., Tieman, A., Ren, J., Lira, S. A., Hagan, D., Gregg, R., Mookhtiar, K. A. and Hariharan, N. (1999) Mice mutant for glucokinase regulatory protein exhibit decreased liver glucokinase: a sequestration mechanism in metabolic regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 14511-14516.

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

Freeman, J. M., Vining, E. P., Pillas, D. J., Pyzik, P. L., Casey, J. C. and Kelly, L. M. (1998) The efficacy of the ketogenic diet-1998: a prospective evaluation of intervention in 150 children. *Pediatrics* **102**, 1358-1363.

Fu, S. P., Liu, B. R., Wang, J. F. et al. (2015) beta-Hydroxybutyric acid inhibits growth hormone-releasing hormone synthesis and secretion through the

GPR109A/extracellular signal-regulated 1/2 signalling pathway in the hypothalamus. *J Neuroendocrinol* **27**, 212-222.

Garcia, M., Millan, C., Balmaceda-Aguilera, C. et al. (2003) Hypothalamic ependymal-glia cells express the glucose transporter GLUT2, a protein involved in glucose sensing. *J Neurochem* **86**, 709-724.

Geller, S., Arribat, Y., Netzahualcoyotzi, C., Lagarrigue, S., Carneiro, L., Zhang, L., Amati, F., Lopez-Mejia, I. C. and Pellerin, L. (2019) Tanycytes Regulate Lipid Homeostasis by Sensing Free Fatty Acids and Signaling to Key Hypothalamic Neuronal Populations via FGF21 Secretion. *Cell Metab.*

Gomes, I., Sierra, S. and Devi, L. A. (2016) Detection of Receptor Heteromerization Using In Situ Proximity Ligation Assay. *Curr Protoc Pharmacol* **75**, 2 16 11-12 16 31.

Grapengiesser, E., Gylfe, E. and Hellman, B. (1989) Glucose effects on cytoplasmic Ca²⁺ of individual pancreatic beta-cells recorded by two procedures for dual-wavelength fluorometry. *Exp Clin Endocrinol* **93**, 321-327.

Grodsky, G. M., Bennett, L. L., Smith, D. F. and Schmid, F. G. (1967) Effect of pulse administration of glucose or glucagon on insulin secretion in vitro. *Metabolism* **16**, 222-233.

Gullberg, M., Gustafsdottir, S. M., Schallmeiner, E., Jarvius, J., Bjarnegard, M., Betsholtz, C., Landegren, U. and Fredriksson, S. (2004) Cytokine detection by antibody-based proximity ligation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 8420-8424.

Haan, N., Goodman, T., Najdi-Samiei, A., Stratford, C. M., Rice, R., El Agha, E., Bellusci, S. and Hajihosseini, M. K. (2013) Fgf10-expressing tanycytes add new neurons to the appetite/energy-balance regulating centers of the postnatal and adult hypothalamus. *J Neurosci* **33**, 6170-6180.

Hagan, M. M., Rushing, P. A., Pritchard, L. M., Schwartz, M. W., Strack, A. M., Van Der Ploeg, L. H., Woods, S. C. and Seeley, R. J. (2000) Long-term orexigenic effects of AgRP-(83---132) involve mechanisms other than melanocortin receptor blockade. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **279**, R47-52.

Hahn, T. M., Breininger, J. F., Baskin, D. G. and Schwartz, M. W. (1998) Coexpression of *Agrp* and *NPY* in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nat Neurosci* **1**, 271-272.

Hale, C., Lloyd, D. J., Pellacani, A. and Veniant, M. M. (2015) Molecular targeting of the GK-GKRP pathway in diabetes. *Expert opinion on therapeutic targets* **19**, 129-139.

- Halestrap, A. P. (2013) Monocarboxylic acid transport. *Compr Physiol* **3**, 1611-1643.
- Halim, N. D., McFate, T., Mohyeldin, A. et al. (2010) Phosphorylation status of pyruvate dehydrogenase distinguishes metabolic phenotypes of cultured rat brain astrocytes and neurons. *Glia* **58**, 1168-1176.
- Han, Y., Xia, G. and Wu, Q. (2018) Functional Interrogation of the AgRP Neural Circuits in Control of Appetite, Body Weight, and Behaviors. *Adv Exp Med Biol* **1090**, 1-16.
- Herrero-Mendez, A., Almeida, A., Fernandez, E., Maestre, C., Moncada, S. and Bolanos, J. P. (2009) The bioenergetic and antioxidant status of neurons is controlled by continuous degradation of a key glycolytic enzyme by APC/C-Cdh1. *Nat Cell Biol* **11**, 747-752.
- Hill, J. W. (2010) Gene Expression and the Control of Food Intake by Hypothalamic POMC/CART Neurons. *Open Neuroendocrinol J* **3**, 21-27.
- Hiriart, M. and Aguilar-Bryan, L. (2008) Channel regulation of glucose sensing in the pancreatic beta-cell. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **295**, E1298-1306.
- Hiskett, E. K., Suwitheecon, O. U., Lindbloom-Hawley, S., Boyle, D. L. and Schermerhorn, T. (2009) Lack of glucokinase regulatory protein expression may contribute to low glucokinase activity in feline liver. *Vet Res Commun* **33**, 227-240.
- Jalili, R., Horecka, J., Swartz, J. R., Davis, R. W. and Persson, H. H. J. (2018) Streamlined circular proximity ligation assay provides high stringency and compatibility with low-affinity antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**, E925-E933.
- Juge, N., Gray, J. A., Omote, H. et al. (2010) Metabolic control of vesicular glutamate transport and release. *Neuron* **68**, 99-112.
- Kang, L., Routh, V. H., Kuzhikandathil, E. V., Gaspers, L. D. and Levin, B. E. (2004) Physiological and molecular characteristics of rat hypothalamic ventromedial nucleus glucosensing neurons. *Diabetes* **53**, 549-559.
- Kappos, L., Gold, R., Miller, D. H. et al. (2008) Efficacy and safety of oral fumarate in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled phase IIb study. *Lancet* **372**, 1463-1472.
- Kaushik, A. and Kaushik, M. (2019) Recent Updates on Glucokinase Activators and Glucokinase Regulatory Protein Disrupters for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. *Current diabetes reviews* **15**, 205-212.
- Kim, D. Y. and Rho, J. M. (2008) The ketogenic diet and epilepsy. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **11**, 113-120.

Kokorovic, A., Cheung, G. W., Rossetti, L. and Lam, T. K. (2009) Hypothalamic sensing of circulating lactate regulates glucose production. *J Cell Mol Med* **13**, 4403-4408.

Kraft, B. D. and Westman, E. C. (2009) Schizophrenia, gluten, and low-carbohydrate, ketogenic diets: a case report and review of the literature. *Nutr Metab (Lond)* **6**, 10.

Krashes, M. J., Koda, S., Ye, C., Rogan, S. C., Adams, A. C., Cusher, D. S., Maratos-Flier, E., Roth, B. L. and Lowell, B. B. (2011) Rapid, reversible activation of AgRP neurons drives feeding behavior in mice. *J Clin Invest* **121**, 1424-1428.

Kreymann, B., Williams, G., Ghatei, M. A. and Bloom, S. R. (1987) Glucagon-like peptide-1 7-36: a physiological incretin in man. *Lancet* **2**, 1300-1304.

Ladu, M. J., Reardon, C., Van Eldik, L., Fagan, A. M., Bu, G., Holtzman, D. and Getz, G. S. (2000) Lipoproteins in the central nervous system. *Ann N Y Acad Sci* **903**, 167-175.

Laeger, T., Pohland, R., Metges, C. C. and Kuhla, B. (2012) The ketone body beta-hydroxybutyric acid influences agouti-related peptide expression via AMP-activated protein kinase in hypothalamic GT1-7 cells. *J Endocrinol* **213**, 193-203.

Laffel, L. (1999) Ketone bodies: a review of physiology, pathophysiology and application of monitoring to diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* **15**, 412-426.

Lam, C. K., Chari, M., Wang, P. Y. and Lam, T. K. (2008) Central lactate metabolism regulates food intake. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **295**, E491-496.

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

Langlet, F., Mullier, A., Bouret, S. G., Prevot, V. and Dehouck, B. (2013) Tanycyte-like cells form a blood-cerebrospinal fluid barrier in the circumventricular organs of the mouse brain. *J Comp Neurol* **521**, 3389-3405.

Lopes-Cardozo, M., Larsson, O. M. and Schousboe, A. (1986) Acetoacetate and glucose as lipid precursors and energy substrates in primary cultures of astrocytes and neurons from mouse cerebral cortex. *J Neurochem* **46**, 773-778.

Ma, M. S., Brouwer, N., Wesseling, E., Raj, D., van der Want, J., Boddeke, E., Balasubramaniyan, V. and Copray, S. (2015) Multipotent stem cell factor UGS148 is a marker for tanycytes in the adult hypothalamus. *Mol Cell Neurosci* **65**, 21-30.

Ma, W., Berg, J. and Yellen, G. (2007a) Ketogenic diet metabolites reduce firing in central neurons by opening K(ATP) channels. *J Neurosci* **27**, 3618-3625.

Ma, X., Zubcevic, L., Bruning, J. C., Ashcroft, F. M. and Burdakov, D. (2007b) Electrical inhibition of identified anorexigenic POMC neurons by orexin/hypocretin. *J Neurosci* **27**, 1529-1533.

Maalouf, M., Sullivan, P. G., Davis, L., Kim, D. Y. and Rho, J. M. (2007) Ketones inhibit mitochondrial production of reactive oxygen species production following glutamate excitotoxicity by increasing NADH oxidation. *Neuroscience* **145**, 256-264.

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

Masino, S. A., Li, T., Theofilas, P., Sandau, U. S., Ruskin, D. N., Fredholm, B. B., Geiger, J. D., Aronica, E. and Boison, D. (2011) A ketogenic diet suppresses seizures in mice through adenosine A(1) receptors. *J Clin Invest* **121**, 2679-2683.

Mayer, J. (1955) Regulation of energy intake and the body weight: the glucostatic theory and the lipostatic hypothesis. *Ann N Y Acad Sci* **63**, 15-43.

Millan, C., Martinez, F., Cortes-Campos, C. et al. (2010) Glial glucokinase expression in adult and post-natal development of the hypothalamic region. *ASN Neuro* **2**, e00035.

Mobbs, C. V., Moreno, C. L. and Poplawski, M. (2013) Metabolic mystery: aging, obesity, diabetes, and the ventromedial hypothalamus. *Trends Endocrinol Metab* **24**, 488-494.

Morton, G. J., Meek, T. H. and Schwartz, M. W. (2014) Neurobiology of food intake in health and disease. *Nat Rev Neurosci* **15**, 367-378.

Mukhtar, M., Stubbs, M. and Agius, L. (1999) Evidence for glucose and sorbitol-induced nuclear export of glucokinase regulatory protein in hepatocytes. *FEBS Lett* **462**, 453-458.

Mullier, A., Bouret, S. G., Prevot, V. and Dehouck, B. (2010) Differential distribution of tight junction proteins suggests a role for tanycytes in blood-hypothalamus barrier regulation in the adult mouse brain. *J Comp Neurol* **518**, 943-962.

Noma, Y., Bonner-Weir, S., Latimer, J. B., Davalli, A. M. and Weir, G. C. (1996) Translocation of glucokinase in pancreatic beta-cells during acute and chronic hyperglycemia. *Endocrinology* **137**, 1485-1491.

Offermanns, S. and Schwaninger, M. (2015) Nutritional or pharmacological activation of HCA(2) ameliorates neuroinflammation. *Trends Mol Med* **21**, 245-255.

Ogden, C. L., Carroll, M. D., Curtin, L. R., McDowell, M. A., Tabak, C. J. and Flegal, K. M. (2006) Prevalence of overweight and obesity in the United States, 1999-2004. *JAMA* **295**, 1549-1555.

- Oomura, Y. and Yoshimatsu, H. (1984) Neural network of glucose monitoring system. *J Auton Nerv Syst* **10**, 359-372.
- Orellana, J. A., Saez, P. J., Cortes-Campos, C. et al. (2012) Glucose increases intracellular free Ca(2+) in tanycytes via ATP released through connexin 43 hemichannels. *Glia* **60**, 53-68.
- Oz, G., Kumar, A., Rao, J. P., Kodl, C. T., Chow, L., Eberly, L. E. and Seaquist, E. R. (2009) Human brain glycogen metabolism during and after hypoglycemia. *Diabetes* **58**, 1978-1985.
- Patil, G. D. and Briski, K. P. (2005) Lactate is a critical "sensed" variable in caudal hindbrain monitoring of CNS metabolic stasis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **289**, R1777-1786.
- Placzek, M. and Briscoe, J. (2005) The floor plate: multiple cells, multiple signals. *Nat Rev Neurosci* **6**, 230-240.
- Prevot, V. (2002) Glial-neuronal-endothelial interactions are involved in the control of GnRH secretion. *J Neuroendocrinol* **14**, 247-255.
- Prevot, V., Dehouck, B., Sharif, A., Ciofi, P., Giacobini, P. and Clasadonte, J. (2018) The Versatile Tanycyte: A Hypothalamic Integrator of Reproduction and Energy Metabolism. *Endocr Rev* **39**, 333-368.
- Rada, P., Avena, N. M. and Hoebel, B. G. (2005) Daily bingeing on sugar repeatedly releases dopamine in the accumbens shell. *Neuroscience* **134**, 737-744.
- Reger, M. A., Henderson, S. T., Hale, C., Cholerton, B., Baker, L. D., Watson, G. S., Hyde, K., Chapman, D. and Craft, S. (2004) Effects of beta-hydroxybutyrate on cognition in memory-impaired adults. *Neurobiol Aging* **25**, 311-314.
- Robins, S. C., Stewart, I., McNay, D. E. et al. (2013) alpha-Tanycytes of the adult hypothalamic third ventricle include distinct populations of FGF-responsive neural progenitors. *Nat Commun* **4**, 2049.
- Rodriguez, E. M., Blazquez, J. L., Pastor, F. E., Pelaez, B., Pena, P., Peruzzo, B. and Amat, P. (2005) Hypothalamic tanycytes: a key component of brain-endocrine interaction. *Int Rev Cytol* **247**, 89-164.
- Rodriguez, E. M., Gonzalez, C. B. and Delannoy, L. (1979) Cellular organization of the lateral and postinfundibular regions of the median eminence in the rat. *Cell Tissue Res* **201**, 377-408.
- Roncero, I., Alvarez, E., Chowen, J. A., Sanz, C., Rabano, A., Vazquez, P. and Blazquez, E. (2004) Expression of glucose transporter isoform GLUT-2 and glucokinase genes in human brain. *J Neurochem* **88**, 1203-1210.

Salgado, M., Tarifeno-Saldivia, E., Ordenes, P. et al. (2014) Dynamic localization of glucokinase and its regulatory protein in hypothalamic tanocytes. *PLoS One* **9**, e94035.

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

Schuit, F., De Vos, A., Farfari, S., Moens, K., Pipeleers, D., Brun, T. and Prentki, M. (1997) Metabolic fate of glucose in purified islet cells. Glucose-regulated anaplerosis in beta cells. *J Biol Chem* **272**, 18572-18579.

Schuit, F. C., Huypens, P., Heimberg, H. and Pipeleers, D. G. (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.

Schwartz, M. W., Baskin, D. G., Bukowski, T. R. et al. (1996) Specificity of leptin action on elevated blood glucose levels and hypothalamic neuropeptide Y gene expression in ob/ob mice. *Diabetes* **45**, 531-535.

Schwartz, M. W., Seeley, R. J., Woods, S. C., Weigle, D. S., Campfield, L. A., Burn, P. and Baskin, D. G. (1997) Leptin increases hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA expression in the rostral arcuate nucleus. *Diabetes* **46**, 2119-2123.

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

Shaafi, S., Najmi, S., Aliasgharpour, H., Mahmoudi, J., Sadigh-Etemad, S., Farhoudi, M. and Baniasadi, N. (2016) The efficacy of the ketogenic diet on motor functions in Parkinson's disease: A rat model. *Iran J Neurol* **15**, 63-69.

Shiota, C., Coffey, J., Grimsby, J., Grippo, J. F. and Magnuson, M. A. (1999) Nuclear import of hepatic glucokinase depends upon glucokinase regulatory protein, whereas export is due to a nuclear export signal sequence in glucokinase. *J Biol Chem* **274**, 37125-37130.

Siva, N. (2006) Can ketogenic diet slow progression of ALS? *Lancet Neurol* **5**, 476.

Soga, T., Kamohara, M., Takasaki, J. et al. (2003) Molecular identification of nicotinic acid receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **303**, 364-369.

Spanswick, D., Smith, M. A., Mirshamsi, S., Routh, V. H. and Ashford, M. L. (2000) Insulin activates ATP-sensitive K⁺ channels in hypothalamic neurons of lean, but not obese rats. *Nat Neurosci* **3**, 757-758.

Spiegelman, B. M. and Flier, J. S. (2001) Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* **104**, 531-543.

Stark, R., Ashley, S. E. and Andrews, Z. B. (2013) AMPK and the neuroendocrine regulation of appetite and energy expenditure. *Mol Cell Endocrinol* **366**, 215-223.

Szczyпка, M. S., Mandel, R. J., Donahue, B. A., Snyder, R. O., Leff, S. E. and Palmiter, R. D. (1999) Viral gene delivery selectively restores feeding and prevents lethality of dopamine-deficient mice. *Neuron* **22**, 167-178.

Taggart, A. K., Kero, J., Gan, X. et al. (2005) (D)-beta-Hydroxybutyrate inhibits adipocyte lipolysis via the nicotinic acid receptor PUMA-G. *J Biol Chem* **280**, 26649-26652.

Tang, H., Lu, J. Y., Zheng, X., Yang, Y. and Reagan, J. D. (2008) The psoriasis drug monomethylfumarate is a potent nicotinic acid receptor agonist. *Biochem Biophys Res Commun* **375**, 562-565.

Tanner, G. R., Lutas, A., Martinez-Francois, J. R. and Yellen, G. (2011) Single K ATP channel opening in response to action potential firing in mouse dentate granule neurons. *J Neurosci* **31**, 8689-8696.

Taylor, M. K., Sullivan, D. K., Mahnken, J. D., Burns, J. M. and Swerdlow, R. H. (2018) Feasibility and efficacy data from a ketogenic diet intervention in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement (N Y)* **4**, 28-36.

Telano, L. N. and Baker, S. (2019) Physiology, Cerebral Spinal Fluid (CSF). In: *StatPearls*. Treasure Island (FL).

Thorens, B. (2012) Sensing of glucose in the brain. *Handb Exp Pharmacol*, 277-294.

Thorens, B., Sarkar, H. K., Kaback, H. R. and Lodish, H. F. (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.

Titgemeyer, E. C., Mamedova, L. K., Spivey, K. S., Farney, J. K. and Bradford, B. J. (2011) An unusual distribution of the niacin receptor in cattle. *J Dairy Sci* **94**, 4962-4967.

Tong, Q., Ye, C. P., Jones, J. E., Elmquist, J. K. and Lowell, B. B. (2008) Synaptic release of GABA by AgRP neurons is required for normal regulation of energy balance. *Nat Neurosci* **11**, 998-1000.

Toyoda, Y., Ito, Y., Yoshie, S. and Miwa, I. (1997) Shuttling of glucokinase between the nucleus and the cytoplasm in primary cultures of rat hepatocytes: possible involvement in the regulation of the glucose metabolism. *Arch Histol Cytol* **60**, 307-316.

- Toyoda, Y., Yoshie, S., Shironoguchi, H. and Miwa, I. (1999) Glucokinase is concentrated in insulin-secretory granules of pancreatic B-cells. *Histochem Cell Biol* **112**, 35-40.
- Uranga, R. M., Millan, C., Barahona, M. J. et al. (2017) Adenovirus-mediated suppression of hypothalamic glucokinase affects feeding behavior. *Sci Rep* **7**, 3697.
- van Schaftingen, E. and Gerin, I. (2002) The glucose-6-phosphatase system. *Biochem J* **362**, 513-532.
- Vanitallie, T. B., Nonas, C., Di Rocco, A., Boyar, K., Hyams, K. and Heymsfield, S. B. (2005) Treatment of Parkinson disease with diet-induced hyperketonemia: a feasibility study. *Neurology* **64**, 728-730.
- Vaughan, C. H., Moore, M. C., Haskell-Luevano, C. and Rowland, N. E. (2005) Meal patterns and foraging in melanocortin receptor knockout mice. *Physiol Behav* **84**, 129-133.
- Vining, E. P., Freeman, J. M., Ballaban-Gil, K. et al. (1998) A multicenter study of the efficacy of the ketogenic diet. *Arch Neurol* **55**, 1433-1437.
- Wang, R., Liu, X., Hentges, S. T., Dunn-Meynell, A. A., Levin, B. E., Wang, W. and Routh, V. H. (2004) The regulation of glucose-excited neurons in the hypothalamic arcuate nucleus by glucose and feeding-relevant peptides. *Diabetes* **53**, 1959-1965.
- Williams, K. W., Margatho, L. O., Lee, C. E., Choi, M., Lee, S., Scott, M. M., Elias, C. F. and Elmquist, J. K. (2010) Segregation of acute leptin and insulin effects in distinct populations of arcuate proopiomelanocortin neurons. *J Neurosci* **30**, 2472-2479.
- Woods, S. C. (2009) The control of food intake: behavioral versus molecular perspectives. *Cell Metab* **9**, 489-498.
- Wu, Q., Boyle, M. P. and Palmiter, R. D. (2009) Loss of GABAergic signaling by AgRP neurons to the parabrachial nucleus leads to starvation. *Cell* **137**, 1225-1234.
- Yang, L., Zhao, J., Milutinovic, P. S., Brosnan, R. J., Eger, E. I., 2nd and Sonner, J. M. (2007) Anesthetic properties of the ketone bodies beta-hydroxybutyric acid and acetone. *Anesth Analg* **105**, 673-679.
- Yang, X. J., Kow, L. M., Funabashi, T. and Mobbs, C. V. (1999) Hypothalamic glucose sensor: similarities to and differences from pancreatic beta-cell mechanisms. *Diabetes* **48**, 1763-1772.
- Yang, X. J., Kow, L. M., Pfaff, D. W. and Mobbs, C. V. (2004) Metabolic pathways that mediate inhibition of hypothalamic neurons by glucose. *Diabetes* **53**, 67-73.