



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

## **“Rol del lactato en el mecanismo de activación de las neuronas POMC”**

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

PATRICIO ANDRES ORDENES CONSTENLA  
CONCEPCIÓN-CHILE  
2021

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

Ricardo Araneda  
Department of Biology  
University of Maryland

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

Profesores integrantes Comisión Evaluadora:

---

**Dra. María de los Ángeles García Robles**  
Profesor Guía de Tesis  
Universidad de Concepción

---

**Dr. Ricardo Araneda**  
Profesor Guía de Tesis  
University of Maryland



---

**Dr. Ariel Castro**  
Universidad de Concepción

---

**Dr. Leonardo Guzmán**  
Universidad de Concepción

---

**Dr. Agustín Martínez**  
Profesor Evaluador Externo  
Universidad Católica de Valparaíso

---

**Dr. Gonzalo Yévenes**  
Director Programa Doctorado en Ciencias Biológicas (s)  
Área Biología Celular y Molecular  
Universidad de Concepción



Tesis de doctorado financiada por:  
Proyecto FONDECYT # 1140677 (2014-2017).  
Proyecto FONDECYT # 1180871 (2018-2021).  
Beca CONICYT para estudios de doctorado (2018-2020).

## INDICE GENERAL

INDICE GENERAL .....	i
INDICE DE FIGURAS .....	iv
INDICE DE TABLAS .....	vi
ABREVIATURAS.....	vii
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT .....	xiv
I INTRODUCCION.....	1
1. Homeostasis energética e ingesta alimenticia: Aspectos generales.....	1
2. Ingesta alimenticia y gasto energético en el cerebro. ....	3
2.1 Participación de núcleos neuronales hipotalámicos. ....	3
2.2 Participación de núcleo neuronales extra-hipotalámicos. ....	8
2.4. Naturaleza electrofisiológica de las neuronas POMC hipotalámicas frente a glucosa. ....	12
4. Acoplamiento metabólico glía-neurona. ....	18
5. Transporte de lactato en el hipotálamo. ....	21
6. Lactato como una molécula de señalización intercelular.....	23
6.1 Generalidades del receptor de ácido hidroxicarboxílico 1 (HCAR1).....	23
6.2 Rol de HCAR1 en el tejido adiposo.....	24
6.3 Rol de HCAR1 a nivel cerebral. ....	25
Planteamiento general del problema. ....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
HIPOTESIS:.....	28
OBJETIVOS.....	29

OBJETIVO GENERAL:.....	29
OBJETIVO 1:.....	29
OBJETIVO 2:.....	29
III MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
1. Animales de experimentación. ....	30
2. Cirugía estereotáxica.....	30
3. Preparación de rebanadas de cerebro para electrofisiología. ....	31
3.1. Registros electrofisiológicos, adquisición de datos y análisis.....	32
3.2 Agentes farmacológicos.....	33
4. Inmunohistoquímica. ....	33
4.1 Procesamiento histológico para inmunohistoquímica. ....	33
4.2 Inmunohistoquímica para cortes de tejido. ....	34
4.3. Microscopía confocal y procesamiento de imágenes. ....	34
5. Inmunodetección de proteínas.....	35
5.1. Obtención de extractos de proteínas totales. ....	35
5.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	35
5.3. Inmunodetección de las proteínas.....	36
6. Extracción de ARN.....	37
7. Transcripción reversa del ARN (RT), síntesis de ADNc.....	37
8. PCR en tiempo real (qRT-PCR).....	38
9. Aislamiento y purificación de neuronas POMC-EGFP del hipotálamo usando clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS).....	39
10. RT-PCR de las muestras obtenidas por FACS.....	40
III RESULTADOS.....	42

Objetivo 1: Determinar la distribución celular de HCAR1 en el hipotálamo. ....	42
1.1 Expresión del receptor de ácido hidroxicarboxílico-1 (HCAR1) en el cerebro. ....	42
1.2 Localización de HCAR1 en el hipotálamo.....	43
1.3 En neuronas POMC no se detecta HCAR1 por inmunohistoquímica. ....	49
Objetivo 2: Determinar si las neuronas POMC responden a lactato y definir si el mecanismo involucra la participación de MCT2 y/o HCAR1. ....	55
2.1 Estandarización del uso de AAV en el ARC. ....	56
2.2 Propiedades electrofisiológicas de las neuronas POMC. ....	60
2.3 POMC del ARC responden principalmente a L-lactato. ....	64
1.4 Respuesta diferencial de las neuronas POMC en respuesta a inhibidor de MCTs..	64
1.5. HCAR1 media la activación de neuronas POMC. ....	71
2.4. Mecanismo de despolarización de neuronas POMC es mediada en parte por señalización glutamatérgica. ....	74
DISCUSION.....	76
V. BIBLIOGRAFIA .....	86



## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Circuitos neuronales que controlan la ingesta alimenticia y gasto energético. ....	5
Figura 2. Hipotálamo basal y el mecanismo propuesto para la participación de MCTs en tanicitos y en neuronas anorexigénicas para regular la ingesta alimenticia. ....	17
Figura 3. Representación esquemática de los mecanismos utilizados por el lactato extracelular para reducir la excitabilidad neuronal de células piramidales CA1 del hipocampo. ....	27
Figura 4. Perfil de expresión de HCAR1 en hipotálamo. ....	45
Figura 5. HCAR1 está expresado en cerebelo. ....	46
Figura 7. HCAR1 está expresado en células del ARC. ....	48
Figura 8. Distribución de HCAR1 en el hipotálamo del ratón POMC-EGFP. ....	50
Figura 9. HCAR1 no está localizado en neuronas POMC. Se utilizaron diferentes regiones en el eje anteroposterior de la región del ARC de ....	51
Figura 10. HCAR1 está localizado en astrocitos del ARC. ....	52
Figura 12. Identificación de las neuronas POMC-GFP en el ARC. ....	57
Figura 13. Análisis de la distribución de las neuronas POMC-GFP en el hipotálamo. ....	58
Figura 14. Propiedades electrofisiológicas de las neuronas POMC-GFP. ....	61
Figura 15. Relación de corriente aplicada y FPA de las neuronas POMC-GFP. ....	62
Figura 16. Diferentes características electrofisiológicas de las neuronas POMC. ....	63
Figura 17. Despolarización en POMC frente a L-lactato y D-glucosa. ....	66

Figura 18. Respuesta de neuronas POMC a L-lactato depende de la actividad de los transportadores de monocarboxilatos. ....	67
Figura 19. Respuesta de neuronas POMC a L-lactato no depende de la actividad de los transportadores de monocarboxilatos. ....	68
Figura 20. Registros electrofisiológicos de POMC frente a L-lactato y L-piruvato.....	69
Figura 21. Registros electrofisiológicos de POMC frente a L-lactato y D-lactato.....	70
Figura 22. La activación de HCAR1 despolariza las neuronas POMC. ....	72
Figura 23. La activación de HCAR1 depende de la señalización Gai. ....	73
Figura 24. Despolarización de las neuronas POMC depende de señalización glutamatérgica. ....	75
Figura 25. Modelo propuesto para el mecanismo para la activación de las neuronas POMC mediante la incorporación de lactato. ....	84
Figura 26. Modelo propuesto para el mecanismo para la activación de las neuronas POMC mediante la activación de HCAR1 en astrocitos. ....	85



## INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Anticuerpos primarios utilizados .....	41
Tabla 2: Anticuerpos secundarios utilizados .....	41



## ABREVIATURAS

<b>3V</b>	: tercer ventrículo
<b>ACTH</b>	: adrenocorticotropa
<b>ADNasa</b>	: enzima desoxirribonucleasa
<b>ADNc</b>	: ácido desoxirribonucleico copia
<b>ADP</b>	: adenosín difosfato
<b>AMPc</b>	: adenosín monofosfato cíclico
<b>AKT</b>	: proteína quinasa B
<b>AgRP</b>	: péptido relacionado a agoutí
<b>AP</b>	: área postrema
<b>ARC</b>	: núcleo arqueado
<b>ARNasas</b>	: enzima ribonucleasa
<b>ARNm</b>	: ácido de ribonucleico mensajero
<b>as</b>	: antisentido
<b>ATP</b>	: adenosín trifosfato
<b>ATPc</b>	: adenosín trifosfato citosólico
<b>BAT</b>	: tejido adiposo pardo
<b>BSA</b>	: albúmina de suero bovino
<b>BSC</b>	: barrera sangre cerebro
<b>CART</b>	: transcrito regulado por cocaína y anfetamina
<b>ChR2</b>	: canal de rodopsina 2
<b>4-CIN</b>	: 4-hidroxicinamato
<b>CRH</b>	: hormona liberadora de corticotrofina



<b>cy2</b>	: cianina 2
<b>cy3</b>	: cianina 3
<b>cy5</b>	: cianina 5
<b>DIDS</b>	: ácido 4,4-di-isotiocianoestibeno-2,2-disulfónico
<b>DMN</b>	: núcleo dorsomedial
<b>dNTPs</b>	: desoxirribonucleótidos
<b>EAAT</b>	: transportador de aminoácidos excitatorios
<b>β-END</b>	: betaendorfina
<b>EGFP</b>	: proteína fluorescente verde
<b>EPSC</b>	: corrientes post-sinápticas excitatorias
<b>FOX3</b>	: fork head box 3
<b>GABA</b>	: Ácido γ-aminobutírico
<b>GFAP</b>	: proteína ácida fibrilar glial
<b>GFP</b>	: proteína fluorescente verde
<b>GHA</b>	: glucosa hepática post-absorvativa
<b>GIRK</b>	: G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channel
<b>GK</b>	: glucoquinasa
<b>GLUT1</b>	: transportador de glucosa
<b>GLUT2</b>	: transportador de glucosa
<b>β-HB</b>	: beta hidroxibutirato
<b>HCA1</b>	: ácido hidroxicarboxílico 1
<b>HCA2</b>	: ácido hidroxicarboxílico 2
<b>HCA3</b>	: ácido hidroxicarboxílico 3
<b>HCl</b>	: ácido clorhídrico



<b>ME</b>	: eminencia media
<b>HGE</b>	: high glucose excited
<b>HGI</b>	: high glucose inhibited
<b>HEPES</b>	: ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazineetanosulfónico
<b>HPLC</b>	: cromatografía líquida de alta presión
<b>HRP</b>	: peroxidasa de rabano picante
<b>IML</b>	: núcleo intermediolateral
<b>IR</b>	: receptor de insulina
<b>3V</b>	: tercer ventrículo
<b>K<sup>+</sup></b>	: potasio
<b>KCl</b>	: cloruro de potasio
<b>K<sub>m</sub></b>	: constante de michaelis-memten
<b>K<sub>ATP</sub></b>	: canal de K <sup>+</sup> sensible a ATP
<b>Kir 6.2</b>	: subunidad 6.2 de los canales de potasio sensibles a ATP
<b>LCR</b>	: líquido cefalorraquídeo
<b>LERB</b>	: receptor de leptina
<b>LDH1</b>	: enzima láctico deshidrogenasa 1
<b>LDH5</b>	: enzima láctico deshidrogenasa 5
<b>LHA</b>	: área hipotalámica lateral
<b>β-LPH</b>	: beta lipotropina
<b>γ-LPH</b>	: gamma lipotropina
<b>α-MSH</b>	: hormona estimulante de melanocitos α
<b>β-MSH</b>	: hormona estimulante de melanocitos α
<b>γ-MSH</b>	: hormona estimulante de melanocitos α



<b>MC3R</b>	: receptor de melanocortina 3
<b>MC4R</b>	: receptor de melanocortina 4
<b>MCT</b>	: transportador de monocarboxilato
<b>MCT1</b>	: transportador de monocarboxilato 1
<b>MCT2</b>	: transportador de monocarboxilato 2
<b>MCT4</b>	: transportador de monocarboxilato 4
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	: cloruro de magnesio
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	: hidrógeno fosfato de sodio
<b>Nac</b>	: núcleo acumbens
<b>NaCl</b>	: cloruro de sodio
<b>NADH</b>	: nicotinamida di nucleótido reducido
<b>NAD<sup>+</sup></b>	: nicotinamida di nucleótido oxidado
<b>NEG</b>	: neuronas excitadas por glucosa
<b>NIG</b>	: neuronas inhibidas por glucosa
<b>NPY</b>	: neuropéptido Y
<b>NTS</b>	: núcleo del tracto solitario
<b>PAM</b>	: monooxigenasa $\alpha$ -amidante de peptidilglicina
<b>PBN</b>	: núcleo parabraquial
<b>PBS</b>	: tampón fosfato salino
<b>PC1/3</b>	: proconvertasa 1/3
<b>PCR</b>	: reacción de la polimerasa en cadena
<b>PDH</b>	: piruvato deshidrogenasa
<b>PFA</b>	: paraformaldehído
<b>PI3K</b>	: fosfoinositol 3 quinasa

<b>PNO</b>	: prepronociceptina
<b>POMC</b>	: pro-opiomelanocortina
<b>PTX</b>	: toxina pertussis
<b>PVN</b>	: núcleo paraventricular
<b>qRT-PCR</b>	: retrotranscripción y PCR cuantitativo
<b>RT</b>	: retrotranscripción
<b>SDS</b>	: dodecilsulfato de sodio
<b>SIM-1</b>	: Single-minded homolog 1
<b>SNC</b>	: sistema nervioso central
<b>sn</b>	: sentido
<b>STAT3</b>	: transductor de señal y activador de la transcripción 3
<b>TBS</b>	: tampón tris salino
<b>TEMED</b>	: N,N,N',N'-Tetrametiletilenediamina
<b>TH</b>	: tirosina hidroxilasa
<b>TL</b>	: tween leche
<b>TRH</b>	: hormona liberadora de tirotrófina
<b>Tris</b>	: 2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
<b>vgat</b>	: transportador vesicular de GABA
<b>vglut2</b>	: transportador vesicular de glutamato
<b>VMH</b>	: hipotálamo ventromedial
<b>VMN</b>	: núcleo ventromedial
<b>VTA</b>	: área tegmental ventral

## RESUMEN

Las neuronas POMC, una población de neuronas anorexigénicas presentes en el núcleo arqueado (ARC) del hipotálamo, regulan diversos procesos como la termogénesis, homeostasis de la glucosa gasto energético y la conducta alimentaria. Reportes previos indican que la actividad de las neuronas POMC puede ser regulada por glucosa a través de mecanismos intracelulares, pero poco se sabe acerca de su regulación mediada por metabolitos derivados de la glucosa como el lactato. Además de su papel energético, creciente evidencia ha sugerido que el lactato también puede actuar como una molécula de señalización, mediada por el receptor activado por lactato, conocido como receptor de ácido hidroxicarboxílico 1 (HCAR1). En la presente tesis, utilizamos un método de genética condicional en modelos de ratón que expresan la recombinasa CRE para marcar a las neuronas POMC mediante fluorescencia y así evaluar su sensibilidad al L-lactato y moléculas relacionadas, utilizando registros electrofisiológicos. Evidenciamos que el 80% de neuronas POMC en el ARC fueron excitadas por L-lactato. Además, una población de neuronas POMC también fue despolarizada por su estereoisómero D-lactato, así como por un agonista específico para HCAR1, el 3-chloro-5-hydroxybenzoic acid (3Cl-HBA), indicando que la excitación producida por lactato en las neuronas POMC está mediada por la activación de este receptor. De manera interesante, en una subpoblación de neuronas POMC excitadas por L-lactato, este efecto fue sensible a un inhibidor de transportadores de monocarboxilatos (MCTs), lo que sugiere que la excitación mediada por lactato también puede ocurrir por una acción intracelular. Utilizando inmunohistoquímica en cortes hipotálamo se demostró que HCAR1 está ausente en las neuronas POMC, lo que fue confirmado a través de RT-PCR obtenido de neuronas POMC aisladas por FACS de

ratones transgénicos POMC-EGFP. La inmunolocalización de HCAR1 en el ARC muestra que se localiza en astrocitos hipotalámicos que están próximos a neuronas POMC, lo que sugieren que el L-lactato puede producir una activación de las neuronas POMC de manera indirecta mediado por HCAR1 expresado en astrocitos. Estos resultados delinean un nuevo mecanismo mediado por lactato para la comunicación intercelular astrocito-neurona en el hipotálamo.



## ABSTRACT

POMC neurons, a population of anorexigenic neurons present in the arcuate nucleus (ARC) of the hypothalamus, regulate various processes such as thermogenesis, glucose homeostasis, and feeding behavior. Previous reports indicate that the activity of POMC neurons can be regulated by glucose through intracellular mechanisms, but little is known about its regulation mediated by glucose-derived metabolites such as lactate. In addition to its energetic role, increasing evidence has suggested that lactate may also act as a signaling molecule, mediated by the lactate-activated receptor, known as the hydroxycarboxylic acid receptor 1 (HCAR1). In the present thesis, we use a conditional genetic approach in mouse models that express the CRE recombinase to tag POMC neurons by fluorescence and thus evaluate their sensitivity to L-lactate and related molecules, using electrophysiological recordings. We find that POMC neurons in the ARC were excited by L-lactate. Furthermore, a population of POMC neurons was also depolarized by the D-lactate stereoisomer, as well as by 3-chloro-5-hydroxybenzoic acid (3Cl-HBA), a specific agonist for HCAR1, indicating that the activation of this receptor promotes activation of POMC neurons. Interestingly, in a subpopulation of L-lactate excited POMC neurons, this effect was sensitive to an inhibitor of monocarboxylate transporters (MCTs), showing that lactate-activation may also occur in a transport dependent manner. Surprisingly, using immunohistochemistry, HCAR1 was shown to be absent in POMC neurons, but present in hypothalamic astrocytes that are close to POMC neurons. These results were confirmed by RT-PCR of POMC neurons isolated by FACS from POMC-EGFP transgenic mice. Thus the data suggest that L-lactate can induce activation of POMC neurons indirectly by HCAR1 expressed in astrocytes. These results

highlight a new lactate-mediated mechanism in astrocyte-neuron intercellular communication in the hypothalamus.



## I INTRODUCCION

### **1. Homeostasis energética e ingesta alimenticia: Aspectos generales.**

La homeostasis energética engloba todos los procesos que mantienen la estabilidad del estado metabólico, donde la producción, utilización y almacenamiento de sustratos se distribuyen entre los diferentes órganos del cuerpo. Algunos órganos implicados como el estómago, páncreas, hígado y cerebro se han adaptado para poseer determinadas capacidades metabólicas en el uso de sustratos energéticos para cumplir con las necesidades del organismo (Qi et al. 2019; Sanchez-Lasheras et al. 2010). Sin embargo, existen alteraciones de la homeostasis energética que involucra un desbalance entre la ingesta alimenticia y el gasto energético, enfermedad conocida como obesidad, asociándose a co-morbilidades como hiperinsulinemia (indicando resistencia a la insulina), hiperlipidemia, hipertensión y enfermedades cardiovasculares (Guh et al. 2009).

El aumento en la incidencia de sobrepeso y obesidad demuestra la dificultad que tiene el ser humano para mantener un equilibrio energético adecuado, que dependen de factores extra-fisiológicos (externos) y señales internas (Magni et al. 2009). Particularmente, la dieta puede ser influenciada por factores externos como estrés laboral, control de alimentos, estatus social y políticas públicas. Sin embargo, a pesar de que los hábitos dietarios puede variar en relación con el horario de alimentación, cantidad y composición de los alimentos, inequívocamente el organismo contempla una serie de mecanismos para el correcto uso de los nutrientes y el almacenamiento de estos. Para alcanzar la regulación interna del balance energético, circuitos localizados en el sistema nervioso central (SNC) deben ser capaces de interactuar con el sistema endocrino, el cual provee señales que indican el estatus energético del organismo (Schwartz et al. 2000). Una de las señales

periféricas es la grelina, una potente hormona orexigénica (estimula el apetito) secretada por las células del tracto gastrointestinal que actúa en el cerebro cuando los niveles de nutrientes son bajos, cuya función es estimular la ingesta alimenticia (Mason et al. 2014). Por su parte, la insulina es una hormona de tipo anorexigénica (inhibe el apetito), secretada por las células  $\beta$ -pancreáticas cuando los niveles de glucosa están aumentados en la sangre, cuya función es el aprovechamiento metabólico de los nutrientes, especialmente el de los glúcidos (Schwartz et al. 2000). La leptina, una hormona secretada por el tejido adiposo, ejerce su efecto anorexigénico a nivel de SNC informando la cantidad de grasa del organismo (Balland et al. 2019) (**Fig. 1**). Junto con esta señalización hormonal, los circuitos periféricos y centrales están diseñados para orquestar la utilización de moléculas orgánicas a través de procesos catabólicos para la obtención de energía (Magni et al. 2009). Una de estas moléculas es la glucosa, que es el combustible utilizado preferentemente por el cerebro bajo condiciones fisiológicas (Mergenthaler et al. 2013). El rol que tiene la glucosa en la regulación de la ingesta alimenticia fue postulado por primera vez en la década del 50, proponiéndose que determinados centros del cerebro son sensibles a los cambios en la concentración de glucosa, inhibiendo o estimulando determinadas regiones localizadas en el SNC (Mayer 1955). Sin embargo, algunos estudios han mostrado que el cerebro puede utilizar sustratos energéticos alternativos como lactato, ácidos grasos y cuerpos cetónicos, cuando la disponibilidad de glucosa es limitada (Cunnane et al. 2011). La comprensión de como el cerebro es capaz de integrar estos sustratos metabólicos y junto con los circuitos regulatorios implicados, son cruciales para el desarrollo de estrategias para prevenir y/o atenuar la obesidad y sus co-morbilidades.

## **2. Ingesta alimenticia y gasto energético en el cerebro.**

### **2.1 Participación de núcleos neuronales hipotalámicos.**

El hipotálamo ha sido reconocido como uno de los principales centros del cerebro que controlan el metabolismo e interviene en procesos que incluyen el control de la temperatura corporal, presión sanguínea, comportamiento sexual, ritmo circadiano e ingesta alimenticia (Cornejo et al. 2016). Esta región, está compuesta por poblaciones neuronales capaces de integrar las señales hormonales, neurotransmisores y neuropéptidos producidos por otras neuronas, y señales nutricionales como la glucosa (Magni et al. 2009). Algunos de estos núcleos neuronales son el ARC y el núcleo ventromedial (VMN), que en su conjunto conforman el hipotálamo ventromedial (VMH) (Dunn-Meynell et al. 2016). En el ARC existen poblaciones neuronales con acciones antagónicas; las neuronas anorexigénicas, que co-expresan los péptidos pro-opiomelanocortina (POMC) y el transcrito regulado por amfetamina y cocaína (CART), y las neuronas orexigénicas, que co-expresan el neuropéptido Y (NPY) y el péptido relacionado a agoutí (AgRP) (Mountjoy 2015). Particularmente, el efecto anorexigénico de las neuronas POMC, fue evidenciado por la hiperfagia y obesidad observada en modelos *knock-out* de POMC (Yaswen et al. 1999). Además, se ha demostrado que la activación optogenética de las neuronas POMC reduce la ingesta alimenticia (Fenselau et al. 2017; van den Pol et al. 2019). Por otro lado, se ha reportado que modelos de ratón *knock-out* para NPY y/o AgRP tienen normal ingesta alimenticia y peso corporal (Luquet et al. 2005; Qian et al. 2002). Sin embargo, la naturaleza orexigénica de las neuronas NPY/AgRP han sido establecidas, ya que existe evidencia que demuestra que AgRP actúa como un agonista inverso de los receptores de

$\alpha$ -MSH, conocidos como receptores de melanocortina 3 y 4 (MC3/4R), por lo que previene el efecto anorexigénico de las neuronas POMC (Garfield et al. 2015).

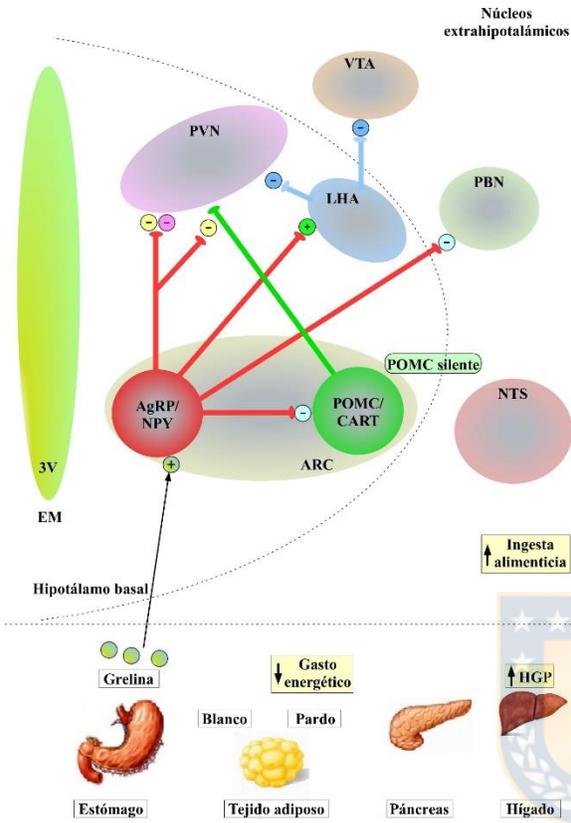
Además, la activación optogenética o estimulación farmacogenética de neuronas NPY resulta en un robusto incremento de la ingesta alimenticia (Aponte et al. 2011; Krashes et al. 2013), producto de la liberación de GABA hacia las neuronas POMC (Cowley et al. 2001; Fenselau et al. 2017; Zhan et al. 2013). La liberación de GABA se cree que media el principal efecto orexigénico desde las neuronas NPY/AgRP, corroborado por experimentos donde la delección de genes del transportador vesicular de GABA (vgat) específicamente en neuronas AgRP, da como resultado una atenuada hiperfagia en respuesta a grelina y un fenotipo delgado en ratones (Tong et al. 2008).

Trabajos realizados en los últimos años han catalogado a otras neuronas del ARC que están involucradas en el control de la ingesta alimenticia (Fenselau et al. 2017; Zhang and van den Pol 2016). Por ejemplo, utilizando activación optogenética en neuronas que expresan la enzima catecolaminérgica tirosina hidroxilasa (TH), los animales incrementan la ingesta alimenticia (Zhang and van den Pol 2016). Las neuronas TH son activadas por estímulos orexigénicos como la grelina o ayuno de 24 h, lo que a su vez activa a las neuronas NPY/AgRP, e inhibe a las neuronas POMC y neuronas localizadas en el núcleo paraventricular (PVN) (Zhang and van den Pol 2016). Otro grupo neuronal que participa en la regulación de la ingesta alimenticia, son las neuronas que expresan el transportador vesicular de glutamato 2 (vGluT2), que son activadas por leptina (van den Pool 2019). Se ha demostrado que las neuronas vGluT2 activan a las neuronas POMC a través de la liberación de glutamato, promoviendo la saciedad (Fenselau et al. 2017). Además, las neuronas vGluT2 son a su vez inhibidas por las neuronas TH, lo que conlleva a un efecto

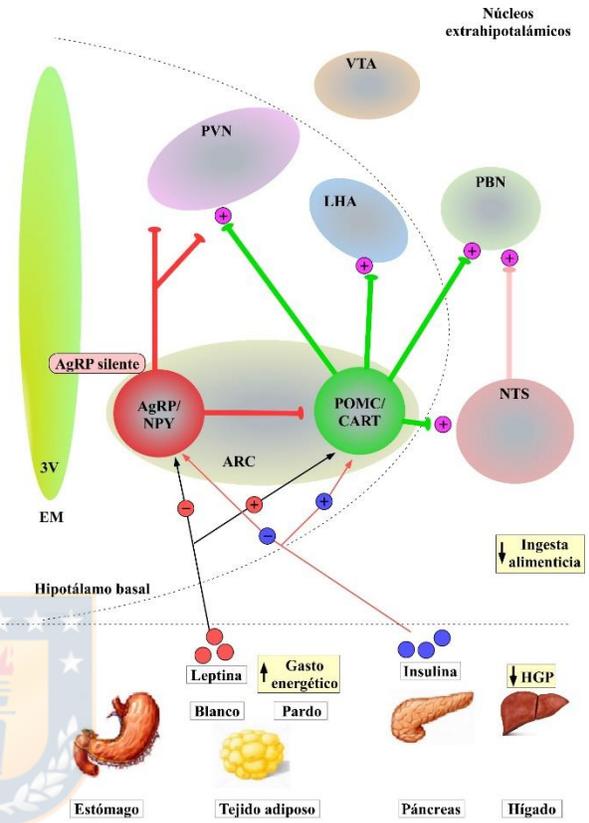
**Figura 1. Circuitos neuronales que controlan la ingesta alimenticia y gasto energético.**

**A.** Grelina estimula la ingesta alimenticia mediante la activación de las neuronas NPY/AgRP, los cuales proyectan a neuronas localizadas en el PVN y área hipotalámica lateral (LHA), inhibiéndolas y activándolas respectivamente. A su vez, las neuronas del LHA inhiben a las neuronas del área tegmental ventral (VTA) y del PVN, mediante la liberación de GABA. La activación de las neuronas NPY/AgRP conduce a un incremento en la ingesta alimenticia, una reducción del gasto energético e incremento de la producción de glucosa hepática post-absorvativa (PHG). Las neuronas NPY/AgRP inhiben a las neuronas POMC y a las neuronas del núcleo parabraquial (PBN), que tienen un rol en la estimulación de la ingesta alimenticia. **B.** La insulina y leptina, se unen a sus respectivos receptores localizados en las neuronas NPY/AgRP y POMC/CART, inhibiéndolas y activándolas respectivamente. La activación de POMC conduce a una disminución de la ingesta alimenticia y un aumento del gasto energético y en la PHG. Adaptado de Timper y col 2017 (Timper and Bruning 2017).

## Estado de ayuno



## Estado de alimentación



orexigénico (Fenselau et al. 2017). Recientemente, se ha descrito otra población neuronal en el ARC que expresa el péptido pre-pronociceptina (PNOC), donde la activación optogenética de estas neuronas, inhibe a las neuronas POMC a través de la liberación de GABA, produciendo un aumento en la ingesta alimenticia (Jais et al. 2020). Además, se han documentado otras poblaciones de neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas en el ARC que no pertenecen a las poblaciones ya mencionadas, indicando un mayor número de poblaciones hipotalámicas involucradas en el control de la ingesta alimenticia (Kim et al. 2015).

Además de los circuitos regulatorios existentes entre las poblaciones neuronales del ARC, neuronas POMC/CART y NPY/AgRP proyectan sus axones hacia otros núcleos neuronales del hipotálamo, como el PVN, el LHA y el VMN, regulando en ellos el balance de la ingesta alimenticia y gasto energético (Schwartz et al. 2000). De manera particular, las neuronas POMC activan a las neuronas single-minded 1 (SIM-1) del PVN mediante la activación de MC4R, disminuyendo la ingesta alimenticia (Y. Xu et al. 2010). Además, en el PVN, las neuronas POMC estimulan la secreción de diferentes hormonas anorexigénicas como la oxitocina, la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) (Millington 2007; Valassi et al. 2008). Por su parte, las neuronas NPY/AgRP liberan AgRP hacia el PVN, donde este antagoniza los efectos de  $\alpha$ -MSH proveniente de las neuronas POMC para la estimulación del apetito (Krashes et al. 2013). Además, estos se proyectan hacia el LHA, que contiene neuronas orexigénicas, estimulando la secreción de orexinas en respuesta a señales de hambre (Ebrahim et al. 2002). En adición, activación de las neuronas NPY/AgRP libera NPY hacia las neuronas POMC, cuyo mecanismo de señalización depende de su interacción con receptores Y1, causando una hiperpolarización, producto de la activación de canales rectificadores de

potasio (GIRK) (Roseberry et al. 2004). Además, NPY reduce el gasto energético a través de la interacción de NPY con el receptor Y1 en neuronas del PVN y del tronco cerebral, conduciendo a una disminución del tono simpático de vías aferentes que se dirigen al tejido adiposo pardo (Claret et al. 2007), produciendo una disminución de la termogénesis (Shi et al. 2013).

## **2.2 Participación de núcleos neuronales extra-hipotalámicos.**

Existen regiones extra-hipotalámicas que están involucradas en el control del balance energético, entre las que destaca el PBN (Roman et al. 2016) y el núcleo del tracto solitario (Claret et al. 2007; Schwartz et al. 2000). El PBN, un núcleo neuronal localizado en el puente tronco encefálico adyacente al pedúnculo cerebelar, contiene neuronas que suprimen el apetito (Becskei et al. 2007). Por su parte, el NTS integraría información sensorial provenientes del tracto gastrointestinal y vísceras abdominales, así como información gustativa de la cavidad bucal (Schwartz et al. 2000). De manera particular, determinadas señales inductoras de la saciedad provenientes del estómago e intestino delgado durante el periodo de ingesta, y señales hormonales como la colecistoquinina (CCK), actúan en el NTS para producir saciedad (Emond et al. 1999). Recientemente, se ha catalogado una población de neuronas del NTS que expresan pre-proglucagon (Ppg), que representa una población que expresa el receptor de leptina (LepRb), cuya activación disminuye la ingesta alimenticia (Cheng et al. 2020). Además, se ha documentado una pequeña población de neuronas POMC en el NTS (Rau et al. 2018) en ratones POMC-EGFP, en los que la administración intraperitoneal de CCK indujo la expresión de c-fos (marcador de activación neuronal) en las neuronas POMC, lo que sugiere que son activadas por hormonas de saciedad (Appleyard et al. 2005). De manera interesante, caracterización

neuroquímica de las neuronas POMC del NTS realizada en ratones POMC-EGFP, determinó que el 20% de ellas expresan el LepRb, y responden a leptina con aumento en el c-fos. Además, en el mismo reporte, se determinó que las neuronas POMC se despolarizan frente a leptina, ratificando que esta población de neuronas POMC producen saciedad (Georgescu et al. 2020).

### **2.3. Regulación hormonal de neuronas POMC en el ARC**

La expresión de POMC es suprimida durante el ayuno y es estimulada cuando las reservas de energía son restauradas (Nuzzaci et al. 2015). Una de las hormonas que impacta a las neuronas POMC que más extensamente se ha estudiado, es la leptina (Cowley et al. 2001; Georgescu et al. 2020; Millington 2007). La unión a su receptor en neuronas POMC incrementa la expresión de c-fos, de SOCS-3 y la fosforilación de STAT3, donde este último auto-dimerizará y se unirá a elementos del promotor pomc incrementando el ARNm de pomc (Varela and Horvath 2012). Además, se ha reportado que la selectiva delección de receptores de leptina en las neuronas POMC en ratones, desarrollan el fenotipo obeso, (Balthasar et al. 2004). Por otra parte, la insulina, se une al receptor de insulina (IR) estimulando la fosfaditil-inositol 3-kinasa (PI3K), conduciendo a la fosforilación de AKT y la subsecuente fosforilación de FOX1 que permite su exclusión nuclear, debido a que FOX1 impide la transcripción de pomc (Wattez et al. 2013). Estudios realizados en neuronas POMC con una delección del IR, muestran que esto no tiene demasiados efectos en la homeostasis de la glucosa o balance energético. Sin embargo, en modelos de doble *knockout* para LepRB y de IR, hay un desbalance en la homeostasis de la glucosa producto de una resistencia a la insulina (Hill et al. 2010), por lo que ambos son requeridos para una normal regulación de la homeostasis de la glucosa en el organismo.

### 2.3.1 Procesamiento de POMC en las neuronas del ARC

El gen *pomc* codifica un precursor polipeptídico de 241aa conocido como POMC, donde en el transcurso del tráfico granular, este péptido es finamente procesado mediante modificaciones post-traduccionales por una serie de enzimas serina proteasas, conocidas como pro-convertasas (PC). Inicialmente el péptido POMC es cortado por la enzima PC1/3 para producir adrenocorticotropina (ACTH) y beta-lipotropina ( $\beta$ -LPH). Procesamiento posterior, por la PC2, de la ACTH produce ACTH<sub>1-17</sub> y el péptido intermedio similar a la corticotropina (CLIP), así como el clivaje de  $\beta$ -LPH produce gama- lipotropina ( $\gamma$ -LPH) y beta-endorfina ( $\beta$ -END). A su vez, la  $\gamma$ -LPH tiene un procesamiento por PC2 para formar la hormona estimulante de melanocitos beta ( $\beta$ -MSH). Subsecuentemente, la carboxipeptidasa E (CPE) remueve el residuo de aminoácido C-terminal de ACTH<sub>1-17</sub> para producir ACTH<sub>1-13</sub> el cual es amidado por la enzima monooxigenasa  $\alpha$ -amidante de peptidilglicina (PAM) y finalmente acetilado por la N-acetiltransferasa para formar la hormona estimulante de melanocitos alfa ( $\alpha$ -MSH) (Wardlaw 2011; Wilkinson 2006). En el caso particular de mutaciones que interrumpen el clivaje de  $\beta$ -MSH y  $\beta$ -ENF, deficiencia en PC1/3 o deficiencia en la CPE, han sido asociados con el desarrollo de obesidad (Challis et al. 2002; Jackson et al. 2003). Mutaciones en regiones del N-terminal del POMC que compromete la dirección de los gránulos secretorios que contienen los neuropéptidos, han sido reportados en sujetos obesos (Creemers et al. 2008). Una vez producidos los neuropéptidos, estos se unen a los MC3R y MC4R (Millington 2007). La convencional vía de señalización de los MCRs neuronales son mediados por G $\alpha$ s, donde los neuropéptidos  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -MSH y ACTH exhiben diferentes afinidades por los MCRs, de acuerdo con ensayos de acumulación de AMPc. En relación con MC3R, el neuropéptido  $\gamma$ -MSH tiene mayor afinidad que  $\alpha$ ,  $\beta$ -MSH

y ACTH, y en cuanto a MC4R, los neuropéptidos  $\alpha$ ,  $\beta$ -MSH exhiben mayor afinidad que la contraparte  $\gamma$ -MSH (Millington 2007).

### **2.3.2. Rol de MC3R y MC4R en el balance energético.**

El MC3R funciona como un receptor auto-inhibitorio de las neuronas POMC, teniendo un efecto orexigénico (Millington 2007). Además, el MC3R está expresado en neuronas NPY/AgRP, cuya activación inhibe a las neuronas POMC a través de la liberación de GABA (Demidowich et al. 2017). En estudios electrofisiológicos en ratones POMC-EGFP, D-Trp8- $\gamma$ -MSH (agonista de MC3R) aumenta la frecuencia de las corrientes postsinápticas inhibitorias (IPSCs) mediadas por GABA en las neuronas POMC, hiperpolarizándolas (Cowley et al. 2001). Modelos de ratón que tienen una delección de MC3R (*mcr3<sup>-/-</sup>*) exhiben hiperleptinemia e hiperinsulinemia (Chen et al. 2000). Además, en ese mismo trabajo, los ratones tienen un incremento en los depósitos de grasa y una reducción de la masa magra a pesar de que la ingesta alimenticia es normal en comparación con los modelos *wild-type*. Los autores indicaron que los modelos *mcr3<sup>-/-</sup>* tienen una razón de “ganancia de peso/ingesta alimenticia” superior a los modelos *wild-type*, sugiriendo que los ratones tienen una ingesta alimenticia normal y aumento en los depósitos de grasa.

Por su parte, el MC4R está ampliamente expresado en el cerebro, donde destacan las regiones del ARC, PVN, núcleo dorsomedial (DMN) y el núcleo intermedio lateral (IML) (Kishi et al. 2003; H. Liu et al. 2003). MC4R media diferentes efectos metabólicos dependiendo del tipo celular que lo exprese. Particularmente, la activación de MC4R en neuronas glutamatérgicas y SIM-1 del PVN por  $\alpha$ -MSH disminuye la ingesta alimenticia (Mercer et al. 2013; Millington 2007). Por otro lado, la activación de MC4R en neuronas del DMN y en neuronas simpáticas colinérgicas preganglionares I del núcleo IML de la

médula espinal controlan las señales simpáticas hacia el tejido adiposo para controlar el gasto energético y termogénesis (Balthasar et al. 2005). Además, las neuronas del IML regulan el metabolismo de la glucosa, mediante eferentes que controlan la liberación de glucosa por parte del hígado (Rossi et al. 2011). Por otro lado, se ha demostrado que deleciones en la región codificante de mc4r desarrollan obesidad en modelos de ratón, asociándose con hiperfagia, hiperinsulinemia, hiperglicemia e hiperleptinemia (Huszar et al. 1997). De manera interesante, el receptor MC4R en neuronas POMC puede actuar de una manera auto-excitatorio, que potencia la activación de las neuronas POMC con  $\alpha$ -MSH para producir saciedad (do Carmo et al. 2013).

#### **2.4. Comportamiento electrofisiológico de las neuronas POMC hipotalámicas frente a glucosa.**

Utilizando registros electrofisiológicos se ha determinado que algunas sub-poblaciones de neuronas del ARC son despolarizadas frente a aumentos en la concentración de glucosa, conocidas como neuronas excitadas por glucosa (Fioramonti et al. 2007; Ibrahim et al. 2003). Trabajos realizados por Ibrahim y Claret en rebanadas de hipotálamo de ratones transgénicos POMC-EGFP determinaron que las neuronas POMC son neuronas excitadas por incrementos en la concentración de glucosa, y que los mecanismos de detección implicarían la participación del canal de potasio sensible a ATP ( $K_{ATP}$ ) (Claret et al. 2007; Ibrahim et al. 2003). Estudios realizados por Parton y col, utilizando ratones transgénicos que presentan la sub-unidad del  $K_{ATP}$  Kir6.2 mutada en neuronas POMC, demostraron que estas neuronas pierden la capacidad de responder frente al aumento en la concentración de glucosa. Además, la liberación de  $\alpha$ -MSH dependiente de glucosa se ve afectada en los ratones que tienen la sub-unidad del  $K_{ATP}$  Kir6.2 mutada en neuronas POMC, sugiriendo

que el  $K_{ATP}$  acoplaría el estado eléctrico con el estado metabólico de las neuronas POMC (Parton et al. 2007). Sin embargo, otros grupos de investigación no lograron determinar que las NGE correspondieran a neuronas POMC (Fioramonti et al. 2007; Wang et al. 2004). Estos estudios han sido acompañados con ensayos complementarios de expresión de POMC por inmunohistoquímica, donde no se pudo determinar que las NGE correspondan a neuronas POMC (Wang et al. 2004) o que la inyección de glucosa en ratones no aumenta c-fos en neuronas POMC (Fioramonti et al. 2007).

Debido a que las neuronas POMC se encuentran en una región altamente concentrada con células que integran señales hormonales y nutricionales, es altamente plausible hipotetizar que las neuronas POMC puedan tener entradas sinápticas provenientes de otras neuronas que detectan glucosa. Estudios realizados por Hu et al 2014 en rebanadas de hipotálamo demostraron que existe heterogeneidad de respuesta de las neuronas POMC a glucosa en términos de la cuantificación de corrientes post-sinápticas excitatorias (EPSCs). Se determinaron que hay múltiples formas de que la glucoprivación en neuronas POMC induce plasticidad sináptica excitatoria, documentándose; 1) neuronas POMC que aumentan las EPSCs, 2) que disminuyen las EPSCs, 3) las que no responden y finalmente una población de neuronas POMC que responden a glucosa de una manera bifásica en relación con el tiempo, donde hay un aumento en los primeros 15 min y luego una disminución de los EPSC (Hu et al. 2014).

### **3. Tanicitos en el control de la ingesta alimentaria y homeostasis de la glucosa.**

Las poblaciones neuronales del ARC poseen un posicionamiento estratégico en el hipotálamo, donde no solo el parénquima está constantemente recibiendo hormonas y nutrientes provenientes de la circulación sanguínea, sino que también factores contenidos en el líquido cefalorraquídeo (LCR) entregados por los tanicitos, células gliales que recubren el 3V (Langlet et al. 2013; Rodriguez et al. 2010) (**Fig. 2A**). La regulación del paso de glucosa está determinada por células endoteliales especializadas de los capilares fenestrados y células ependimales, conformando la red vascularizada en la eminencia media (ME) hipotalámica (Rodriguez et al. 2010). Uno de los transportadores de glucosa involucrado en la entrada de glucosa al cerebro por la ME es GLUT1 (Cardoso et al. 2010). Las características cinéticas de GLUT1 para el transporte de glucosa ( $K_m$  de 2 mM), fundamenta que la concentración de glucosa sea de 30-40% a la sanguínea, lo que equivale a 1.5-2 mM de glucosa. De manera interesante, Langlet y col demostraron que, en una condición de hipoglicemia, se produce un incremento de la permeabilidad de nutrientes al ARC, producto de cambios en la cito-arquitectura de la ME (Langlet et al. 2013), por lo que es posible plantear que existan numerosos mecanismos que permitan la detección directa de nutrientes y/o hormonas provenientes de la sangre.

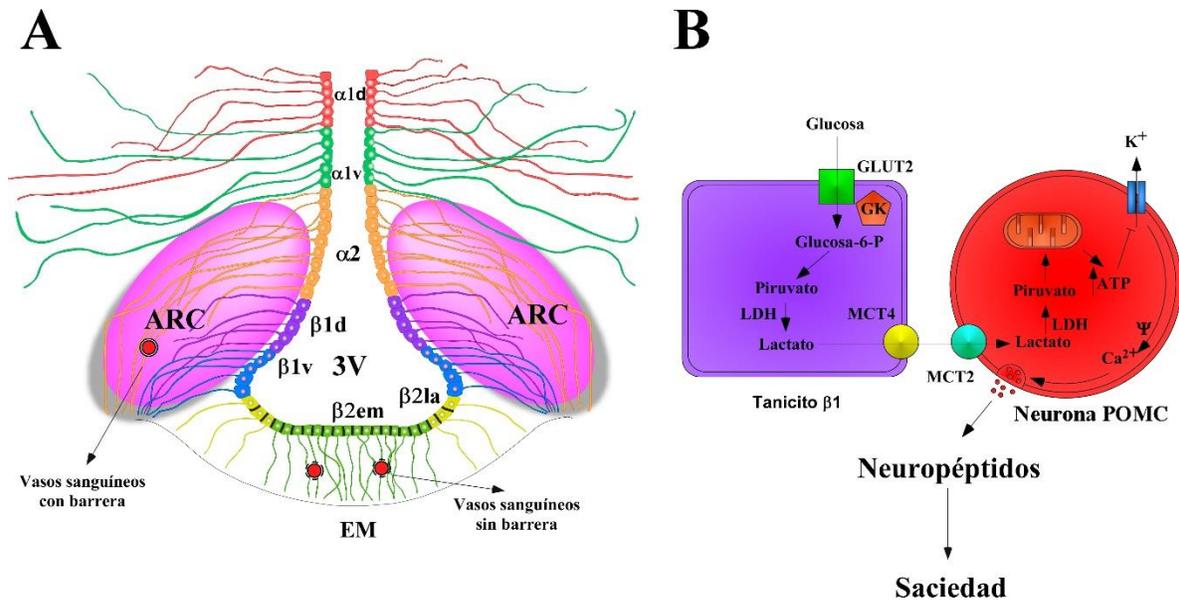
A pesar de que estudios electrofisiológicos indican que las neuronas tienen mecanismos intrínsecos de activación por glucosa (Cowley et al. 2001; Fioramonti et al. 2007), algunas poblaciones neuronales en el ARC no tienen acceso directo a la glucosa, ni tampoco tienen acceso al LCR. Además, estudios realizados mediante microdialisis en el VMH de rata, a niveles normales de glicemia, la concentración de glucosa en el parénquima cerebral es de aproximadamente 1,6 mM, siendo poco probable que las neuronas puedan detectar variaciones directas de glucosa (de Vries et al. 2003). Algunos autores han propuesto un

mecanismo indirecto de glucodetección, que involucra una interacción metabólica entre los tanicitos y las neuronas a través de lactato (**Fig. 2B**). Registros electrofisiológicos realizados en el VMN han determinado que el lactato incrementa la frecuencia de potenciales de acción de las NGE, sugiriendo que el lactato pueda estar involucrado en el sistema sensor de glucosa hipotalámico (Song and Routh 2005).

Mas aún, en el ARC existen células gliales en estrecho contacto con las neuronas, los tanicitos, (Rodriguez et al. 2010), que son de morfología elongada y a diferencia de los endimocitos, estos carecen de cilios (Altman and Bayer 1978). Su región proximal hace contacto con el LCR y sus procesos basales se proyectan hacia el parénquima del ARC estableciendo contacto con los vasos sanguíneos con barrera (V+) y sin barrera (V-). De manera interesante, sus procesos también establecen contactos con las neuronas que están ubicadas en la zona periventricular del hipotálamo (ARC y VMN) (**Fig. 2A**). En el hipotálamo de rata se ha demostrado que los tanicitos  $\alpha 1$  proyectan procesos basales hacia el VMN, mientras que los  $\alpha 2$  lo hacen hacia el ARC dorsal, formando una interface entre el LCR y los cuerpos neuronales, permitiendo así, un intercambio de moléculas entre ambos (M. A. Garcia et al. 2001). Los tanicitos  $\beta 1$  tapizan el receso infundibular y sus procesos basales toman contacto con la región basal del ARC y la región lateral de la ME. Por último, los tanicitos  $\beta 2$  cubren el piso del tercer ventrículo y forman la barrera LCR-ME y sus procesos basales se proyectan hasta la región palisádica de la ME (Rodriguez et al. 2005). Dada las características anatómicas, y moleculares, se propone que los tanicitos están capacitados para acoplarse funcional y metabólicamente con neuronas de la región hipotalámica que controlan la ingesta alimenticia. Se ha determinado que los tanicitos localizan en su región proximal el transportador de alta capacidad GLUT2 (M. Garcia et al. 2003) y expresan la enzima glucoquinasa (GK) (Millan et al. 2010) y la proteína

reguladora de la GK (GKRP) (Salgado et al. 2014), capacitándolos para detectar cambios en la concentración de glucosa del LCR. Además, nuestro grupo de investigación ha evidenciado que cultivo primario de tanicitosexpuestos a 15 mM de glucosa, exportan lactato a través de los transportadores de monocarboxilatos 1 y 4 (MCTs) (Cortes-Campos et al. 2011). En adición, hemos demostrado que las neuronas hipotalámicas expresan MCT2, principal transportador involucrado en la incorporación de lactato (Cortes-Campos et al. 2013).





**Figura 2. Hipotálamo basal y el mecanismo propuesto para la participación de MCTs en tanicitos y en neuronas anorexigénicas para regular la ingesta alimenticia.** **A.** Los tanicitos- $\alpha 2$  ( $\alpha 2$ ), tanicitos- $\beta 1d$  ( $\beta 1d$ ) y tanicitos- $\beta 1v$  ( $\beta 1v$ ) se proyectan hacia el ARC, haciendo contacto con las neuronas anorexigénicas y vasos sanguíneos con barrera. En el piso de la 3V, los tanicitos laterales- $\beta 2$  ( $\beta 2la$ ) y los tanicitos mediales- $\beta 2$  ( $\beta 2me$ ) están unidos por uniones estrechas que forman parte de la barrera LCR-ME, y sus proyecciones hacen contacto con los vasos sanguíneos fenestrados de la ME. **B.** Con niveles altos de glucosa, los tanicitos incorporan glucosa a través de GLUT2, la cual es fosforilada por la enzima GK. Los tanicitos generan lactato, que se libera a través de MCT4 hacia las neuronas vecinas. Las neuronas POMC incorporan lactato a través de MCT2 y activan la producción de ATP neuronal, provocando la liberación de neuropéptidos anorexigénicos que producirán saciedad. Adaptado de Elizondo y col 2015 (Elizondo-Vega et al. 2015).

#### **4. Acoplamiento metabólico glía-neurona.**

Durante la activación neuronal, gran parte de la glucosa es captada y metabolizada por los astrocitos (Chuquet et al. 2010). En este proceso, los astrocitos metabolizarían la glucosa a piruvato, y posteriormente a lactato, donde este último sería transferido hacia las neuronas a través de MCTs. Frente a este escenario, se ha propuesto la hipótesis de acoplamiento metabólico astrocito-neurona mediada por lactato (Pellerin and Magistretti 1994). No es sorprendente que los perfiles metabólicos que hacen posible este acoplamiento sean reflejo de la expresión de enzimas, MCTs y además del ambiente oxidativo de cada célula. La primera parte de este acoplamiento se relaciona a la alta tasa glicolítica de los astrocitos, que conlleva a la producción de piruvato (Deitmer et al. 2019). Sin embargo, los carbonos del piruvato no son utilizados en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos y la posterior fosforilación oxidativa en astrocitos. Una de las razones es por la presencia de la piruvato deshidrogenasa (PDH) que está altamente fosforilada en astrocitos (bajando su actividad enzimática), por lo que no se ve favorecida la formación de acetil-CoA (Itoh et al. 2003). Además, se ha documentado la expresión de la láctico deshidrogenasa 5 (LDH5) (enzima que está expresada en células que producen lactato) en astrocitos, que transforma el piruvato a lactato en presencia de NADH (Bittar et al. 1996; Laughton et al. 2007), indicándose que esta reacción se ve favorecida debido a que la razón  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  se ve aumentada en astrocitos. Por su parte, se ha documentado que las neuronas expresan la LDH1 (enzima que está expresada en células que consumen lactato) y además la razón  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  se ve disminuida, favoreciendo la conversión de lactato a piruvato (Bittar et al. 1996), que llevaría a la producción de ATP de la fosforilación oxidativa.

De manera interesante en experimentos realizados en astrocitos del *locus coeruleus* que expresan exógenamente el canal de rodopsina 2 (ChR2), la activación optogenética con luz azul, produce la liberación de lactato el cual excita a las neuronas adyacentes, lo que desencadena a su vez la liberación de norepinefrina (Tang et al. 2014). También existen trabajos realizados en rebanadas de hipocampo y en modelos *in vivo* de rata, que demuestran que el lactato mantiene la actividad neuronal en ausencia de glucosa (Schurr and Payne 2007; Wyss et al. 2011).

Por su parte, algunos autores han apoyado el modelo de interacción metabólica en el hipotálamo, donde los tanicitos en respuesta a glucosa, se acoplarían con las neuronas neuroendocrinas que controlan la ingesta alimenticia (Bolborea et al. 2020; Cortes-Campos et al. 2011; Elizondo-Vega et al. 2015). Previos estudios han demostrado que los tanicitos responden con ondas de movilización de calcio intracelular en respuesta a cambios en la concentración de glucosa en rebanadas de hipotálamo (Frayling et al. 2011). Además, se demostró que las ondas de calcio son dependientes de la concentración de ATP después de la aplicación de glucosa, liberación de ATP al medio extracelular, la activación de receptores purinérgicos Y1(P2Y1R) y el aumento en la concentración de calcio intracelular en los tanicitos (Orellana et al. 2012). De manera interesante, reciente evidencia ha determinado que la estimulación con luz azul en tanicitos que expresan una variante del ChR2 (Catch), produce aumentos en la concentración de calcio intracelular, y que además despolarizan a las neuronas POMC y AgRP (Bolborea et al. 2020). Además, en los mismos estudios, se determinó que la activación de los tanicitos libera ATP, produciendo la activación de receptores P2Y1 y P2 en las neuronas. Este cuerpo de evidencia sugiere fuertemente que los tanicitos responden frente a cambios en la concentración de glucosa y que pueden activar a las neuronas hipotalámicas. La capacidad de los tanicitos para sentir

glucosa se correlaciona con la expresión de GLUT2 (M. Garcia et al. 2003), un transportador de glucosa de baja afinidad que capacita a la célula detectar altas concentraciones de glucosa. Este modelo de detección de glucosa en tanicitos es apoyado con la expresión de GK, enzima de alta capacidad que cataliza la conversión de glucosa a glucosa-6-fosfato en presencia de ATP (**Fig. 2B**) (Millan et al. 2010; Salgado et al. 2014). Mas aún, nuestro laboratorio ha demostrado que la inhibición de GLUT2 y GK en modelos *in vivo* generan alteraciones de la ingesta alimenticia en ratas, sugiriendo que los tanicitos están involucrados en las respuestas neuroendocrinas que controlan el balance energético (Barahona et al. 2018; Uranga et al. 2019). Además, mediante análisis bioluminiscente de detección de ATP con luciferasa, cultivos de tanicitos y neuronas fueron expuestos a cambios en la concentración de glucosa de 3 a 15 mM, donde solamente en los tanicitos se logró detectar un aumento en el ATP citosólico (ATPc). De manera interesante, cuando los cultivos de neuronas son incubados con 5 mM de lactato (no de piruvato), se produce un aumento significativo de ATPc, no así con los tanicitos (Ainscow et al. 2002). Esta evidencia nos llevaría a proponer un mecanismo en el cual los tanicitos liberan lactato en respuesta a glucosa, el cual a su vez impactaría en las neuronas adyacentes que controlan la ingesta alimenticia (Elizondo-Vega et al. 2015). Estos hallazgos se sustentan en que ambos tipos celulares expresan MCTs, donde los tanicitos expresan MCT1 y MCT4, y por su parte las neuronas del ARC expresan principalmente MCT2 (Cortes-Campos et al. 2013). Esta expresión determinaría que el lactato producido por los tanicitos en respuesta a glucosa sería exportado a través de MCT1 y MCT4 hacia las neuronas adyacentes, y estas lo incorporarían a través de MCT2. En adición, nuestro laboratorio demostró que utilizando un modelo *knockdown* para MCT1 y MCT4 en ratas, resultó en alteraciones de la ingesta alimenticia, por lo que el exporte de lactato sería parte del mecanismo que activa

a las neuronas del ARC (Elizondo-Vega et al. 2020). Por otro lado, nuestro grupo de investigación ha demostrado en modelos de ratón que los  $\alpha$ -tanicitos se acoplan con células del parénquima a través de conexinas, especialmente los astrocitos (Recabal et al. 2018). Esto aborda la posibilidad que se proponga un acoplamiento panglial entre tanicitos y astrocitos a través de lactato, para que este monocarboxilato sea exportado por los astrocitos para la activación neuronal a través de MCTs. Debido a la localización de MCT2 en la membrana de las neuronas POMC, es plausible proponer que el lactato pueda ser incorporado por MCT2, ser metabolizado para la producción de ATP y cerrar el  $K_{ATP}$ , provocando despolarización y liberación de  $\alpha$ -MSH para generar saciedad. Estos hallazgos están apoyados por trabajos realizados por Lam, donde la inyección de lactato en el 3V produce una disminución de la ingesta alimenticia, resultado similar a los evocados por glucosa (Lam et al. 2008). Además, en ese mismo trabajo, la inhibición del metabolismo central del lactato con oxamato (inhibidor de la láctico deshidrogenasa) impidió la capacidad del lactato circulante para reducir la ingesta alimenticia y el peso corporal. A pesar de esta evidencia, los mecanismos por el cual el lactato activaría a las neuronas hipotalámicas, en especial a las POMC, todavía no se ha investigado con profundidad.

## **5. Transporte de lactato en el hipotálamo.**

Los MCTs conforman una familia de transportadores que son esenciales para el transporte de monocarboxilatos de cadena corta, nutrientes, hormonas y aminoácidos (Halestrap and Wilson 2012; Halestrap 2012). Se han identificado catorce isoformas dentro de la familia de MCTs (MCT1-14), distribuidos en una amplia variedad de tejidos (Broer et al. 1999). Sin embargo, los MCTs1-4 han sido los únicos catalogados que utilizan el gradiente electroquímico de protones, transportando monocarboxilatos y protones en relación

1:1(Halestrap 2012). En términos estructurales, los MCTs comparten una conservada identidad aminoacídica. Los MCTs contienen 12 dominios transmembrana y un dominio intracelular C y N terminal y un largo loop citosólico entre la TM 6 y 7 (Broer et al. 1999; Meredith and Christian 2008). De manera adicional, los MCTs tienen una dependencia de proteínas de anclaje, confiriéndole propiedades de tráfico y funcionalidad. Particularmente, basigina actúa como una proteína chaperona para los MCTs 1 y 4 (Kirk et al. 2000; Philp et al. 2003; Zhao et al. 2001) y embigina, por su parte, preferencialmente interacciona con MCT2 (Ovens et al. 2010; Wilson et al. 2005; Wilson et al. 2013). A pesar de que los MCTs comparten similitud estructural, ellos tienen una expresión y regulación distintivos, aparte de la especificidad de ligandos con únicas características de impacto fisiológico (Halestrap and Wilson 2012). A la fecha, sólo se han realizado análisis cinéticos para demostrar la funcionalidad de los transportadores MCT1 a MCT4. Los transportadores MCT1, MCT3 y MCT4 poseen una alta capacidad para el transporte de L-lactato con Kms aparentes de 7.7 mM, 5.8 mM y 34 mM, respectivamente (Broer et al. 1997; Broer et al. 1999; Dimmer et al. 2000; Grollman et al. 2000). El transportador MCT2 presenta una Km aparente de 0.74 mM para el transporte de L-lactato (Broer et al. 1997; Broer et al. 1999; Dimmer et al. 2000; Grollman et al. 2000; Lin et al. 1998). Se ha determinado que MCT1, MCT2 y MCT4 son inhibidos por análogos de sustrato como  $\alpha$ -cianohidroxycinamato (4-CIN), inhibidores del transporte aniónico general como el ácido 4,4-di-isotiocianoestibeno-2,2-disulfónico (DIDS) y flavonoides como quercetina y fletina (Broer et al. 1999; Dimmer et al. 2000; Lin et al. 1998). La distribución celular de MCTs en el hipotálamo ha sido abordada en un número limitado de estudios. MCT1 se localiza en los procesos terminales de los tanicitos contactando las células endoteliales de los vasos sanguíneos en el ARC (Cortes-Campos et al. 2011). En los mismos estudios, se

ha descrito que MCT4 se localiza en la región lateral del ARC, particularmente en los procesos de los tanicitos que contactan principalmente neuronas anorexigénicas. En el hipotálamo, se ha determinado que aproximadamente el 60% y el 80% de las neuronas POMC y AgRP expresan MCT2 respectivamente (Cortes-Campos et al. 2013), haciendo plausible que MCT2 esté involucrado en el mecanismo de interacción metabólica entre tanicitos y neuronas del ARC.

## **6. Lactato como una molécula de señalización intercelular.**

### **6.1 Generalidades del receptor de ácido hidroxicarboxílico 1 (HCAR1).**

En adición a su prominente rol como un sustrato energético en el cerebro, intrigante evidencia ha emergido con relación al rol del lactato como una molécula de señalización para controlar procesos neuronales (Ahmed 2011; Bozzo et al. 2013; Castillo et al. 2015; de Castro Abrantes et al. 2019; Herrera-Lopez and Galvan 2018). De manera particular, los monocarboxilatos como el lactato pueden unirse a determinados receptores acoplados a proteína G, conocidos como receptores de ácidos hidroxicarboxílicos (HCARs) (Blad et al. 2011). La familia de HCARs consiste en tres miembros; HCAR1, HCAR2, y HCAR3, también conocidos como GPR81, GPR109A, y GPR109B, respectivamente (Ahmed 2011; Offermanns 2017). Los ligandos de estos receptores son intermediarios metabólicos clave, cuyo nivel local y sistémico reflejan determinados estados metabólicos. De manera particular, el L-lactato, activa HCAR1, mientras que el  $\beta$ -HB y el ácido butírico activan HCAR2 y HCAR3, respectivamente (Blad et al. 2011). En relación al mecanismo de señalización, a través de estudios que involucran el uso de *toxina pertussis*, (PTX, toxina que inactiva específicamente la sub-unidad  $\alpha$  de las proteínas tipo Gi/o) (Mangmool and Kurose 2011), se ha documentado

que todos los HCARs se acoplan a proteínas G inhibitoria (G $\alpha$ i), seguido por la disminución de la formación AMPc dependiente de la adenilato ciclasa (AC) (Offermanns 2017). Todos los HCARs están altamente expresados en el tejido adiposo blanco y pardo, demostrándose que la activación de estos receptores inhibe la lipólisis, produciendo disminución de la liberación de ácidos grasos libres y glicerol (Cai et al. 2008; Ge et al. 2008; C. Liu et al. 2009). Además, se ha documentado que HCAR2 y HCAR3 son los únicos que están expresados en células del sistema inmune (neutrófilos, monocitos y macrófagos), el cual son particularmente importantes para mediar efectos anti-inflamatorios (Offermanns 2017).

## **6.2 Rol de HCAR1 en el tejido adiposo.**

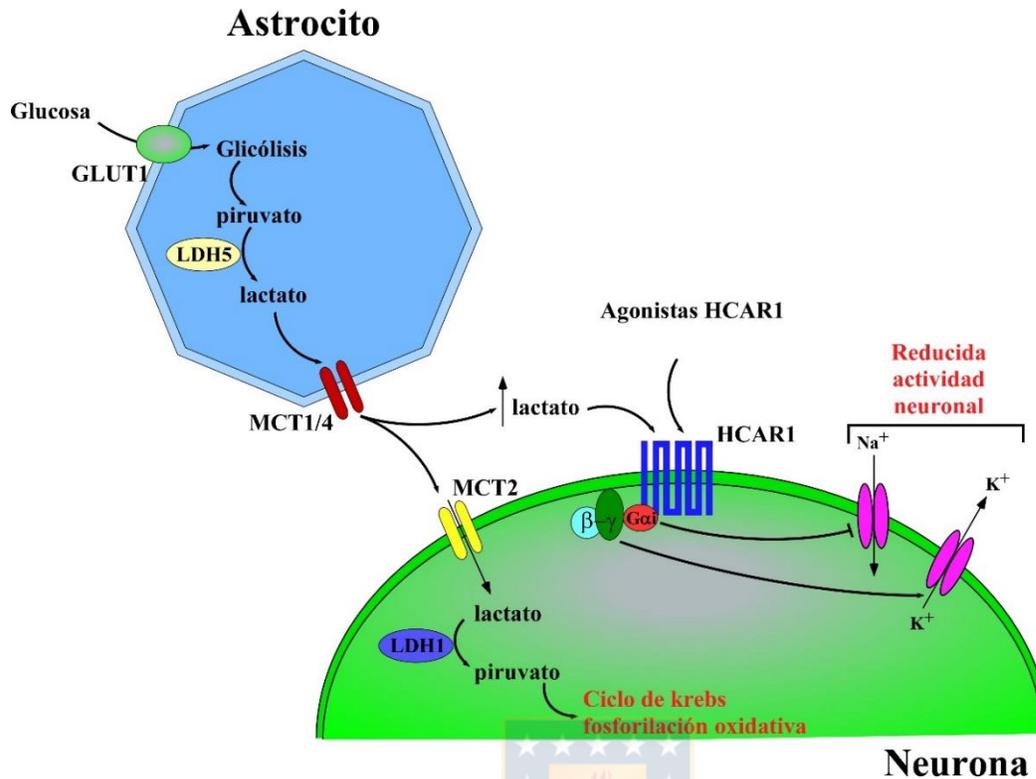
Abundante evidencia ha indicado el rol de HCAR1 involucrado en los efectos anti-lipolíticos en el tejido adiposo (Ahmed et al. 2010; Cai et al. 2008; Ge et al. 2008; C. Liu et al. 2009). Es de consideración que el lactato es producido de la glucosa a través de la glicolisis y la conversión de piruvato por la LDH en el tejido adiposo (Jeong et al. 2018). Mas importante aún, se ha demostrado en modelos *in vitro*, que los adipocitos son capaces de liberar lactato cuando se incuban con glucosa (DiGirolamo et al. 1992). Debido a que la concentración de lactato en el espacio intersticial aumenta después de la captación de glucosa inducida por insulina, el lactato puede actuar de una manera autocrina/paracrina para mediar los efectos anti-lipolíticos a través de la activación de HCAR1 (Ahmed et al. 2010). Frente a este escenario, el efecto anti-lipolítico es ejercido por al menos dos mecanismos; 1) la cascada de señalización cuando la insulina se une al IR, produciendo la activación de la fosfodiesterasa 3B (PDE3B) y la subsecuente degradación de AMPc (Arner 2005) y 2), inhibición de la formación de AMPc inducido por el lactato cuando se une a HCAR1 (Ahmed et al. 2010; Cai et al. 2008; C. Liu et al. 2009). Producto de la disminución de AMPc, no estará activada

la PKA, por lo que no fosforilará a la hormona sensible a lipasa (HSL) ni a la lipasa de triglicéridos adiposos (ATGL), cuyo resultado final es una disminución de la degradación de triglicéridos (Schreiber et al. 2019). De manera interesante, en modelos *knock-out* de HCAR1 se observa una reducida inhibición de la lipólisis inducida por la insulina, por lo que HCAR1 contribuiría enormemente a este efecto, sin embargo, se necesita más evidencia para clarificar este mecanismo.

### **6.3 Rol de HCAR1 a nivel cerebral.**

El descubrimiento de un receptor acoplado a proteína G para el lactato en el cerebro, ha abierto una nueva dimensionalidad del lactato en relación con su rol de señalización para la regulación de la actividad neuronal. Debido a que se ha evidenciado que HCAR1 es activado dentro de un rango de concentraciones (1.3-4.8 mM) (Offermanns 2017), resulta altamente plausible proponer que el lactato pueda activar a HCAR1 a nivel cerebral. En primera instancia, la localización de HCAR1 en el cerebro fue reportada por Lauritzen, evidenciándose su presencia en el soma y dendritas de las células de Purkinje, células piramidales y astrocitos del hipocampo, neuronas del giro dentado y neocorteza (Castillo et al. 2015; Lauritzen et al. 2014; Ma et al. 2020). Recientemente, trabajos realizados por Hadzic, se analizó la distribución de HCAR1 en la parte dorsal del tercer ventrículo usando una proteína fluorescente roja bajo el promotor de HCAR1 (mRFP-HCAR1), reportándose que HCAR1 está expresado en células del plexo coroideo y el revestimiento neuroepitelial ventricular (Hadzic et al. 2020). Además, se ha demostrado su funcionalidad, donde la activación de HCAR1 con L-lactato y 3.5-DHBA (agonista específico de HCAR1), reduce tanto la producción de AMPc en rebanadas de hipocampo (Lauritzen et al. 2014) como la frecuencia de ondas de calcio de neuronas GABAérgicas y principales en modelos de cultivos

corticales (Bozzo et al. 2013). De manera similar, se ha determinado que el L-lactato modula la excitabilidad de manera intrínseca de las células CA1 piramidales del hipocampo, y que este efecto es abolido cuando las células se exponen con PTX, confirmando la naturaleza Gi/o de HCAR1 (Herrera-Lopez and Galvan 2018) (**Fig. 3**). Mas aún, registros electrofisiológicos en cultivo primario de neuronas corticales de ratón, la activación de HCAR1 mediante el agonista específico 3Cl-HBA, disminuye tanto la frecuencia de las corrientes postsinápticas excitatorias en miniatura (mEPSC) como la tasa de disparo de las neuronas (de Castro Abrantes et al. 2019). Además, en los mismos estudios se describe que HCAR1 interacciona con receptores GABA<sub>B</sub> y  $\beta$ -adrenérgicos, a través de un mecanismo que involucra las subunidades G $\alpha$  y G $\beta\gamma$ . Por otro lado, estudios realizados por Tang y col 2014, demostraron que la activación optogenética de los astrocitos libera lactato hacia las neuronas del *locus coeruleus*, lo cual activará a las neuronas mediante una señalización dependiente de un receptor de lactato acoplado a Gs (Tang et al. 2014). Por lo tanto, es posible que el lactato posea otro mecanismo de señalización, además del asociado a su transporte, el cual aún no se ha caracterizado.



**Figura 3. Representación esquemática de los mecanismos utilizados por el lactato extracelular para reducir la excitabilidad neuronal de células piramidales CA1 del hipocampo.** Después de la producción de astrocitos y la liberación posterior a través de MCTs, el lactato interactúa con las células piramidales CA1 utilizando al menos dos vías: 1) a través de MCT2 o 2) la unión a HCAR1. Transporte de lactato vía MCT2 conduce a una serie de acciones ligadas al metabolismo, incluida la conversión a piruvato, la incorporación al ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa. La unión del lactato a HCAR1, una vía acoplada a proteínas G $\alpha_i/o$ , implica la modulación de mecanismos relacionados con los iones, incluyendo, pero no limitado a, reducción de las corrientes de Na $^+$  y aumento de las conductancias de K $^+$ . La activación de HCAR1 modifica propiedades y remodela la excitabilidad neuronal de las neuronas del hipocampo. Adaptado de Herrera y Lopez-Galvan y col 2018 (Herrera-Lopez and Galvan 2018).

## Planteamiento general del problema e hipótesis

Se ha demostrado que el hipotálamo detecta y responde a cambios en la concentración de glucosa sistémica, para regular la ingesta alimenticia y el gasto energético. En esta región existen agrupaciones neuronales involucradas en este proceso, destacando las neuronas del ARC. En él se encuentran neuronas NGE, donde una población de éstas son a su vez neuronas POMC. Estudios electrofisiológicos en rebanadas de hipotálamo indican que las neuronas POMC responden al aumento de glucosa a través de canales de  $K_{ATP}$  para la liberación de  $\alpha$ -MSH. Sin embargo, una importante línea de evidencias apoya la participación de los tanicitos en la generación y transferencia de lactato a las neuronas que controlan la ingesta alimenticia. Es así como hemos demostrado que la inhibición de la expresión de proteínas implicadas en la glucodetección (GLUT2 y GK) y en la liberación de lactato desde los tanicitos (MCT1 y MCT4) produce cambios en el comportamiento alimenticio. Además, registros electrofisiológicos en rebanadas cerebrales han demostrado que el lactato incrementa la frecuencia de los potenciales de acción de las NGE, no precisando si corresponden a neuronas POMC. Hemos demostrado que las neuronas hipotalámicas incorporan lactato usando MCT2 y que este transportador se localiza en neuronas POMC. Además, recientemente, se han caracterizado los HCARs en el cerebro, específicamente el HCAR1 que es activado por lactato. Sin embargo, se desconoce si están expresados en el hipotálamo y si cumplen una función en regular la actividad de las neuronas POMC.

Por lo tanto, en este trabajo de tesis, nos preguntamos, si el lactato es capaz de activar a las neuronas POMC que regulan la ingesta alimenticia, y determinar si este mecanismo involucra la participación de transportadores y/o receptores.

Nosotros hipotetizamos que: **El lactato despolariza a las neuronas anorexigénicas por un mecanismo que involucra la participación de MCT2 y/o HCAR1.**

## **OBJETIVOS**

**OBJETIVO GENERAL:** Estudiar la función de MCT2 y HCAR1 en neuronas del ARC y analizar la consecuencia funcional de su inhibición *in vivo*.

**OBJETIVO 1:** Determinar la distribución celular de HCAR1 en el hipotálamo.

**OBJETIVO 2:** Determinar si las neuronas POMC responden a lactato y definir si el mecanismo involucra la participación de MCT2 y/o HCAR1.



### III MATERIALES Y MÉTODOS

#### 1. Animales de experimentación.

Todos los estudios realizados en la Universidad de Maryland que involucraron cuidados y procedimientos de animales se realizaron de acuerdo con las pautas nacionales e internacionales, y fueron aprobados por la *University of Maryland* y el *Institutional Animal Care and Use Committee* (IACUC), de acuerdo con las pautas del *National institute of health* (NIH). Los ratones se alojaron en grupo (2–4 hermanos) a 22–24 °C con un ciclo de luz-oscuridad de 12 h, y con acceso *ad libitum* a una dieta regular y agua. Todas las dietas se proporcionaron en forma de gránulos. Los ratones fueron sacrificados por narcosis por CO<sub>2</sub>. Los ratones POMC-CRE (Jax, 010714) se obtuvieron desde *Jackson Laboratory* (Bar Harbor, ME, USA). Todos los estudios realizados en la Universidad de Concepción fueron aprobados y revisados por el Comité de Ética Animal de la Comisión Nacional de Estudios Científicos y Tecnológicos de Chile (CONICYT, Fondecyt N° 1180871), por el comité de ética de la Facultad de Ciencias Biológicas y por el comité de Ética, Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Concepción, Chile. Los procedimientos experimentales se realizaron utilizando C57BL / 6J (00066) y C57BL/6J-Tg (POMC-EGFP) 1Low, 009593), obtenidos desde *Jackson Laboratory*.

#### 2. Cirugía estereotáxica.

Previamente a los registros electrofisiológicos se realizó la cirugía estereotáxica para administrar AAV-FLEX-GFP (serotipo PHPeB, título  $2.3 \times 10^{13}$  GC/mL (Addgene Cat # 28304, Watertown, MA, USA) en el hipotálamo de ratón. Brevemente, los ratones POMC-CRE de 12 a 16 semanas de edad se anestesiaron con un flujo constante de isoflurano (1

mg/ml) mediante un vaporizador veterinario (Matrx VIP 300, Midmark, OH, USA) y se fijaron en un aparato estereotáxico (modelo KOPF Cat # 940, Tujunga, CA, USA) con barras en las orejas. Después de exponer el cráneo a través de una pequeña incisión, se perforaron dos pequeños orificios para la inyección según las coordenadas de bregma; anterior-posterior (AP): -1,70 mm, dorsal-ventral : -5,80 mm, izquierda-derecha (LR):  $\pm$  0,30 mm). Se insertó una fina pipeta de vidrio en el cerebro y se inyectó el AAV (80 nL por ARC) mediante un sistema de aire presurizado. Para el cuidado post-operatorio, se inyectó a los ratones meloxicam (0,5 mg/kg) por vía intraperitoneal durante dos días continuos. Todos los animales que tuvieron problemas de salud o infecciones subsecuentes producto de la inyección fueron descartados. Para los estudios electrofisiológicos la marca fluorescente fue verificada bajo microscopía. Se permitió que los animales se recuperaran de la cirugía durante 1 semana y su peso corporal y condiciones de salud se controlaron durante la recuperación.



### **3. Preparación de rebanadas de cerebro para electrofisiología.**

Los experimentos se realizaron en rebanadas coronales de hipotálamo obtenidas de ratones POMC-CRE inyectados previamente utilizando métodos previamente descritos (Smith et al. 2015). Los animales se anestesiaron por inhalación de isoflurano y se decapitaron, donde rápidamente el cerebro se dejó en una placa metálica sumergida en líquido cefalorraquídeo artificial (LCRa). En todos los experimentos, se utilizó LCRa con la siguiente composición (en mM): 125 NaCl, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 3 mioinositol, 0.3 ácido ascórbico, 2 Na-piruvato y 1 D-glucosa, oxigenada continuamente (95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>) para dar un pH de ~7.4 y una osmolaridad de ~305 mosM. La osmolaridad de las soluciones fue controlada mediante la adición de sacarosa según los sustratos utilizados. Se

obtuvieron cortes coronales de 250  $\mu\text{m}$  de espesor utilizando un vibrátomo Leica (VT 1200S; Leica Biosystems, Buffalo Grove, IL, USA) que contenían el ARC. Luego, las rebanadas de cerebro se transfirieron a una cámara de incubación con LCRA y se dejaron recuperar a 35°C durante 30 minutos y luego a temperatura ambiente hasta su uso.

### **3.1. Registros electrofisiológicos, adquisición de datos y análisis.**

Las rebanadas de hipotálamo se colocaron en una cámara de registro sumergida en LCRA, montada en el soporte de un microscopio vertical (BX51W1 DIC, Olympus, Center Valley, PA, USA) equipado con óptica de contraste de interferencia infrarroja diferencial (IR-DIC) y perfundido con solución de LCRA a una velocidad de 2 ml/min a temperatura ambiente, continuamente oxigenada (95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>). Los registros se realizaron utilizando un amplificador EPC10 dual en modo de *Current Clamp* (HEKA, Union City, NY, USA). Las pipetas de los electrodos de registro se fabricaron a partir de tubos de vidrio de borosilicato (Sutter Instruments, Novato, CA) con un extractor Flaming-Brown (Sutter Instruments, Novato, CA) y se llenaron con una solución interna que contenía (en mM): 120 K-gluconato, 10 Na-Gluconato, 4 NaCl, 10 HEPES-K, 10 Na-fosfocreatina, 2 Na-ATP, 4 Mg-ATP y 0.3 GTP ajustado a pH 7.3 con KOH. La solución interna fue ajustada a pH 7.3 con CsOH y la osmolaridad se ajustó a ~305 mosM. La resistencia del electrodo varió entre 6 y 8M $\Omega$ . Los cortes se observaron con un objetivo de inmersión en agua 40X y se visualizaron usando una cámara CoolSNAP EZ (CoolSNAP-EZ, Photometrics, Tucson, AZ, USA). La identificación fluorescente de las neuronas POMC se detectó utilizando iluminación de epifluorescencia equipada con láser 488. Todos los experimentos fueron realizados a temperatura ambiente. El análisis de datos se realizó utilizando el software Igor-Pro (Wavemetrics, Wosego, OR, USA). Todos los valores informados corresponden a resultados de al menos tres

experimentos y las barras de error indican el SD. Las diferencias estadísticas se evaluaron mediante la prueba Mann-Whitney.

### **3.2 Agentes farmacológicos.**

Se aplicaron los siguientes componentes y fármacos en el baño: D - (+) - Glucosa  $\geq 99.5\%$  G8270, L-lactato de sodio  $\sim 98\%$  L7022, D-lactato de sodio  $\geq 99.0\%$  71716, Piruvato de sodio  $\geq 99\%$  ReagentPlus®, P2256, ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico  $\geq 98\%$  (C2020), 3-chloro-5-hydroxybenzoic acid  $\geq 97\%$  (HPLC) (516560) (Sigma, St. Louis, MO, USA), *Pertussis Toxin*, CAS 70323-44-3 (Millipore-Sigma), CNQX (Cat. No. 0190), D-AP5 (Cat. No. 0106) LY 367385 (Cat. No. 1237) (Tocris Bioscience, Northeast, MN, USA). La velocidad de perfusión permitió el intercambio completo de la solución en 2 min. Los antagonistas fueron perfundidos previamente durante 10 minutos antes de que se llevaran a cabo los experimentos.

## **4. Inmunohistoquímica.**

### **4.1 Procesamiento histológico para inmunohistoquímica.**

Los ratones C57BL/6J y POMC-EGFP de 8-10 semanas de edad se anestesiaron por inhalación de isoflurano de forma continua y se procedió a abrir la caja torácica e instalar una cánula en el ventrículo izquierdo. Posteriormente, los animales fueron perfundidos con 25 mL de suero fisiológico durante 10 min y luego con 40 mL de PFA 4% p/v por 10 min. Los cerebros y cerebelos fueron extraídos y post-fijados por inmersión durante 24 h a 4°C en PFA 4% p/v para su procesamiento.

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

Se utilizaron cortes de 50  $\mu\text{m}$  obtenidos por vibrátomo Leica (VT 1200S; Biosystems, Buffalo Grove, IL, USA) de hipotálamo, corteza, hipocampo y cerebelo de ratón C57/BL/6J y POMC-EGFP. Los cortes fueron lavados tres veces en solución tampón Tris-fosfato 10 mM (pH 7,8) por 10 min. La mezcla de anticuerpos preparada en Tris-BSA 1%, Tritón X-100 0,2% v/v se incubó por 16 h y a 4° C en las diluciones correspondientes (**Tabla 1**). Posterior a la incubación con el primer anticuerpo, las muestras se lavaron 5 veces por 5 min en tampón Tris-fosfato 10 mM (pH 7,8) e incubadas durante 2 h con los s anticuerpos secundarios unidos a fluoróforos (**Tabla 2**), diluidos en Tris-BSA 1%, Tritón X-100 0,2% v/v. Como tinción nuclear se utilizó Hoechst o TOPRO-3 dependiendo de las propiedades espectrales de los fluoróforos empleados (Invitrogen Rockville, MD, USA), que fue incubado junto con los anticuerpos secundarios. La incubación se realizó en una cámara húmeda a temperatura ambiente y en oscuridad. Luego, las muestras fueron lavadas 5 veces por 5 min en tampón Tris-fosfato 10 mM (pH 7,8) y montadas con medio de montaje para fluorescencia (Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA).

#### **4.3. Microscopía confocal y procesamiento de imágenes.**

Las imágenes de hipotálamo, corteza, hipocampo y cerebelo fueron obtenidas en un microscopio confocal espectral LSM780 NLO (Zeiss) equipado con líneas laser de 405, 458, 488, 514, 561 and 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 pixeles. Para el análisis de la proteína fluorescente verde (GFP) en rebanadas de hipotálamo, estructuras que presentan cierto volumen, las imágenes fueron adquiridas además en distintos planos z, los que apilados en

un z-stack son superpuestos para generar una imagen que corresponde a una proyección de máxima intensidad (MIP) utilizando el software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

## **5. Inmunodetección de proteínas.**

### **5.1. Obtención de extractos de proteínas totales.**

Se obtuvieron extractos de proteínas totales de cerebelo, hipocampo, corteza e hipotálamo basal de ratones, y homogeneizando con una solución con la siguiente composición (sacarosa 0,3 mM, DTT 3 mM, EDTA 1 mM, 100 mg / ml de PMSF, 2 mg / ml de pepstatina A, 2 mg/ml de leuceptina y 2 mg / ml de aprotinina). Posteriormente, las muestras se sonicaron en hielo a 300 W (Sonics & Material INC., VCF1, Newtown, CT, USA) 3 veces durante 10 s. Después de la centrifugación a 8000 g durante 10 min, las muestras se almacenaron a -80°C

### **5.2 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%,  $\beta$ -mercaptoetanol al 5% y azul de bromofenol al 0.02% y fueron calentadas a 55°C por 30 segundos. Para resolver las proteínas de interés, se utilizaron geles de 12 % v/v de acrilamida/bisacrilamida. El gel separador fue preparado utilizando dos mezclas, una que contenía acrilamida-bisacrilamida 5% p/v y otra 15% p/v, además de SDS 0,4% p/v, TEMED 0,1% v/v y persulfato de amonio 0,02 % p/v, preparados ambos en tampón Tris- HCl 750 mM (pH 8,8). El gel espaciador fue preparado utilizando una mezcla acrilamida/bisacrilamida 5% p/v, SDS 0,5% p/v, TEMED 0,1% v/v y persulfato de amonio

0,02% p/v, preparado en tampón Tris-HCl 60 mM (pH 6,8). Como tampón de corrida se utilizó un tampón Tris-glicina (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1% p/v, pH 6,8). Se sembraron 50 µg de extractos de proteínas diluidas en tampón de carga 5X (Tris-HCl 250 mM, pH 6,8, SDS 4% p/v, glicerol 20% v/v, β-mercaptoetanol 1,25 M, azul de bromofenol 0,04% p/v). Se aplicó un voltaje de 100V al gel montado en la cámara de electroforesis por 2-3 h aproximadamente. Las proteínas del gel resultante fueron transferidas a membranas de fluoruro de polivinilideno Immobilon-P®. Para esto, el gel fue puesto en contacto con la membrana en una cámara de electrotransferencia en presencia de tampón Tris-HCl 25 mM (pH 8,8), glicina 192 mM y metanol 20% v/v. La electrotransferencia fue realizada a 80 mA durante 14-16 h a temperatura ambiente.

### **5.3. Inmunodetección de las proteínas.**

Una vez realizada la transferencia se tiñó la membrana con una solución de rojo Ponceau-S 0,2 % p/v para confirmar la correcta transferencia de las proteínas a la membrana. Posteriormente, la membrana fue lavada repetidas veces con tampón TBS-T (NaCl 150 mM, Tris 10 mM, pH 7,4, Tween-20 0,05 % v/v) por 2 h y bloqueada con leche descremada 5% p/v en tampón TBS-T por 2 h. Luego, las membranas fueron incubadas con los anticuerpos primarios: anti-HCA1 (1:1000) y anti-β-actina (1:10000) diluido en TBS-T-leche por 16 h a 4°C. Posteriormente, la membrana fue lavada con TBS-T, bloqueada con TBS-T-leche e incubada, en oscuridad, por 2 h con un segundo anticuerpo anti-conejo o anti-ratón IgG (1:5000; Jackson ImmunoResearch Labs Cat# 711-035-152) conjugado con peroxidasa (HRP), diluido en TBS-T-leche. Finalmente, la membrana se lavó con TBS-T e incubó por 5 min con el reactivo quimioluminiscente Western Lightning Plus-ECL (PerkinElmer Inc, Massachusetts, USA). El sistema de quimioluminiscencia consistía en dos reactivos: perhidrol

y luminol que se mezclan en partes iguales. 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  $\beta$ -actina para todos los extractos.

## **6. Extracción de ARN.**

El ARN de cerebelo, hipocampo, corteza e hipotálamo de ratón se obtuvieron mediante el método de extracción tiocianato de guanidina fenol/ cloroformo, homogenizando las muestras en 500 $\mu$ L de Trizol® (Invitrogen), según instrucciones del fabricante. Luego se les adicionó 200  $\mu$ L de cloroformo, se agitó fuertemente y se centrifugó a 12000g por 15 min a 4°C. A la fase acuosa que contiene el ARN, se le agregó 500  $\mu$ L de isopropanol, y se incubaron por 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 12000 g por 10 min a 4°C. El pellet de ARN se lavó dos veces con 500  $\mu$ L de etanol 70% con una posterior centrifugación de 12000g por 10 min a 4°C. Luego el ARN se secó por 10 min a temperatura ambiente. Finalmente, el ARN total se resuspendió en 20  $\mu$ L de agua libre de ARNasas y se procedió a cuantificar y evaluar la pureza de las preparaciones mediante la lectura de la absorbancia a 260 y 280 nm.

## **7. Transcripción reversa del ARN (RT), síntesis de ADNc.**

La síntesis de ADNc se realizó en un termociclador Mastercycler Gradient Eppendorff. Previo al proceso de transcripción reversa, 2 $\mu$ g de ARN total fueron tratados con ADNasa (Fermentas International, Burlington, Ontario, Canada) por 30 min a 37°C para eliminar contaminación con ADN. El ARN se incubó con 0.5 $\mu$ g de oligo dT a 70°C por 5 min.

Inmediatamente después de este paso, la muestra se puso en hielo por 2 min. Posteriormente, se agregó el mix de transcripción que contiene 10mM Tris pH 8.3, 50mM KCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 40U/mL de inhibidor de ribonucleasas y dNTP 10mM y se incubó a 37°C por 5 minutos. Luego, a esta mezcla se le adicionó 10 unidades de la enzima transcriptasa reversa (RevertAid™ H minus M-MULV RT), luego se incubó por 1 h a 42°C, seguido por 10 min a 70°C para detener la reacción. Se realizaron reacciones paralelas en ausencia de la enzima transcriptasa reversa, como control para la presencia de ADN contaminante.

#### **8. PCR en tiempo real (qRT-PCR).**

Este ensayo fue realizado en muestras de cerebelo, hipocampo, corteza e hipotálamo de ratón. 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, 10 µl de master mix y los siguientes sets de partidores (500 nM): HCA1, sentido; 5'-ATC CTG GTC TTC GTG CTT GG-3' y antisentido 5'-CTG TCC GAA GGG GTA AGC AG-3' y ciclofilina, sentido 5'-ATA ATG GCA CTG GTG GCA AGT C 3' y antisentido 5'-ATT CCT GGA CCC AAA ACG CTC C-3'. Las muestras se denaturaron inicialmente a 95°C por 10 min y luego se realizaron 40 ciclos de 95°C por 15s, 60°C 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 (Ct), en relación al número de ciclos requeridos para amplificar un gen de referencia sobre su umbral (Ct) en relación con el gen de referencia ciclofilina, aplicando el método  $\Delta\Delta Ct$ . Los análisis

estadísticos fueron realizados utilizando el programa GraphPad Prism 8.0 (San Diego, CA, USA).

### **9. Aislamiento y purificación de neuronas POMC-EGFP del hipotálamo usando clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS).**

Los ratones control alimentados ad libitum y POMC-EGFP de 5 meses de edad se sacrificaron mediante dislocación cervical. El tejido de la región del hipotálamo medio basal se microdisecionó sobre una superficie fría y el tejido se mantuvo en HBSS frío. A continuación, el tejido se digirió con una mezcla de enzima papaína / tripsina (50U/ml / 0,12%, Sigma, EE. UU) durante 10 min a 37°C (incubadora con 5% CO<sub>2</sub>), seguido de disgregación mecánica con una punta de plástico p1000. Posteriormente, la suspensión celular se incubó durante 5 min a 37 °C y se disgregó mecánicamente utilizando una punta de plástico p200. Posteriormente, la suspensión de células se pasó a través de un filtro de 70 µm y se centrifugó a 300 g durante 5 min a 4°C. A continuación, las células se resuspendieron en HBSS (suplementado con BSA al 0,5%) para continuar con el FACS. El FACS se realizó utilizando un clasificador de células de entrada (FACS Aria-III, BD Biosciences, San José, CA, EE. UU), y la señal de GFP se visualizó utilizando el detector FITC. La clasificación de células se estableció de acuerdo con el tamaño (FSC) frente a la granularidad de la célula (SSC). Los eventos positivos se consideraron a partir de una intensidad de FITC superior a 10<sup>3</sup> (según el control WT) y la clasificación celular se realizó en modo de pureza en un tubo Eppendorf que contenía tampón de lisis del Kit micro RNeasy (Qiagen, Hilden, Alemania).

## 10. RT-PCR de las muestras obtenidas por FACS.

Para el PCR convencional, la extracción de ARN total y la síntesis de ADNc se realizaron utilizando el kit de síntesis de ADNc iScript™ (BioRad, Hercules, CA, EE. UU.). Se realizaron reacciones paralelas en ausencia de transcriptasa inversa para controlar la presencia de ADN contaminante. Para la amplificación, se adicionó una alícuota de ADNc en un volumen de 12,5 µL que contiene: 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 1,6 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mM dNTP, 0,04 unidades de ADN polimerasa Taq (Gibco-BRL, Carlsbad, CA, EE. UU.), y se incubaron 0,4 mM de cebadores a 95 ° C durante 4 min, seguido de 40 ciclos a 95 ° C durante 15 s, 55 ° C durante 30 s y 72 ° C durante 5 min y una extensión final de 7 min a 72 ° C. Los productos de PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,2% y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio 50. Se utilizaron los siguientes conjuntos de cebadores para el análisis de RT-PCR (500 nM cada uno): POMC sentido 5' TGA ACA GCC CCT GAC TGA AAA C 3' y antisentido 5' AGG ACC TGC TCC AAG CCT AAT G 3', AgRP sentido 5' GCA GAC CGA GCA GAA GAT GTT C 3' y antisentido 5' GTA GCA CGT CTT GAA GAA GCG G 3'; GFAP sentido 5' CTC AAT GCT GGC TTC AAG GAG A 3' y antisentido 5' GAC GCA GCG TCT GTG AGG TC 3' y 18S sentido de ARN ribosómico 5' GCC CGA AGC GTT TAC TTT GA y antisentido 5' TTG CGC CGG TCC AAG AAT TT 3'.

**Tabla 1: Anticuerpos primarios utilizados**

Anticuerpo	Especie	Dilución	Empresa
Anti-HCA1	Conejo	1:100	Sigma-Aldrich
Anti-Vimentina	Pollo	1.400	Millipore
Anti-GFAP	Ratón	1:500	Millipore
Anti-HUC	Ratón	1:200	Thermo Fisher Scientific

**Tabla 2: 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-chicken-cy3	Burro	1:200	Jackson immunoResearch
Anti-ratón-Alexa-549	Burro	1:200	Jackson immunoResearch

### III RESULTADOS.

#### **Objetivo 1: Determinar la distribución celular de HCAR1 en el hipotálamo.**

##### **1.1 Expresión del receptor de ácido hidroxicarboxílico-1 (HCAR1) en el cerebro.**

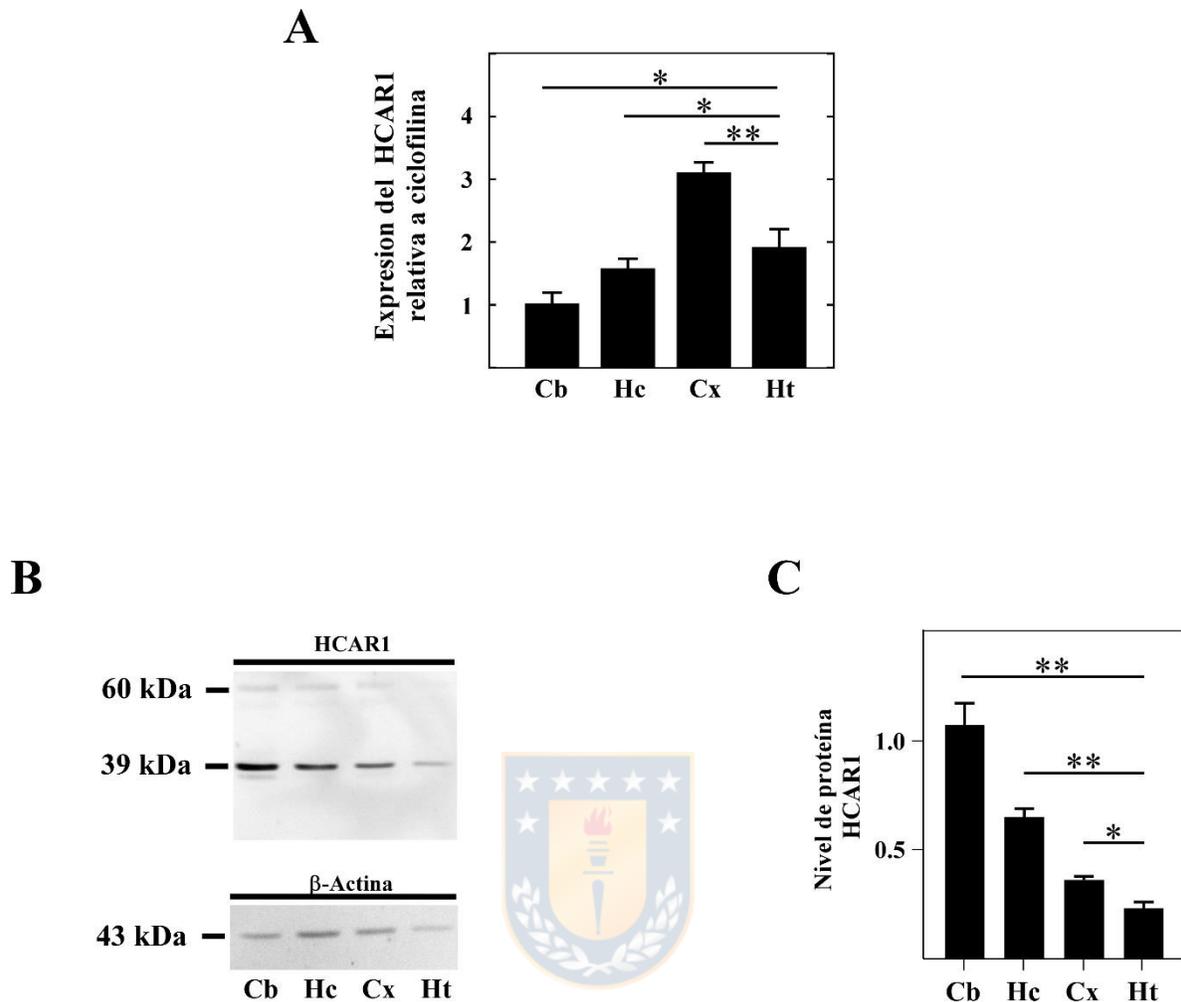
La expresión y funcionalidad de HCAR1 en el cerebro ha sido reportada por diferentes autores, donde se ha demostrado que HCAR1 está localizado en corteza cerebral, cerebelo e hipocampo (Castillo et al. 2015; de Castro Abrantes et al. 2019; Lambertus et al. 2021; Lauritzen et al. 2014). Recientemente, se ha demostrado su localización en la parte dorsal del tercer ventrículo, donde se describe específicamente en células del plexo coroideo (Hadzic et al. 2020). Sin embargo, no hay documentación acerca de la localización de HCAR1 en el ARC. Para abordar esta interrogante, se analizó la expresión de HCAR1 mediante qRT-PCR en muestras de hipotálamo. Muestras de cerebelo, hipocampo y corteza fueron utilizadas como tejidos controles. Las muestras de hipotálamo (n=3) mostraron una expresión significativamente mayor que las obtenidas desde cerebelo y fue similar a las obtenidas desde el hipocampo, pero significativamente menor que las de corteza cerebral (**Fig. 4A**). Posteriormente, extractos de proteína total de las mismas áreas cerebrales, mostraron una banda de 39 kDa, que corresponde a la masa molecular de HCAR1 (**Fig. 4B**) (Bozzo et al. 2013); además, se detectó una banda de 60 kDa descrita previamente como una forma glicosilada de HCAR1 (Lauritzen et al. 2014). A diferencia de los resultados obtenidos por qRT-PCR, la cuantificación de las bandas en relación con la  $\beta$ -actina evidenció que el hipotálamo presenta una menor inmunodetección que las otras áreas del cerebro evaluadas (**Fig. 4C**).

## 1.2 Localización de HCAR1 en el hipotálamo.

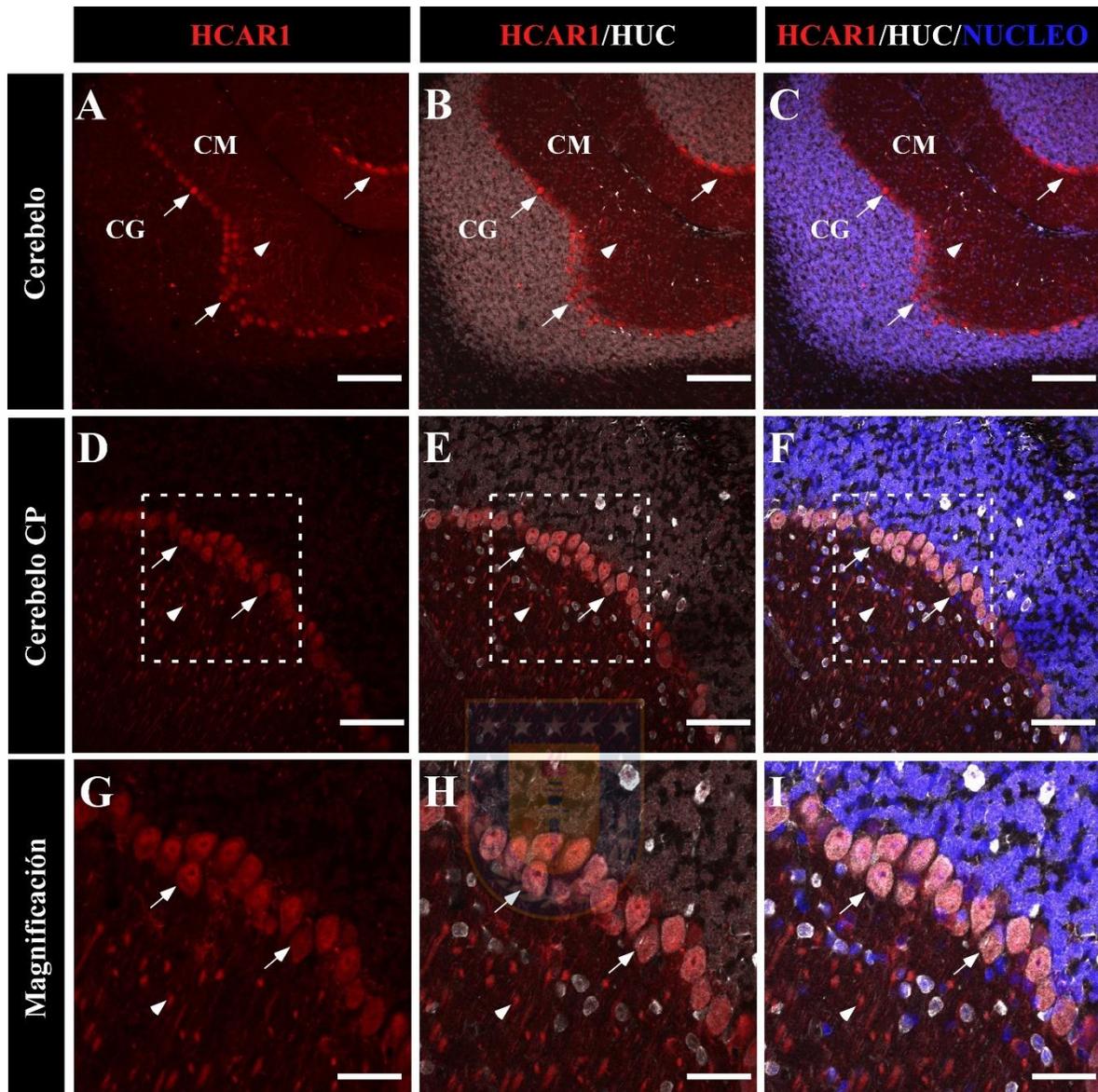
Para precisar el tipo celular donde esta expresado HCAR1, decidimos evaluar la localización de HCAR1 en secciones frontales de hipotálamo de ratones C57BL/6J, mediante inmunohistoquímica. Para corroborar la localización de HCAR1 previamente informada (Castillo et al. 2015; Lauritzen et al. 2014), analizamos la expresión de HCAR1 en rebanadas de cerebelo, hipocampo y corteza. En rebanadas de cerebelo, la localización de HCAR1 se detectó principalmente en las neuronas de Purkinje y una baja inmunoreactividad en neuronas granulosas de la capa celular (**Fig. 5A-C**). Mediante una magnificación de las rebanadas de cerebelo, se observó reactividad en el soma de las neuronas de Purkinje (**Fig. 5A-C**, flechas) y además en los procesos de estas neuronas en la capa molecular (**Fig. 5A-C**, cabezas de flechas), confirmado la expresión previamente documentada (**Fig. 5D-I**, flechas) (Lauritzen et al. 2014). En el hipocampo, HCAR1 fue detectado en las neuronas de la región CA1 (**Fig. 6A-C**, flechas) y además en células con características morfológicas de astrocitos (**Fig. 6A, a1**, cabezas de flechas). Utilizando el marcador de astrocitos GFAP, se detectó una alta co-localización entre HCAR1 y GFAP (**Fig. 6B, b1**, cabezas de flechas). Finalmente, se analizó la expresión de HCAR1 en cortes frontales de corteza, donde se evidenció inmunomarcaje sólo en las neuronas (**Fig. 6D-F**), similar a lo previamente reportado (Castillo et al. 2015). Para analizar si HCAR1 está localizado en tanicitos hipotalámicos, se realizó inmunohistoquímica en cortes frontales de la región basal del hipotálamo donde se localizan los tanicitos y se utilizó vimentina para reconocerlos. Las imágenes mostraron una baja inmunoreactividad de HCAR1 en esta región del hipotálamo (**Fig. 7**). De manera interesante, se observó co-distribución de HCAR1 en células cuya morfología es de tipo astrocito (**Fig. 7a1-b1**, flechas), muy similar a lo observado en el hipocampo. La mayor intensidad asociada a HCAR1 se detectó en la región palisádica lateral de la ME, zona que está densamente

poblada de elementos celulares filamentosos como astrocitos y pies terminales de tanicitos. (Fig. 7a2, b2, flechas). Sólo en esta última región se detectó co-inmunoreactividad de HCAR1 con vimentina indicando que algunos procesos de los tanicitos expresan este receptor, presumiblemente tanicitos  $\beta$ 1-dorsales. Sin embargo, la mayoría de las células de esta zona fueron negativas para vimentina, sugiriendo reacción asociada a los astrocitos que contactan la superficie pial de la ME (Fig. 7a2-b2, flechas).

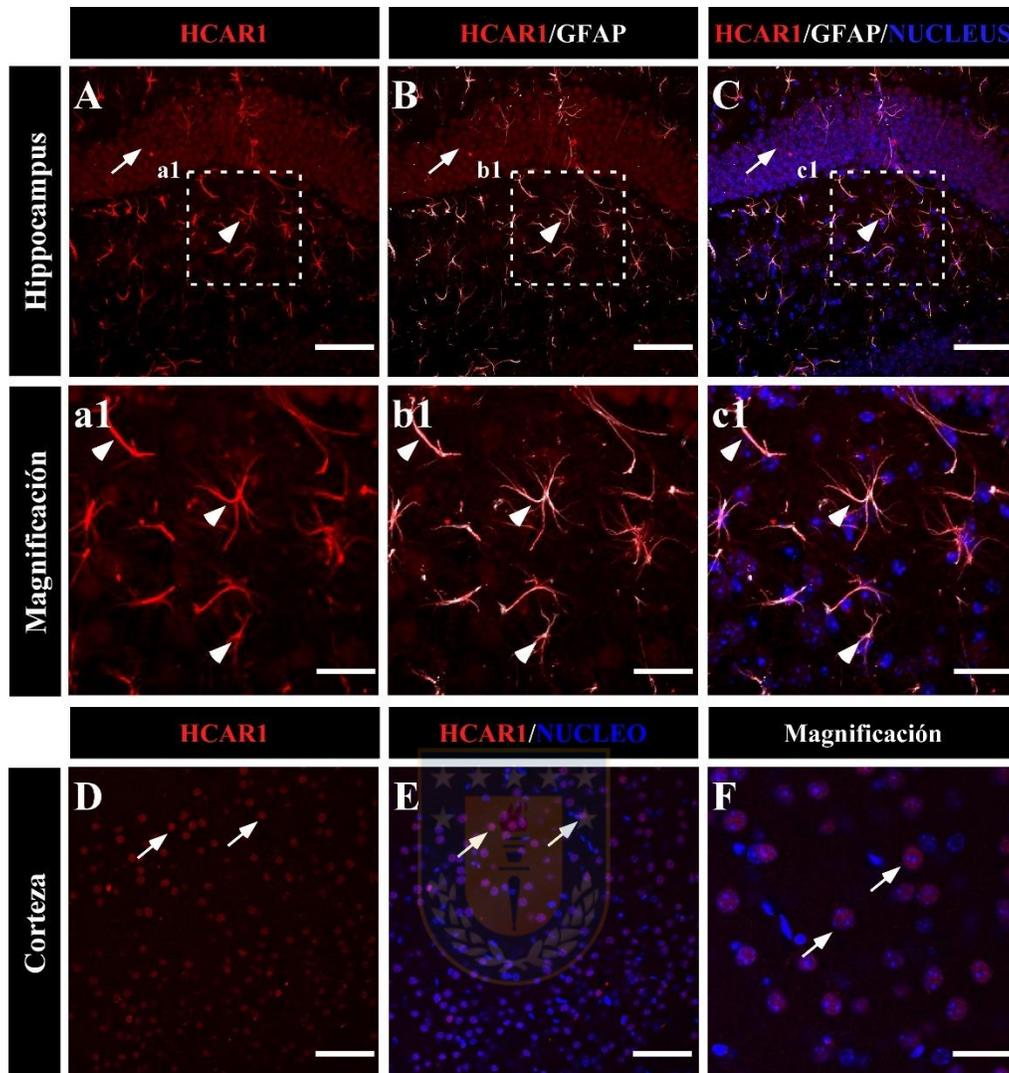




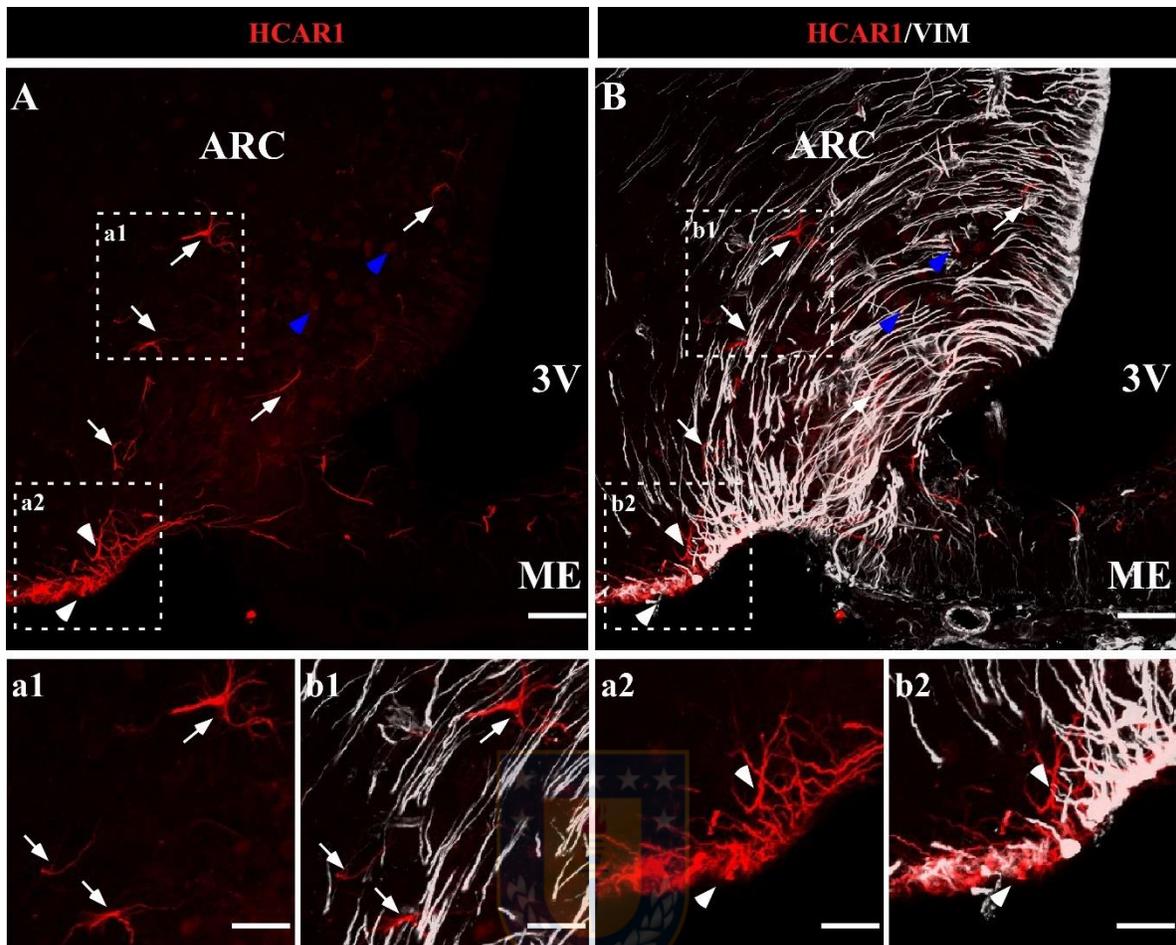
**Figura 4. Perfil de expresión de HCARI en hipotálamo.** **A.** Análisis de qRT-PCR para el receptor HCA1 en cerebelo (Cb), hipocampo, corteza (Cx) e hipotálamo (Ht) de ratón. **B.** Western blot para HCARI y  $\beta$ -actina. Carril 1-4: Extractos totales de proteínas luego de Cb, Hc, Cx y Ht de ratón. **C.** Análisis semi-cuantitativo de la intensidad de las bandas de HCARI (39 kDa) y  $\beta$ -actina (43 kDa) (C). Cada valor se normalizó a la expresión de  $\beta$ -actina en cada tejido. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .  $n = 3$ .



**Figura 5. HCAR1 está expresado en cerebelo.** A-C. Secciones frontales de cerebelo de ratón C57BL/6J usando los anticuerpos anti-HCAR1 (rojo) y anti-HUC (blanco). El receptor HCA1 fue observado en células de Purkinge (flechas) y en sus procesos (cabezas de flechas). D-I. Magnificación de las células de Purkinge. CM: capa molecular, CG: capa granular, CP; capa de células de Purkinge. Barra de escala A-C: 150  $\mu$ m, D-F: 100  $\mu$ m, (G-H) 20  $\mu$ m.



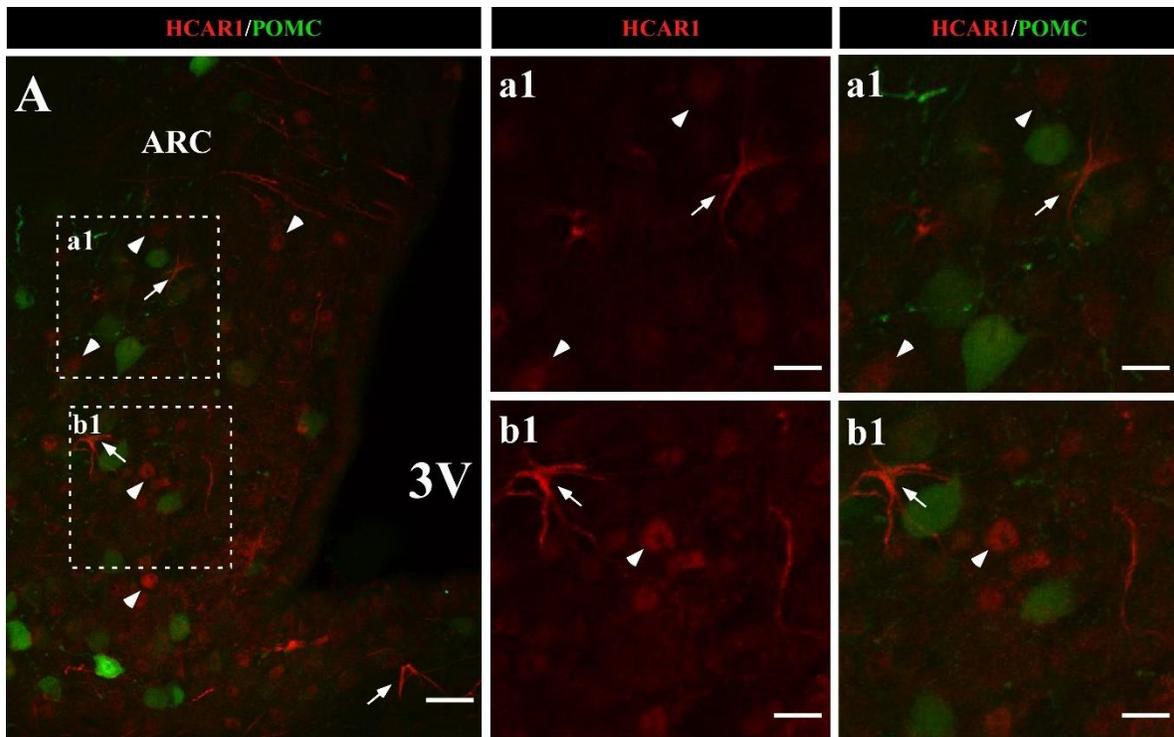
**Figura 6. HCAR1 está expresado corteza e hipocampo. A-F.** Secciones frontales de hipocampo y corteza de ratón C57BL/6J usando los anticuerpos anti-HCAR1 (rojo), anti-GFAP (blanco) y el marcador nuclear TOPRO-3 (azul) **A-C**. El receptor fue detectado en la capa de neuronas piramidales CA1 en hipocampo (flecha) y en astrocitos. **a1-c1**. Mayor aumento mostrando la colocalización con el marcador de astrocitos, GFAP (cabezas de flechas). **D-F**. Secciones frontales de corteza cerebral, donde la expresión de HCAR1 se detecta en células tipo neuronas. Barra: 150  $\mu\text{m}$ . Barra magnificación: a1-c1: 75  $\mu\text{m}$ , F: 50  $\mu\text{m}$ .



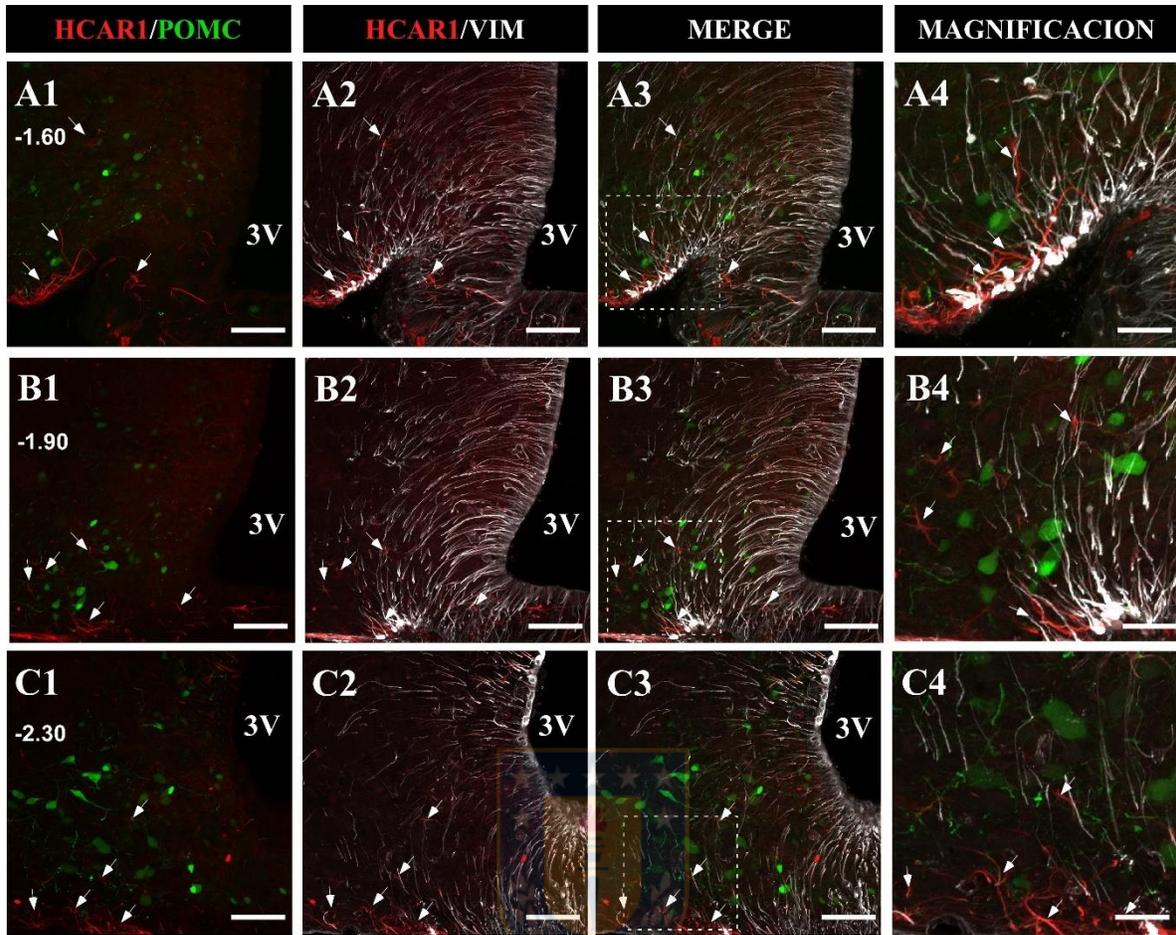
**Figura 7. HCAR1 está expresado en células del ARC. A-B.** Secciones frontales de hipotálamo de ratón C57BL/6J usando los anticuerpos anti-HCAR1 (rojo) y anti-vimentina (blanco). **A-B.** Se observó un débil inmunomarcaje de HCAR1 en células tipo neuronas (cabeza de flecha azul) y en células similares a astrocitos, negativas para vimentina (magnificación **a1-b1**, flechas). **a2-b2.** Alta magnificación de la región palisádica lateral de la ME donde se observa un alto inmunomarcaje para HCAR1, que co-localiza parcialmente con vimentina. 3V: tercer ventrículo. ARC: núcleo arqueado. Barra A-B: 100  $\mu$ m. Barra magnificación: a1-c1: 25  $\mu$ m.

### **1.3 En neuronas POMC no se detecta HCAR1 por inmunohistoquímica.**

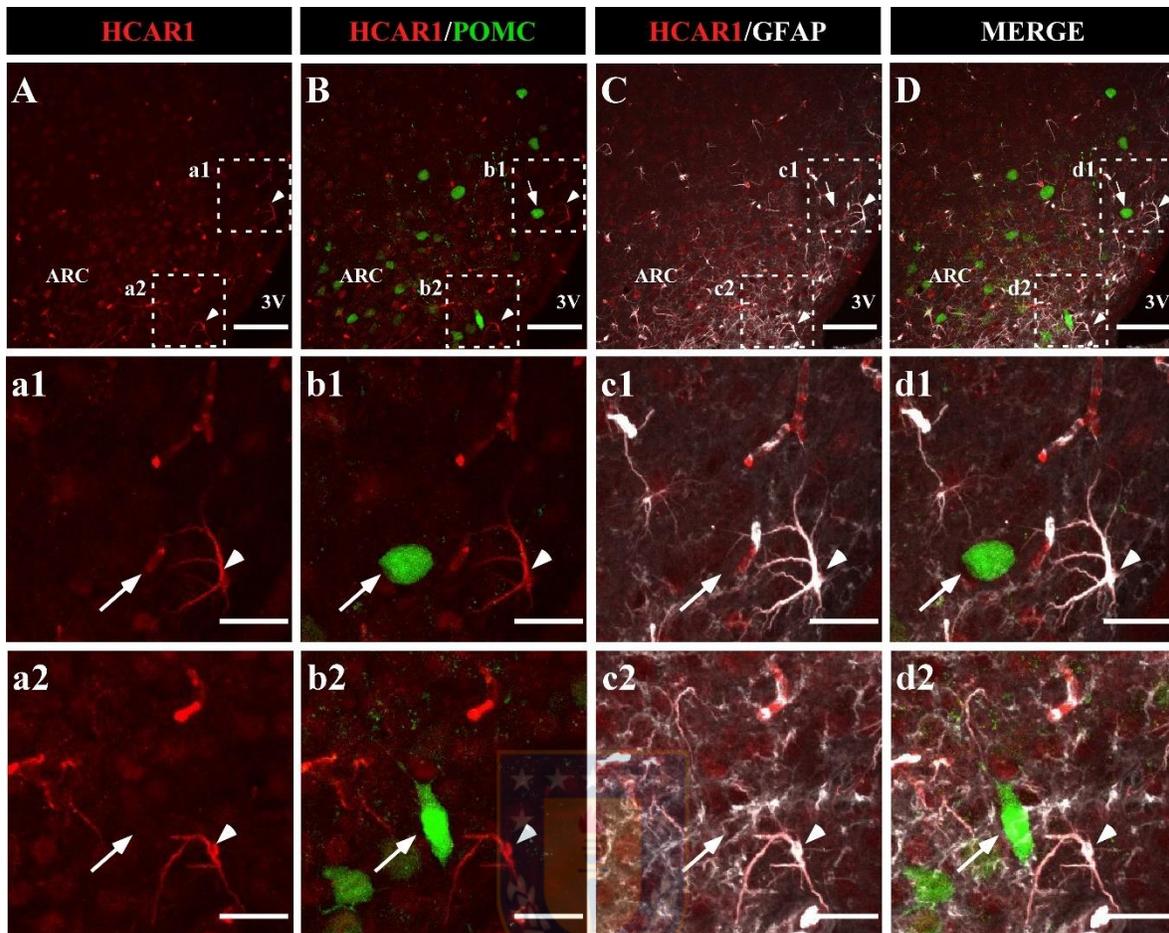
Para determinar si HCAR1 está expresado en las neuronas POMC, en una primera etapa utilizamos inmunodetección de HCAR1 en modelos de ratón POMC-EGFP. Nuestros resultados muestran ausencia de inmunoreactividad para HCAR1 en las neuronas POMC (**Fig. 8a1, a2, b1, b2**; cabezas de flechas). Posteriormente, en los mismos modelos animales, se realizaron inmunohistoquímicas para HCAR1 y vimentina en un seriado a diferentes bregmas donde residen las neuronas POMC (bregma -1.60, -1.90, -2.30). De manera interesante, en los bregma -1.60 y -1.90, se logra visualizar inmunoreactividad en elementos astrogiales del hipotálamo (**Fig. 9**, magnificación, flechas) y en la ME distal. Para confirmar la reacción en astrocitos se utilizó GFAP, demostrando que existe una marcada inmunoreactividad en astrocitos del ARC (**Fig. 10A; a1, a2, b1, b2**; cabezas de flechas). Además, observamos marcaje en estructuras de tipo vasos sanguíneos, donde se observa co-distribución de HCAR1 y GFAP, lo que sugiere que se trata de pies terminales de los astrocitos (**Fig. 10C, c2-d2**, cabezas de flechas). De manera interesante, la marca de HCAR1 se co-distribuye con el de GFAP en astrocitos próximos a las neuronas POMC.



**Figura 8. Distribución de HCARI en el hipotálamo del ratón POMC-EGFP. A.** Secciones frontales de hipotálamo de ratón POMC-EGFP usando el anticuerpo anti-HCARI (rojo). **A.** Se observó una localización del receptor HCARI en células del ARC (magnificación **a1-b1,a2-b2**, cabezas de flechas) y en células de morfología astroglial (magnificación **a1-b1,a2-b2** flechas) del ARC. 3V: tercer ventrículo.ARC: núcleo arqueado. Barra A-B: 100  $\mu$ m. Barra magnificación: a1-c1: 25  $\mu$ m.



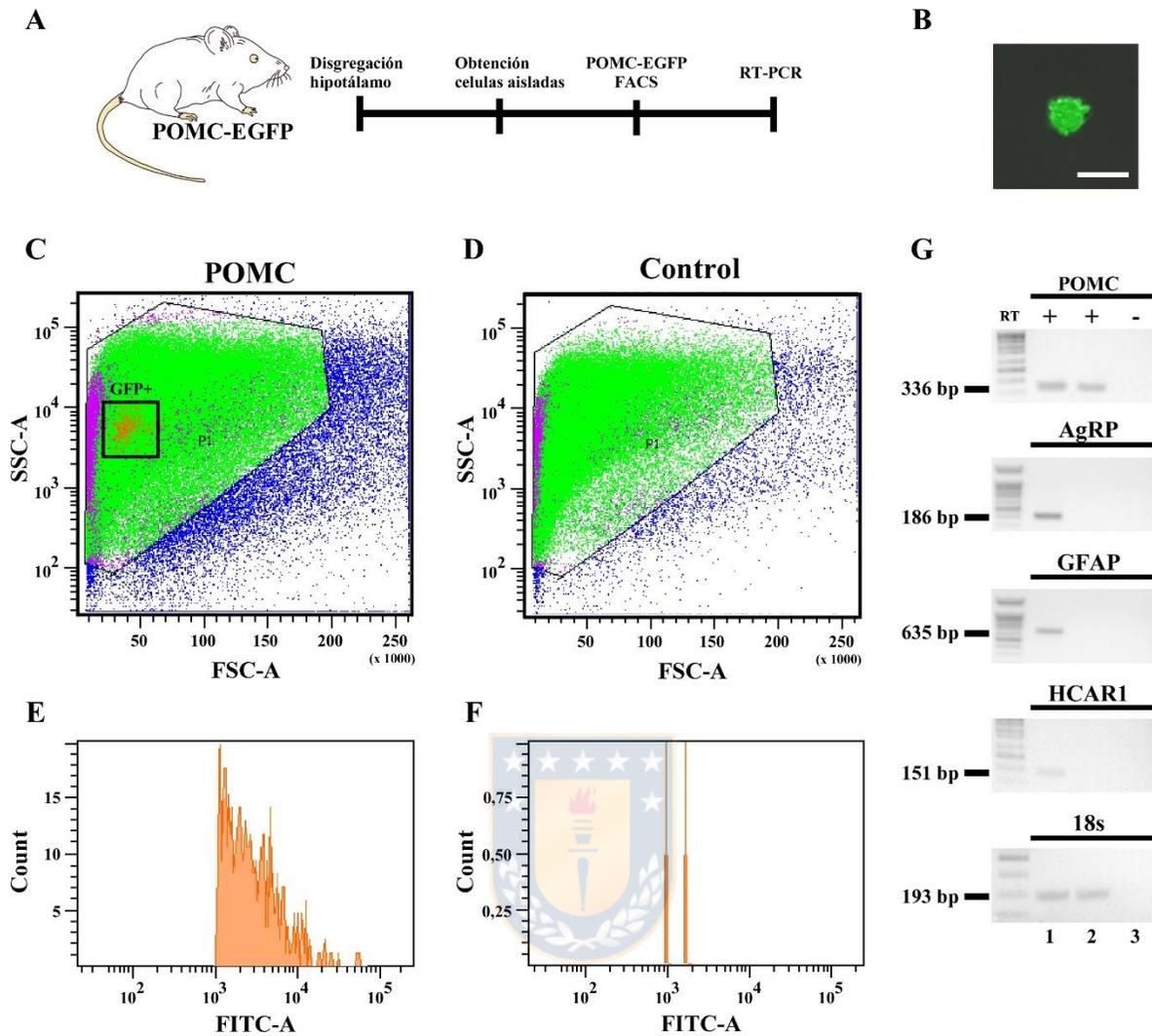
**Figura 9. HCARI no está localizado en neuronas POMC.** Se utilizaron diferentes regiones en el eje anteroposterior de la región del ARC de ratones POMC-EGFP para realizar inmunodetección con los anticuerpos anti-HCAR1 (rojo) y anti-vimentina (blanco). **A1-C4.** Se observó un débil inmunomarcaje del HCARI en células con morfología astroglial (flechas) y ausencia de reacción en las neuronas EGFP positivas. 3V: tercer ventrículo. ARC: núcleo arqueado. Barra A1-C3: 100  $\mu$ m. Barra magnificación: A4, B4, C4: 30  $\mu$ m.



**Figura 10. HCARI está localizado en astrocitos del ARC. A-D.** Cortes frontales de cerebro de ratón POMC-EGFP marcados con los anticuerpos anti-HCARI (rojo) y anti-GFAP (blanco). **A.** En baja magnificación observamos la distribución general de HCARI en el hipotálamo. **B.** Ausencia de marcaje de HCARI en neuronas POMC. **C-D.** Localizamos la marca de HCARI en los astrocitos cercanos al 3V (co-localizando con GFAP) (cabezas de flechas). **a1-d2.** Imágenes a mayor aumento, en ellas confirmamos que HCARI está localizado en los astrocitos, y la ausencia de inmunomarcaje en neuronas POMC. ARC: núcleo arqueado, 3V: tercer ventrículo. Barras **A-D**: 150  $\mu\text{m}$  y **a1-d2**: 50  $\mu\text{m}$ .

#### **1.4 Las neuronas POMC aisladas de ratones POMC-EGFP no expresan el ARNm de HCAR1.**

Para confirmar la ausencia de HCAR1 a nivel de ARNm en las neuronas POMC, se aislaron neuronas POMC de ratones POMC-EGFP mediante FACS (**Fig. 11,A-B**). Los perfiles de clasificación jerárquica se muestran en la Fig. 11C-D, y la configuración de la intensidad de fluorescencia de los eventos clasificados se muestra en la Fig. 11 E-F, lo que indica un alto enriquecimiento de células positivas para EGFP en las neuronas purificadas. Es de destacar que las células positivas para EGFP constituyen una población morfológica homogénea en términos de tamaño y complejidad celulares como se muestra en la Fig. 11C. Aislamos 497 eventos positivos para GFP de cuatro ratones POMC-EGFP. Posteriormente, las muestras se sometieron a análisis de PCR. De acuerdo con nuestro resultado anterior, el ARNm del tejido hipotalámico expresó HCAR1, mientras que no se observó ninguna señal en la muestra EGFP purificada (**Fig. 11G**). Además, como se muestra en la Fig. 11G, se detectó ARNm de GFAP, POMC y AgRP en el hipotálamo total, mientras que en las células clasificadas con EGFP, solo se detectó la expresión de POMC (**Fig. 11G, línea 2**).



**Figura 11. HCAR1 está ausente de neuronas POMC.** **A.** Flujo de trabajo experimental. **B.** Neurona POMC purificada. **C-D.** Gráficos de tamaño versus complejidad celular de la purificación FACS de neuronas obtenidas de ratones POMC-EGFP. **E-F.** Gráficos de distribución de intensidad FITC de eventos clasificados. **G.** Perfiles de expresión de ARNm de *Pomc*, *Agrp*, *Gfap*, *Hcar1* y subunidad ribosómica 18 s. Productos de PCR de hipotálamo (carril 1), neuronas POMC aisladas (carril 2). El control negativo consistió en RT (-) de neuronas POMC aisladas (carril 3). Barra B: 20  $\mu$ m.

**Objetivo 2: Determinar si las neuronas POMC responden a lactato y definir si el mecanismo involucra la participación de MCT2 y/o HCAR1.**

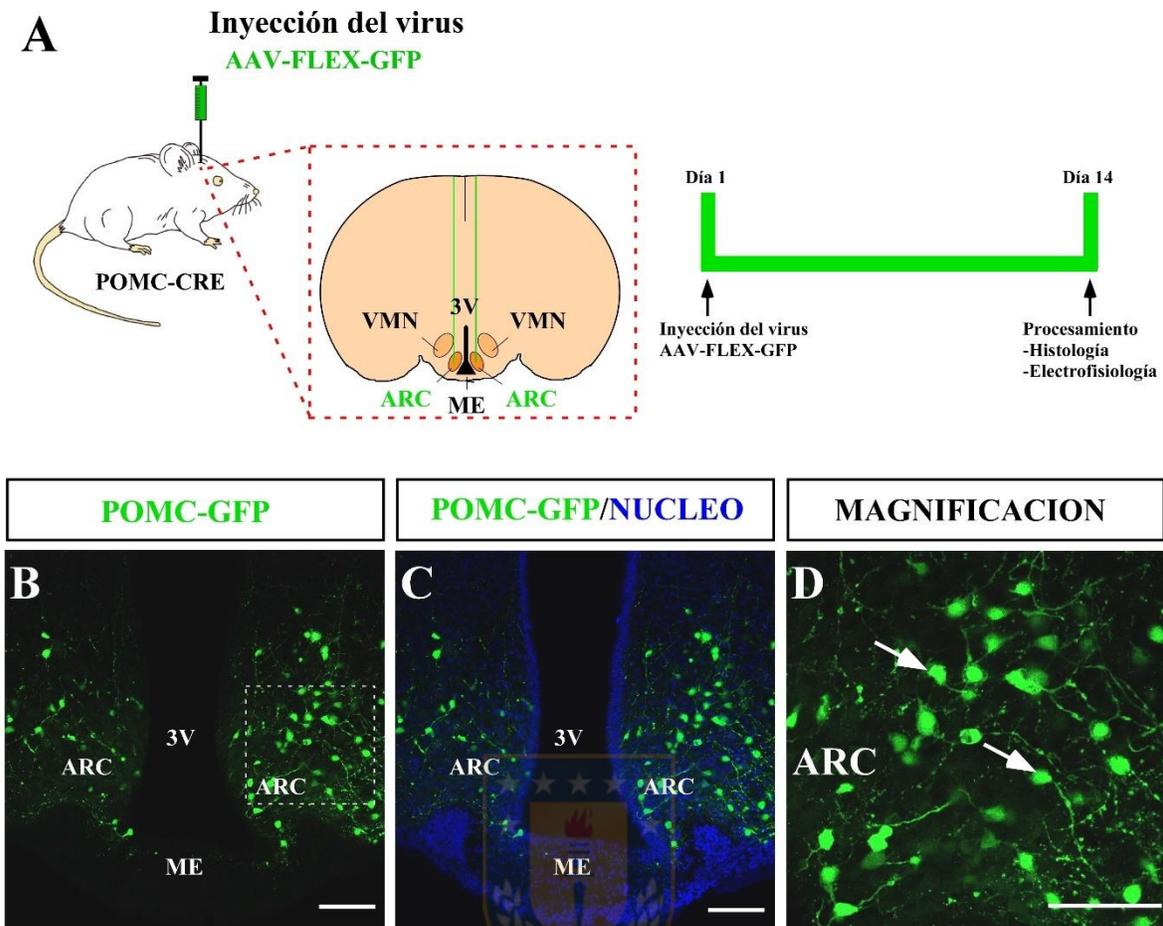
Se ha sugerido que la actividad metabólica de las neuronas POMC está involucrada en el mecanismo de despolarización, por lo que podremos hipotetizar que el L-lactato tenga un efecto similar a la D-glucosa (Parton et al. 2007). Registros electrofisiológicos realizados en rebanadas de VMN han evidenciado que las NGE aumentan su tasa de disparo en presencia de L-lactato (Song and Routh 2005), sin embargo no hay evidencia de que el lactato pueda activar a las neuronas POMC.

Debido al posicionamiento de las neuronas POMC en el ARC, es altamente plausible que estas neuronas respondan a L-lactato proveniente de los tanicitos, células gliales que detectan los aumentos en la concentración de glucosa del LCR y liberan lactato hacia el parénquima. Este acoplamiento metabólico entre tanicitos y neuronas mediante lactato, es posible por la presencia de los MCTs (Elizondo-Vega et al. 2015; Elizondo-Vega et al. 2016). Además, debido a que se demostró que los tanicitos están acoplados con astrocitos en el parénquima hipotalámico (Recabal et al. 2018), y que estos últimos expresan HCAR1, es posible proponer que el lactato proveniente de los tanicitos pueda actuar sobre HCAR1 en astrocitos para modular la actividad de las neuronas POMC.

Para determinar si las neuronas POMC responden a lactato, incubamos L-lactato y sus derivados en rebanadas de hipotálamo de ratón, marcando a las neuronas POMC para su identificación y evaluar si estas respuestas dependen de MCTs o de HCAR1.

## **2.1 Estandarización del uso de AAV en el ARC.**

Estudios previos han apoyado que las neuronas que expresan CRE bajo el promotor de POMC corresponden a neuronas POMC que expresan endógenamente GFP (Balthasar et al. 2004; J. Xu et al. 2018). En primera instancia, para la identificación de las neuronas POMC en el hipotálamo, un AAV que permite la expresión de GFP dependiente de CRE, fue inyectado bilateralmente mediante estereotaxia en el ARC de ratones que expresan la recombinasa CRE en neuronas POMC (**Fig. 12A**). Después de 14 días post-transducción del AAV, se obtuvieron secciones frontales de hipotálamo para análisis de expresión de GFP por microscopia confocal. Se observó amplio marcaje GFP (509 nm) en la región del ARC donde se localizan las neuronas POMC (**Fig. 12B-C**). Posteriormente se hicieron cortes frontales de hipotálamo de ratón transducidos con el AAV para visualizar la distribución de las neuronas POMC en el ARC. Neuronas POMC fueron localizadas en las regiones medial y ventral del ARC (**Fig. 13**), visualizándose principalmente desde la posición bregma -0.10 hasta -2.25, sin embargo, la población mayoritaria de neuronas POMC se encontraron entre las posiciones bregma -1.46 hasta -2.18. Además, se detectó inmunomarcaje con vimentina en las secciones donde se encuentra la mayor concentración de neuronas POMC (**Fig. 13A1-F4**).

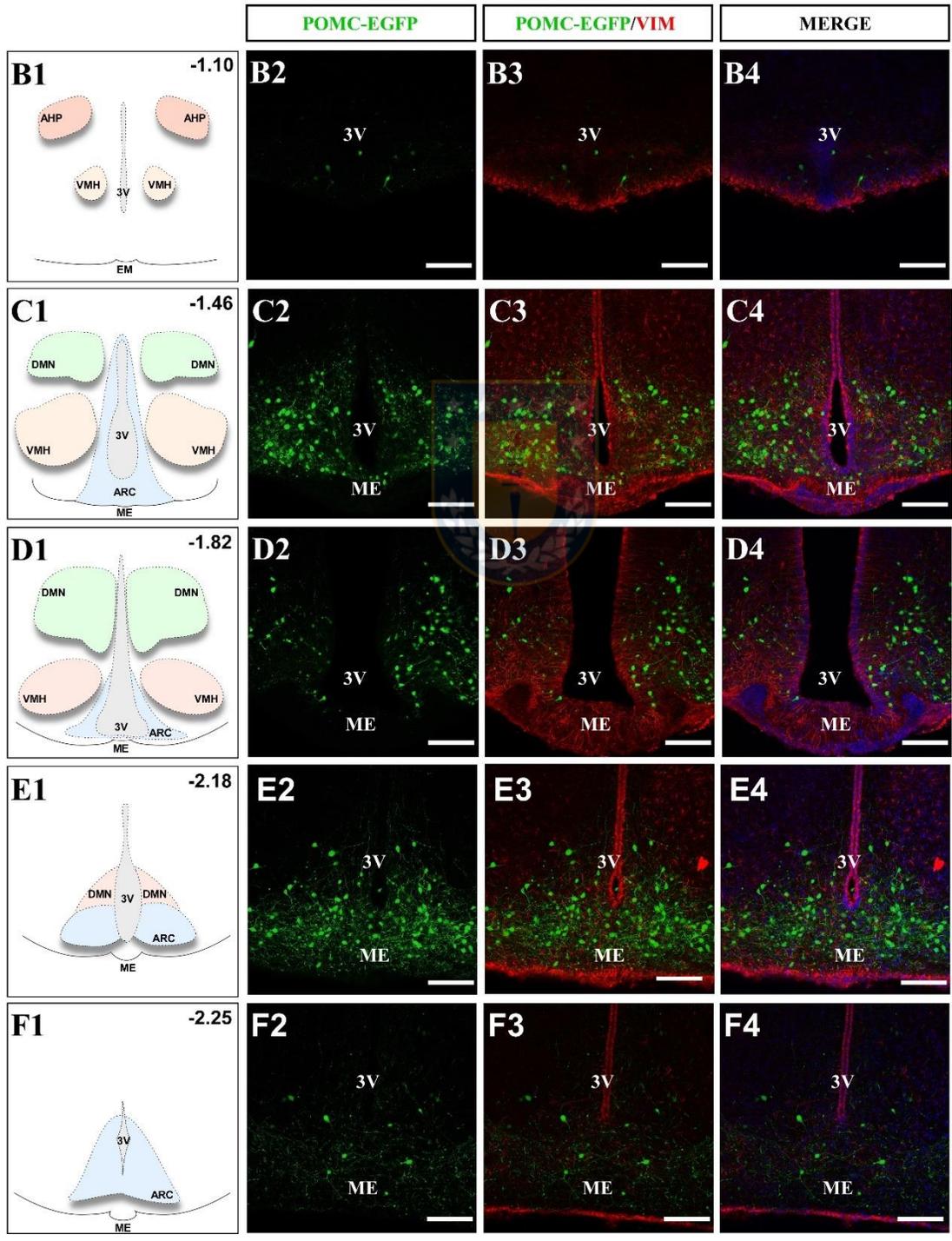
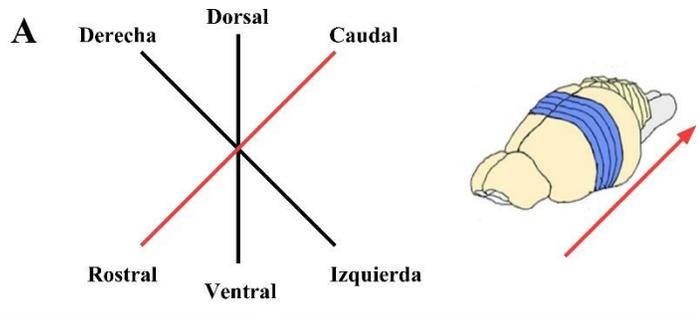


**Figura 12. Identificación de las neuronas POMC-GFP en el ARC.** **A.** Representación esquemática de la aproximación experimental. Para dirigir la expresión del marcador de GFP específicamente en las neuronas POMC, inyectamos bilateralmente un virus AAV-FLEX-GFP en el ARC de ratones POMC-CRE. **B.** 14 días después de la inyección hubo abundante distribución de neuronas POMC marcadas con GFP en el sitio de la inyección. Barra (B-C): 150  $\mu\text{m}$ , D: 100  $\mu\text{m}$ .

**Figura 13. Análisis de la distribución de las neuronas POMC-EGFP en el hipotálamo.**

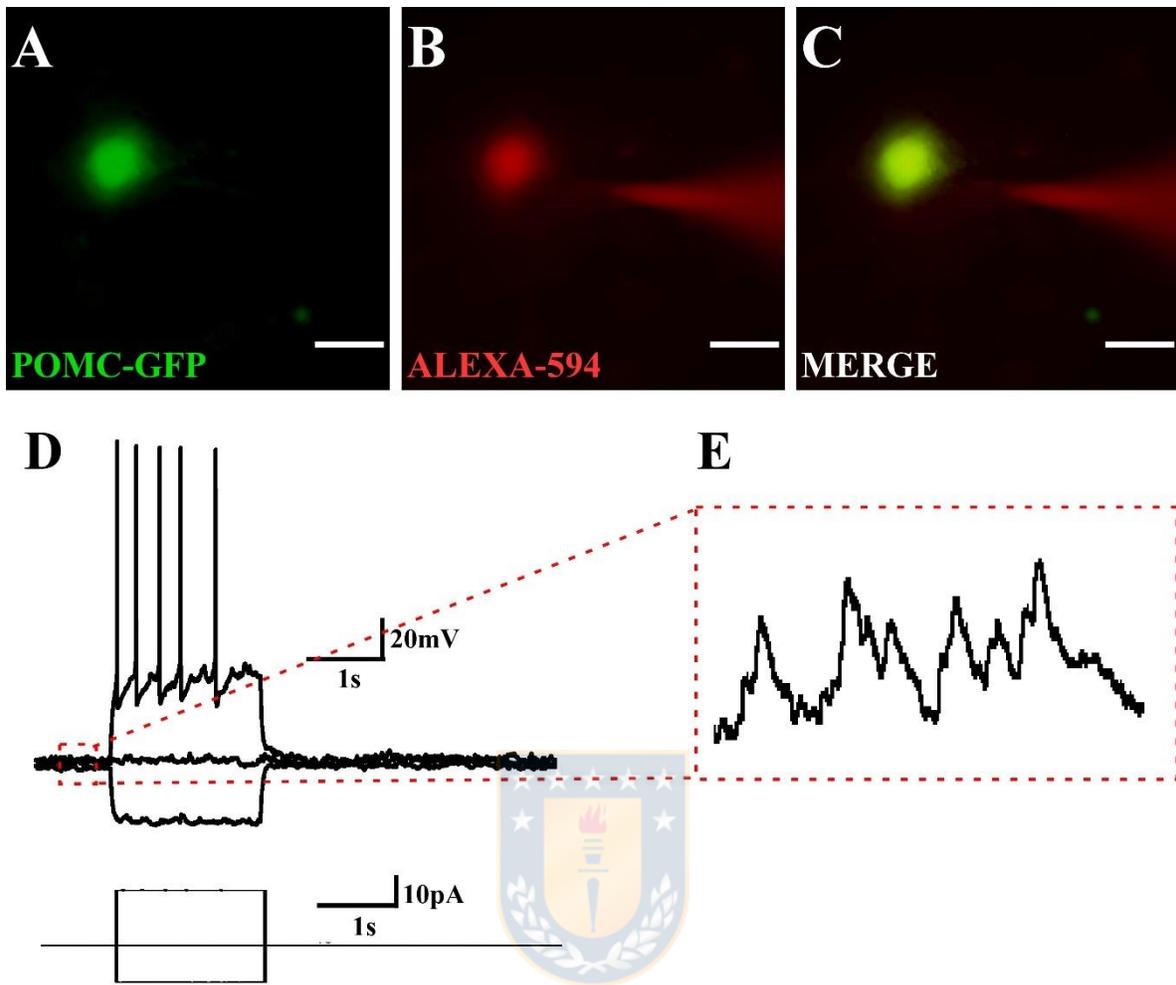
**A.** Representación esquemática de la distribución rostro-caudal de los cortes de hipotálamo.

**B1-F4.** Localización de la marca GFP (verde), vimentina (rojo) y marcador nuclear Hoescht en el ARC analizado por microscopía confocal en cortes desde la posición bregma -1.10 a -2.50. Los cortes utilizados que abarcan desde el hipotálamo anterior a posterior nos permitieron definir la distribución de las neuronas POMC en el ARC. ARC: núcleo arqueado, 3V: tercer ventrículo. Barras 150  $\mu\text{m}$ .

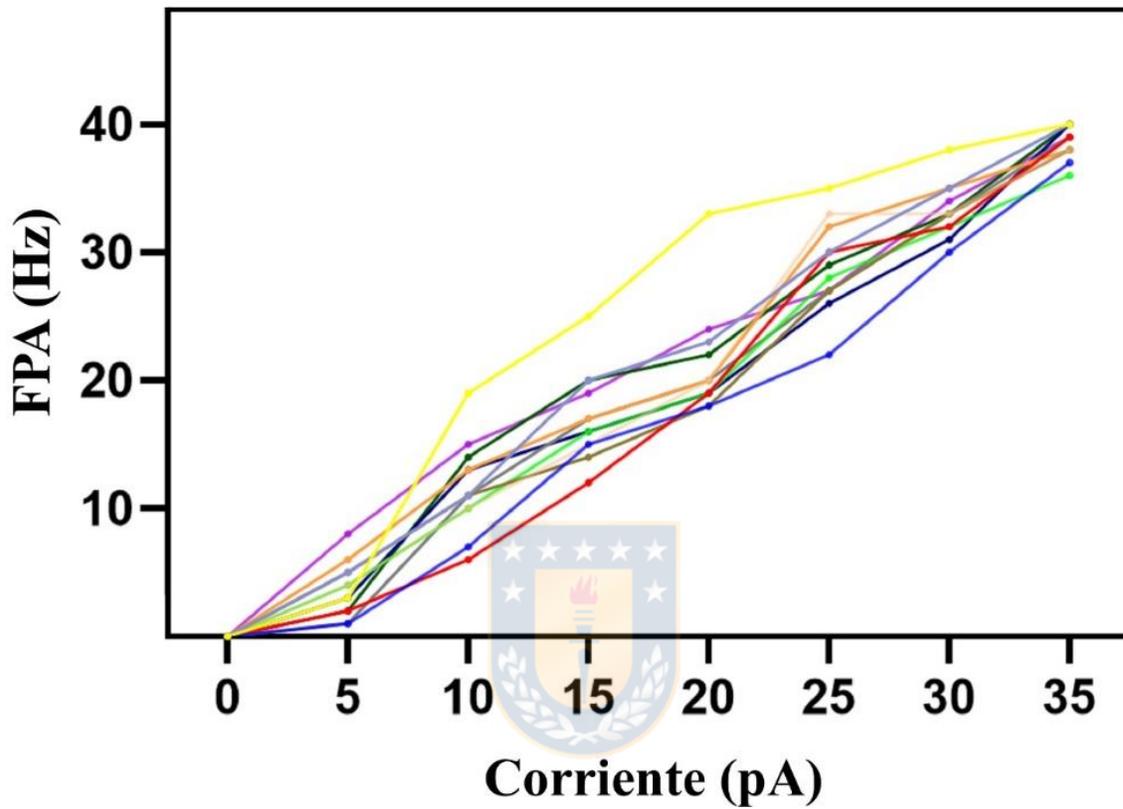


## 2.2 Propiedades electrofisiológicas de las neuronas POMC.

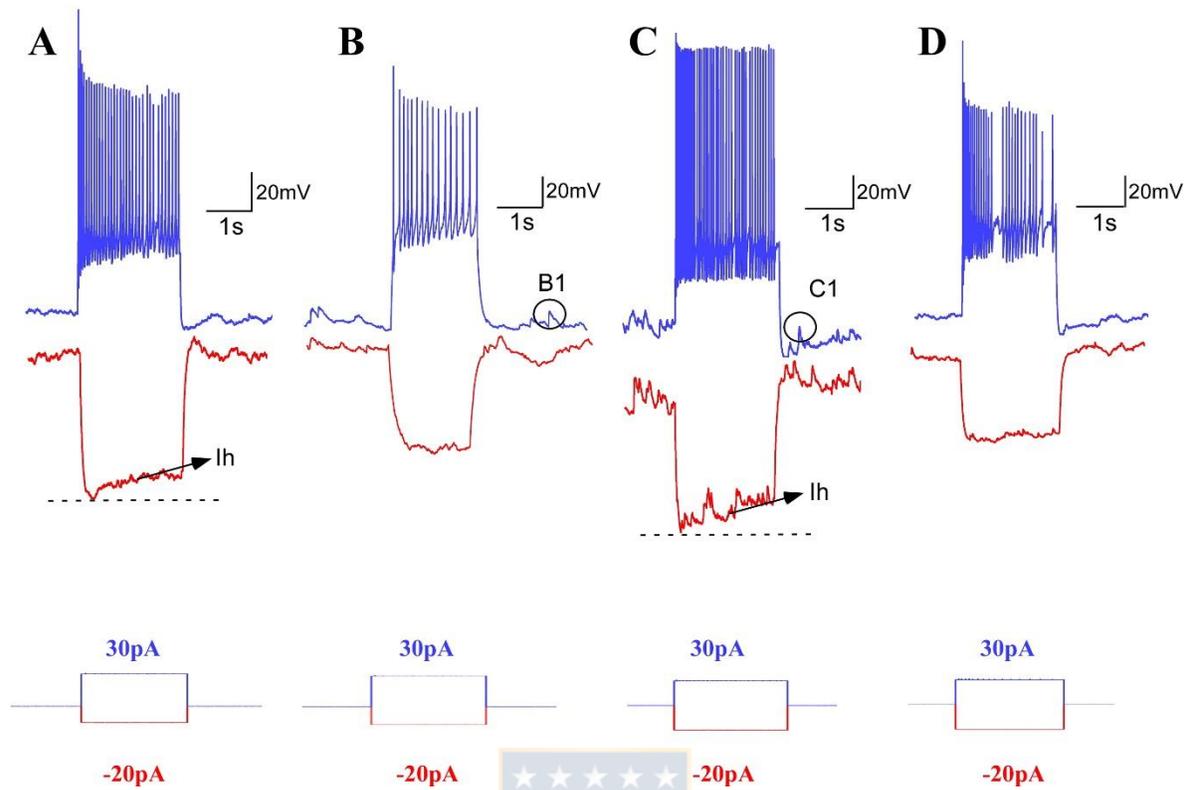
Se realizaron registros electrofisiológicos en rebanadas de ratones POMC-CRE (previamente inyectados con el AAV en el ARC) en modo *whole-cell*, identificando a las neuronas POMC a través de su señal GFP por microscopia. Para confirmar que el registro se realizó en las neuronas POMC, el fluoróforo Alexa-Fluor 594 fue adicionado a la solución interna de la pipeta de *patch* (**Fig. 14A-C**). Para este estudio, se contabilizaron las neuronas POMC que tuvieran más de un Giga Ohm de resistencia de membrana. Se realizaron registros de 60 neuronas POMC-GFP en modo *current clamp*. En ausencia de inyección de corriente, las neuronas poseen un promedio del potencial de membrana en reposo de  $-55 \pm 2$  mV y un promedio de resistencia de  $1.36 \pm 0.40 \Omega$ , similar a lo previamente reportado (Ibrahim et al. 2003). Mas aún, las neuronas POMC exhiben la presencia de potenciales sinápticos excitatorios (**Fig. 14D,E**) y a través de la estimulación con pulsos cuadrados de corriente, exhiben algunas conductancias endógenas que ya han sido descritas por otros investigadores como corrientes activadas por hiperpolarización (I<sub>h</sub>) (Hu et al. 2014) (**Fig. 16B**). Esta corriente se debe a la presencia de canales activados por hiperpolarización (HCN) cuando el potencial de membrana alcanza valores de -90 a -100 mV (Ibrahim et al. 2003). Posteriormente, para evaluar a estas neuronas en términos de excitabilidad, se realizaron pulsos cuadrados de corrientes (pulso negativo y positivo; -20 pA y -30 pA) y se cuantificaron la frecuencia de potenciales de acción (FPA). Como se muestra en la **Fig 15**, dentro del rango de corrientes usados, el incremento en la FPA se da de manera proporcional al pulso cuadrado de corriente aplicado a la neurona POMC (**Fig. 15D-E**). Además, existen diferencias en las propiedades de conductancia, indicando la heterogeneidad de las neuronas POMC en el ARC (**Fig. 16A-D**).



**Figura 14. Propiedades electrofisiológicas de las neuronas POMC-GFP.** **A.** Fotografía de baja magnificación de una neurona POMC-GFP del ARC (verde). **B-C.** Misma neurona (amarilla) después de la diálisis del colorante Alexa-594 (rojo) a través de la pipeta de registro. **D.** respuestas en *current-clamp* a la estimulación con pulsos cuadrados de corriente negativos y positivos. En esta neurona el potencial de la membrana en reposo es de -58 mV. **E.** Magnificación de un registro en modo *current clamp* indicando la presencia de potenciales sinápticos excitatorios ). Barra de escala: 20  $\mu$ m.



**Figura 15. Relación de corriente aplicada y FPA de las neuronas POMC-GFP.** Respuestas en *whole cell current-clamp* a la estimulación con pulsos cuadrados de corrientes positiva. El promedio del potencial de la membrana en reposo es de -60 mV. Bajo estas condiciones, las neuronas POMC alcanzaron un promedio máximo de FPA de  $38 \pm 1$  Hz (n=12).



**Figura 16. Diferentes características electrofisiológicas de las neuronas POMC. A-D.**

Trazos de voltaje representativos obtenidos de neuronas POMC en respuesta a pulsos cuadrados de corrientes (2s), hiperpolarizantes (-20pA) y despolarizantes (+30pA). Notar que en las células A y C, al pulso hiperpolarizante, se generan corrientes activadas por hiperpolarización,  $I_h$ , que resultan en un aumento en el potencial de membrana durante la aplicación del estímulo. Los trazos en B1 y C1 representan potenciales sinápticos excitatorios. El potencial de la membrana en reposo para las neuronas A-D son; -58 mV, -56 mV, -55 mV, -58 mV, respectivamente.

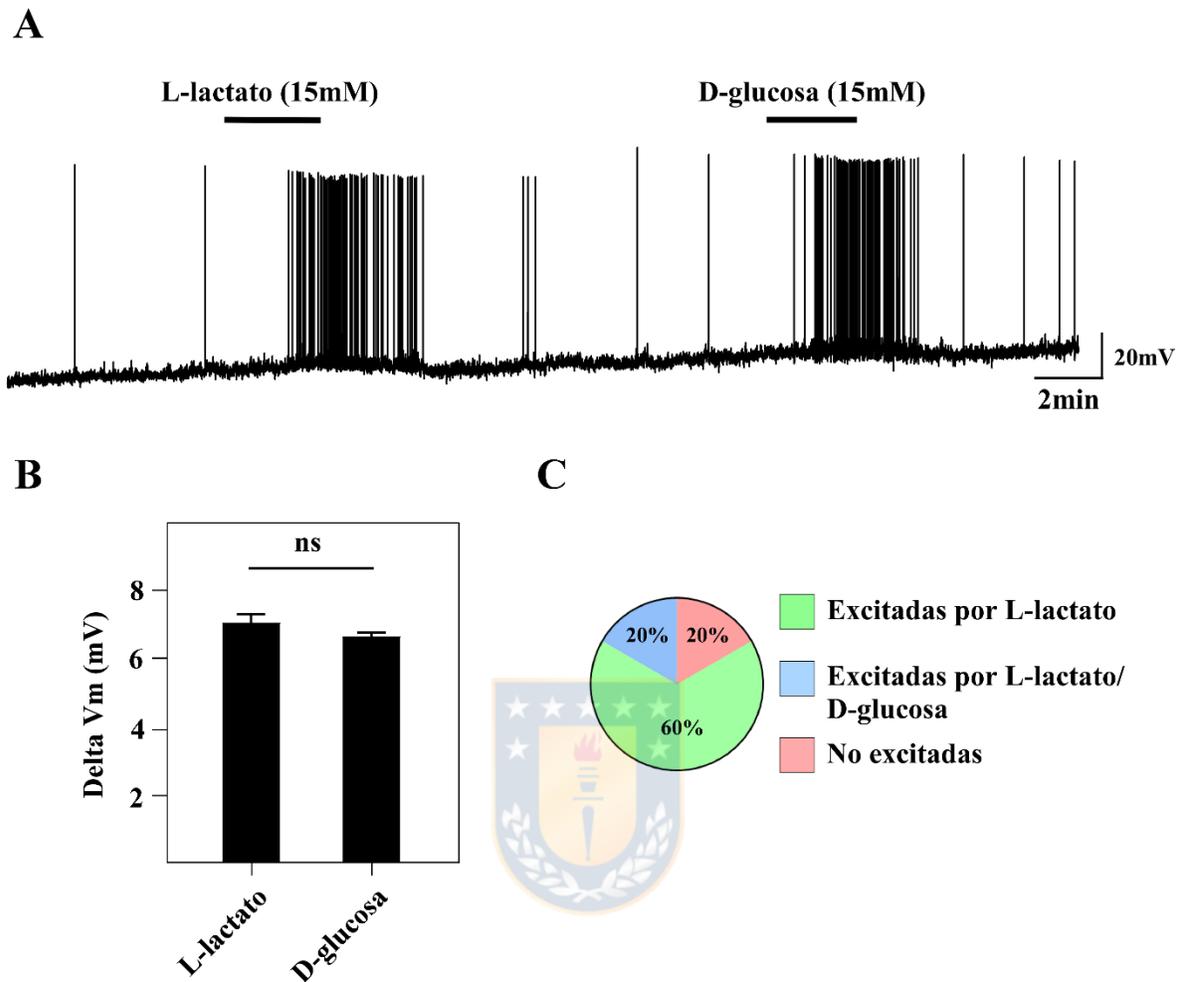
### **2.3 POMC del ARC responden principalmente a L-lactato.**

Neuronas POMC que responden a glucosa han sido caracterizadas por un aumento en la FPA frente a cambios en la concentración de glucosa de 0,5 a 5 mM (Parton et al. 2007). Además, se ha documentado que, en el VMH, las neuronas excitadas por D-glucosa también lo hacen para el L-lactato (15 mM) (Yang et al. 1999). Para abordar si las neuronas responden a L-lactato, se monitorearon cambios en la excitabilidad de las neuronas POMC en respuesta a L-lactato y a D-glucosa. Como se muestra en la Fig. 17 A, la perfusión con L-lactato 15 mM produjo una despolarización reversible y un aumento en la FPA de las neuronas POMC (**Fig. 17A-C**;  $\Delta V_m 7,37 \pm 0,75$  mV,  $n = 20$ ). Además, un subconjunto de neuronas POMC excitadas por L-lactato (5/25) también respondió a D-glucosa con una despolarización (**Fig. 17B-C**;  $\Delta V_m 6,58 \pm 0,68$  mV). En la Fig. 17 D, resumimos las respuestas al lactato y la glucosa en la población total de neuronas POMC registradas. De las 25 neuronas registradas, 15 fueron activadas solo por L-lactato (60%), mientras que 5 fueron activadas tanto por glucosa como por lactato (20%). Por último, 5 de las neuronas registradas no respondieron ni al L-lactato ni a la D-glucosa (20%). Estos resultados sugieren que prevalecen las respuestas excitatorias al L-lactato en las neuronas POMC.

### **1.4 Las neuronas POMC responden de manera diferente frente a un inhibidor de MCTs.**

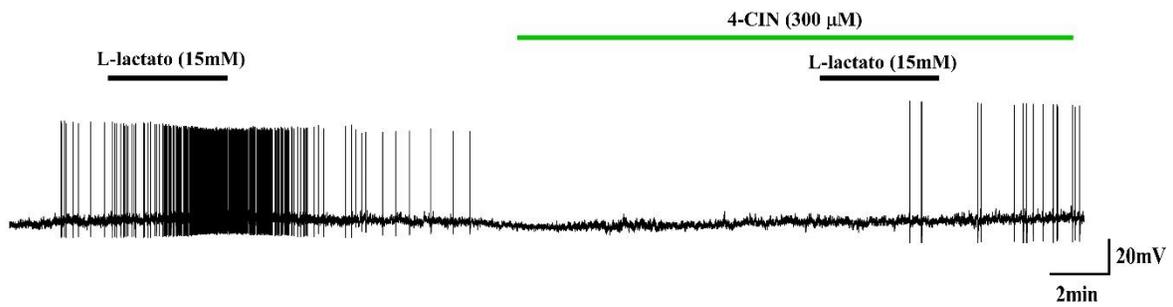
Con el propósito de demostrar la hipótesis resumida en el modelo de interacción metabólica entre eritrocitos y neuronas a través de lactato, nosotros decidimos evaluar si la despolarización de las neuronas POMC producida por L-lactato, podrían ser afectadas por la presencia de 4-CIN, un inhibidor de MCTs (Choi et al. 2012; Tang et al. 2014). Para este propósito, se registraron un total de 10 neuronas POMC excitadas con L-lactato (15 mM)

perfundidas con 300  $\mu$ M de 4-CIN. Los resultados mostraron que 4-CIN redujo significativamente la despolarización (**Fig. 18A-B**;  $\Delta V_m$ , L-lactato,  $6,95 \pm 0,41$  mV vs L-lactato / 4-CIN,  $1,0 \pm 0,49$  mV;  $P < 0,05$ ) y la FPA (**Fig. 18A-B**) producida por L-lactato en el 40% de las neuronas POMC. Por otra parte, el L-lactato en presencia de 4-CIN despolarizó y aumentó la FPA en el 60% de las neuronas POMC que responden a L-lactato (**Fig. 19B y B1**;  $\Delta V_m$ , L-lactato,  $7,18 \pm 0,95$  mV vs L-lactato / 4-CIN,  $6,87 \pm 0,97$  mV). Posteriormente, evaluamos si sustratos relacionados con el metabolismo energético causan un efecto similar al L-lactato. Para estos experimentos, se utilizó L-piruvato (15mM), un monocarboxilato que es usado como sustrato energético y que es capaz de ingresar a las células por MCTs, con mayor afinidad en comparación con el L-lactato (Km para piruvato y L-Lactato son de 0,1mM y 0,74mM respectivamente) (Broer et al. 1999). De manera interesante, en neuronas POMC que responden a L-lactato (15mM), 50% de las neuronas se despolarizan en presencia de piruvato (**Fig. 20A-A1**;  $\Delta V_m$ , L-lactato,  $7,95 \pm 0,20$  mV; L-piruvato,  $6,21 \pm 0,15$  mV,  $p < 0,05$ ). Por otro lado, en el resto de los registros, las neuronas POMC no se despolarizan en presencia de L-piruvato (**Fig. 20B-B1**;  $\Delta V_m$ , L-lactato,  $7,99 \pm 0,23$  mV; L-piruvato,  $0,30 \pm 0,10$  mV,  $P < 0,01$ ). Para profundizar más en el mecanismo de excitación del L-lactato, nosotros utilizamos el D-lactato, el estereoisómero del L-lactato pobremente transportado por MCTs (Bozzo et al. 2013; Ewaschuk et al. 2005). Para este propósito, evaluamos los cambios en la excitabilidad en 10 neuronas POMC en respuesta a L y D-lactato (15 mM). Los resultados muestran que en 9 neuronas POMC excitadas con L-lactato, también respondieron al D-lactato con una despolarización de magnitud similar (**Fig. 21A-B**;  $\Delta V_m$ , L-lactato,  $7,36 \pm 0,49$  mV; D -lactato,  $7,37 \pm 0,51$  mV) y un aumento en la FPA. Sólo 1 neurona POMC excitada con L-lactato no respondió al D-lactato.

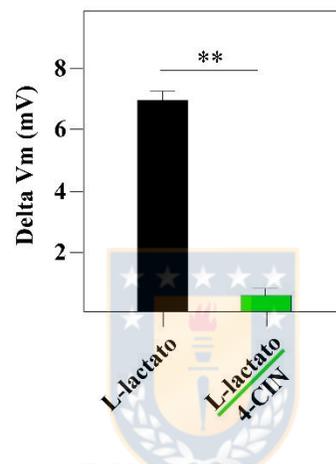


**Figura 17. Despolarización en POMC frente a L-lactato y D-glucosa.** **A.** *Whole cell* en modo *current clamp* de neuronas POMC, perfundidas con 1mM de D-glucosa y posteriormente perfundidas con D-glucosa (15mM) y L-lactato (15mM). El potencial de membrana en reposo es de -58 mV. n=5. **B.** Resumen de las despolarizaciones producidas D-glucosa y L-lactato de las neuronas POMC. **C.** Gráfico que ilustra el porcentaje en neuronas POMC que responden al L-lactato y D-glucosa. Los resultados representan la media  $\pm$  SD de cinco células diferentes.

A

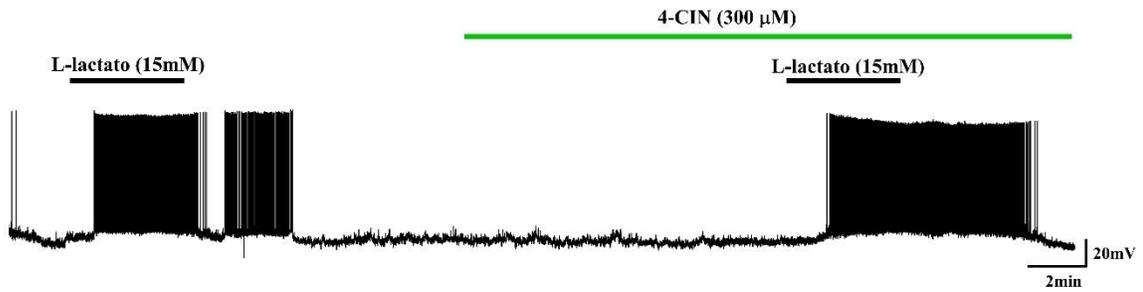


B

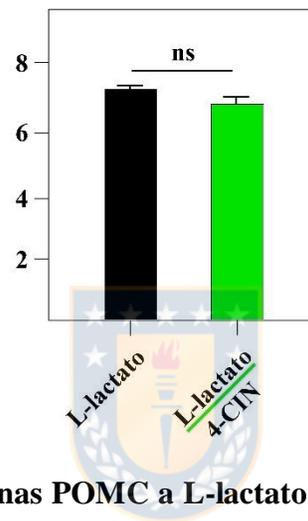


**Figura 18. Respuesta de neuronas POMC a L-lactato que son sensibles al inhibidor del transportador de monocarboxilatos.** A. *Whole cell* en modo *current clamp* de neuronas POMC que responden a L-lactato (15mM), y luego perfundidas con L-lactato suplementado con 300 μM de 4-CIN, un potente inhibidor de MCTs. El potencial de membrana en reposo es de -55 mV. n=4. B. Resumen de las despolarizaciones producidas por L-lactato y L-lactato/4-CIN en las neuronas POMC. \*\*p<0.01.

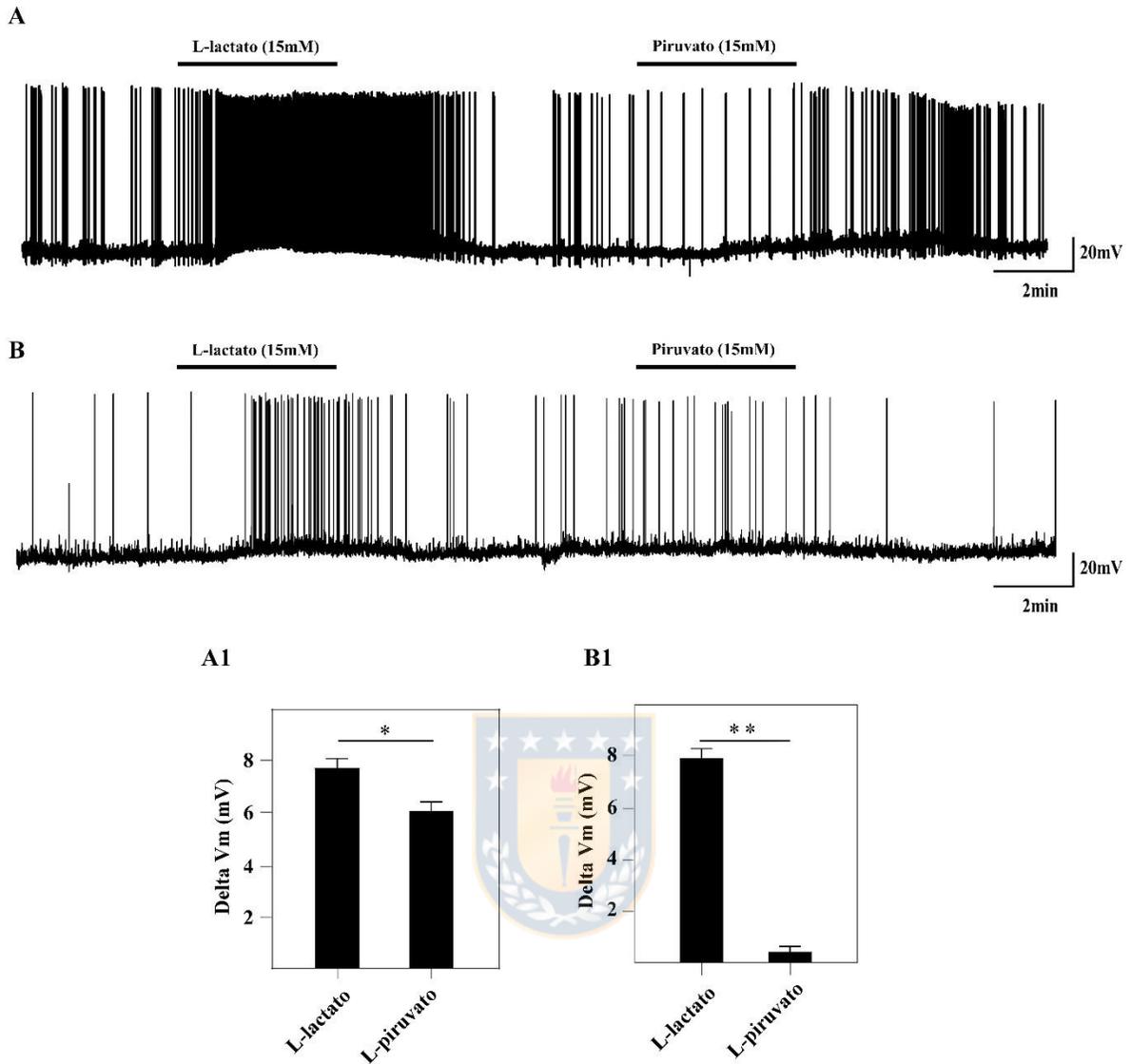
A



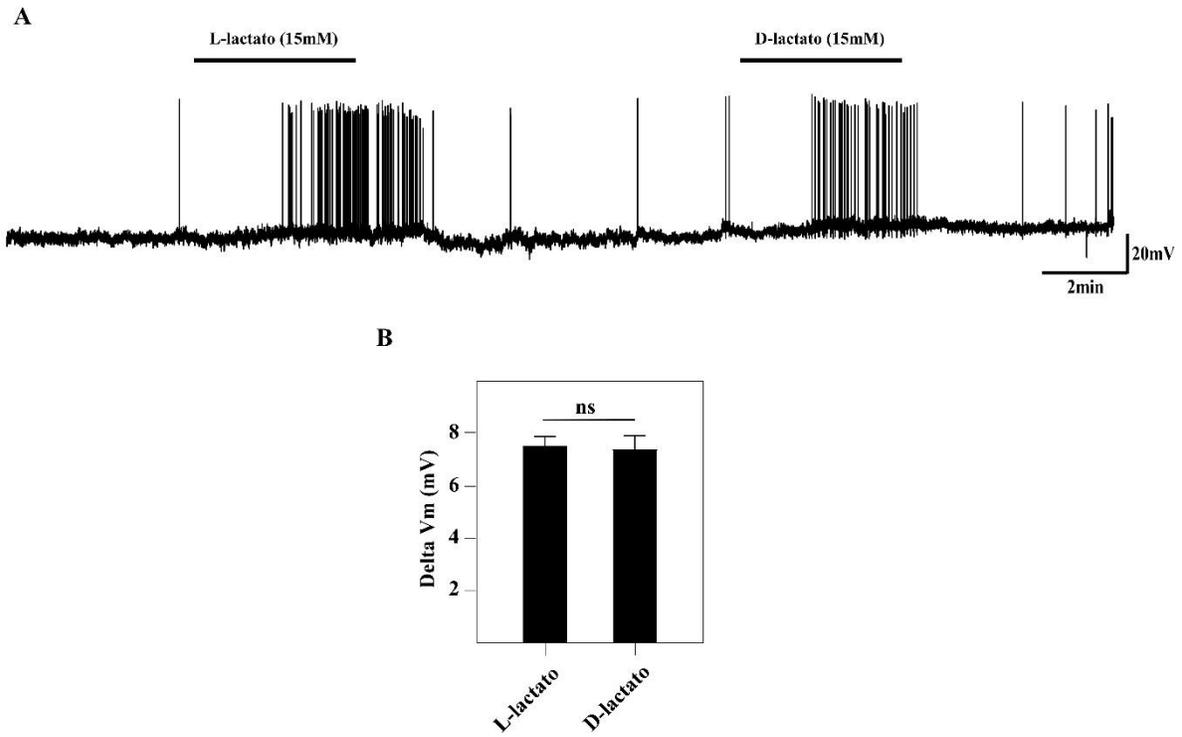
B



**Figura 19. Respuesta de neuronas POMC a L-lactato no son sensibles al inhibidor del transportador de monocarboxilatos. A.** *Whole cell* en modo *current clamp* de neuronas POMC que responden a L-lactato, y luego perfundidas con L-lactato (15mM) suplementado con 300 μM de 4-CIN, un potente inhibidor de MCTs. El potencial de membrana en reposo es de -56 mV. n=6. **B.** Resumen de las despolarizaciones producidas por L-lactato y L-lactato/4-CIN en las neuronas POMC.



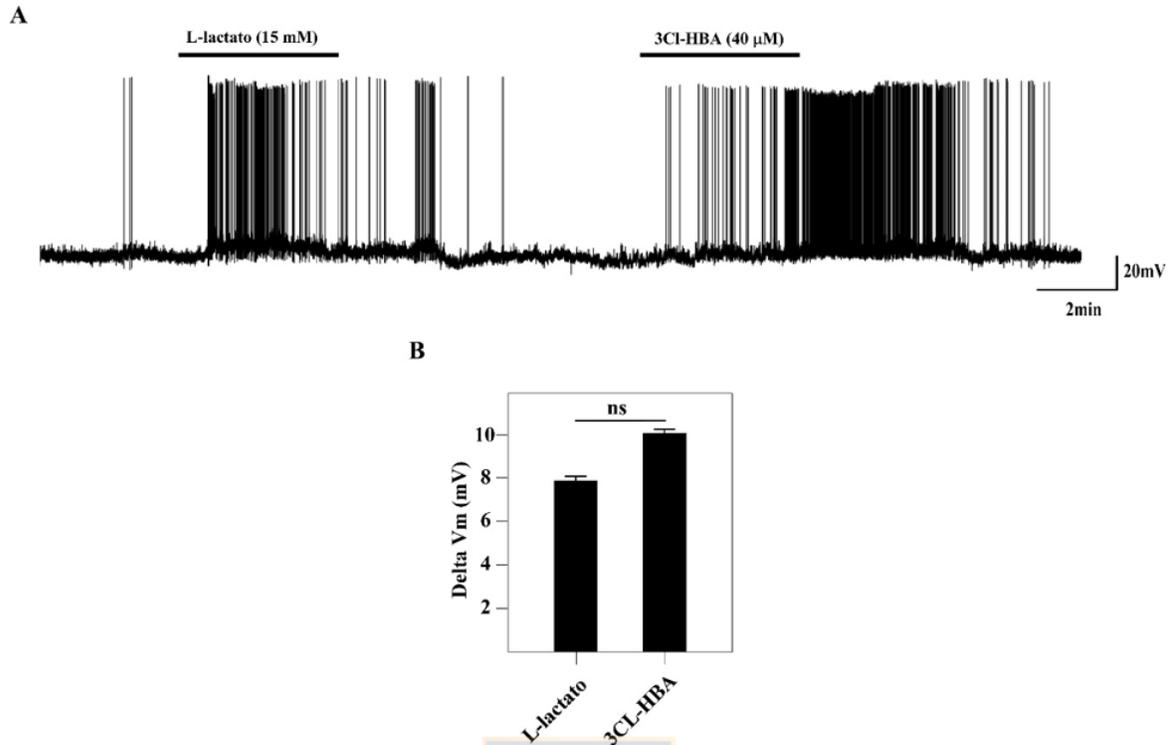
**Figura 20. Registros electrofisiológicos de POMC frente a L-lactato y L-piruvato. A-B** *Whole cell* en modo *current clamp* de neuronas POMC excitadas por L-lactato (15 mM), y luego perfundidas con L-piruvato (15 mM). El potencial de membrana en reposo es de -54 mV y -55mV. n=6. **A1-B1.** Resumen de las despolarizaciones producidas por L-lactato y L-piruvato en las neuronas POMC. \* p<0.05, \*\*p<0.01.



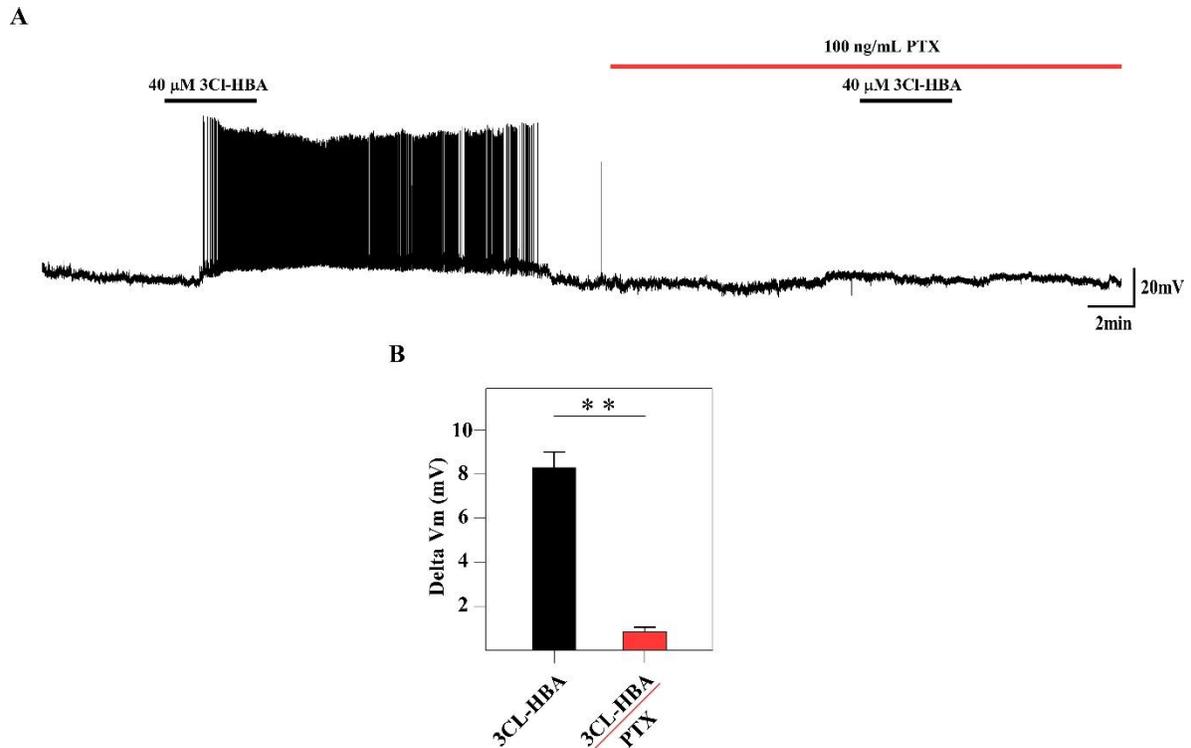
**Figura 21. Registros electrofisiológicos de neuronas POMC en respuesta a L-lactato y D-lactato.** **A.** *Whole cell* en modo *current clamp* de neuronas POMC excitadas por L-lactato (15 mM), y luego perfundidas con D-lactato (15 mM). Ambos sustratos producen una despolarización acompañada de un aumento de la FPA. El potencial de membrana en reposo es de -54 mV. n=9. **B.** Resumen de las despolarizaciones producidas por L-lactato y D-lactato en las neuronas POMC.

### 1.5. HCAR1 media la activación de neuronas POMC.

Los resultados anteriores sugieren que algunas neuronas POMC pueden responder al lactato a través de un mecanismo que no depende de su transporte, por lo que se consideraría al lactato como una molécula de señalización. Estudios realizados por Bozzo y col, determinaron que el D-lactato es un agonista de HCAR1, por lo que nuestros resultados podrían indicar que HCAR1 esté involucrado en el mecanismo de despolarización de las neuronas POMC. Para determinar fehacientemente el involucramiento de HCAR1, evaluamos la excitabilidad de las neuronas POMC en respuesta a L-lactato (15 mM) y al agonista específico de HCAR1, 3Cl-HBA (40  $\mu$ M) (de Castro Abrantes et al. 2019; Dvorak et al. 2012). Los resultados muestran que las neuronas POMC despolarizadas con L-lactato también lo hicieron con el 3Cl-HBA (**Fig. 22A-B**;  $\Delta V_m$ , L-lactato,  $7,92 \pm 0,98$  mV; 3Cl-HBA,  $9,7 \pm 0,65$  mV) y un aumento en la FPA. Debido a que los HCARs están acoplados a proteína Gai, nosotros corroboramos si el mecanismo de señalización HCAR1 depende de Gai, utilizando *toxina pertussis* (PTX), un conocido inactivador de la proteína Gai (Mangmool and Kurose 2011). Para este propósito, se registraron un total de tres neuronas POMC excitadas con 3CL-HBA, que fueron incubadas con PTX (100 ng/ml), y posteriormente se evaluó su respuesta al 3CL-HBA. Los resultados mostraron que en la presencia de PTX la despolarización inducida por 3Cl-HBA está ausente en todas las neuronas POMC registradas (**Fig. 23A-B**;  $\Delta V_m$ , 3Cl-HBA,  $8.7 \pm 0.4$  mV vs 3Cl-HBA / PTX,  $0.87 \pm 0.15$  mV,  $p < 0.01$ ) y la FPA.



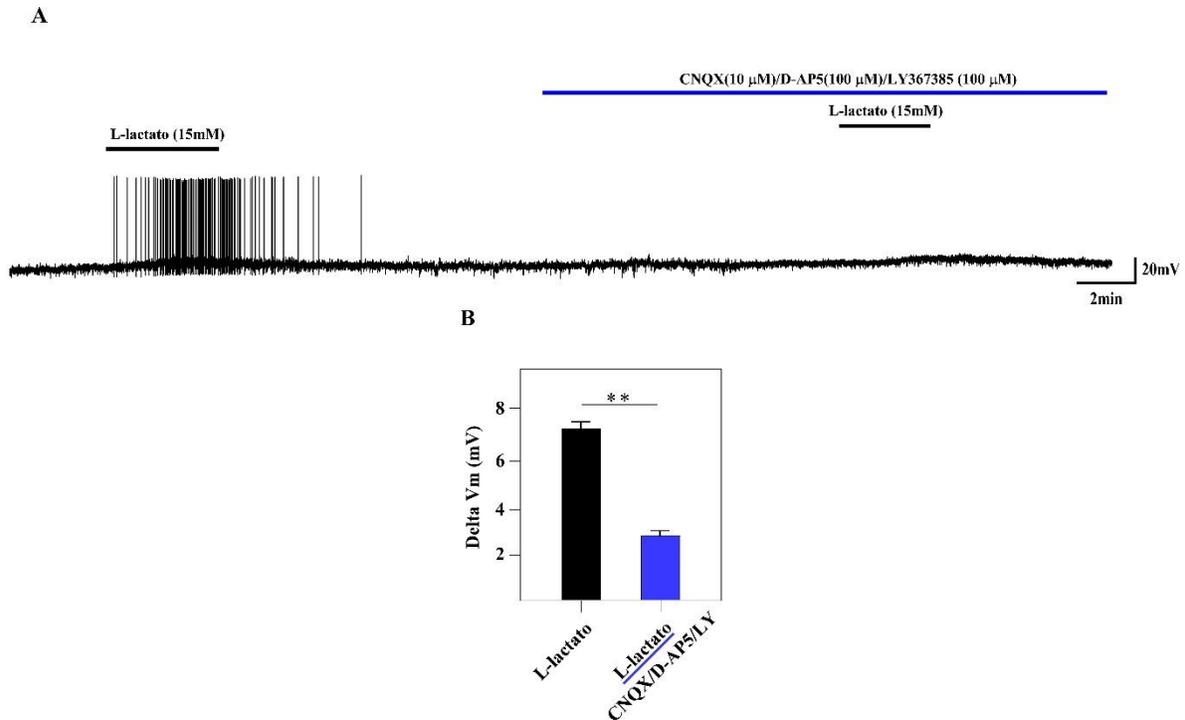
**Figura 22. La activación de HCAR1 despolariza las neuronas POMC.** **A.** *Whole cell* en modo *current clamp* de neuronas POMC excitadas por L-lactato (15 mM), y luego incubadas con 3Cl-HBA (40  $\mu$ M). Ambos agonistas producen una despolarización acompañada de un aumento de la FPA. El potencial de membrana en reposo es de -55 mV. n=6. **B.** Resumen de las despolarizaciones producidas por L-lactato y 3Cl-HBA en las neuronas POMC.



**Figura 23. La activación de HCAR1 depende de la señalización Gi/o. A.** *Whole cell* en modo *current clamp* de neuronas POMC excitadas por 3Cl-HBA (40  $\mu$ M) y luego incubadas con 3Cl-HBA (40  $\mu$ M) suplementado con 100 ng/mL de PTX. PTX reduce la despolarización de las neuronas POMC en presencia de 3Cl-HBA. El potencial de membrana en reposo es de -56 mV. n=3.**B.** Resumen de las despolarizaciones producidas por 3Cl-HBA y 3Cl-HBA/PTX en las neuronas POMC. \*\*p<0.01.

#### **2.4. Mecanismo de despolarización de neuronas POMC es mediada en parte por señalización glutamatérgica.**

Los resultados anteriores indican que las neuronas POMC son despolarizadas por L-lactato y que dependen de la activación de HCAR1. Sin embargo, debido a las características de la señalización Gi/o de estos receptores que llevan a una disminución de la actividad neuronal, se hace improbable que la señalización de HCAR1 pueda despolarizar a las neuronas POMC de forma directa (Uner et al. 2019). Sin embargo, nuestros resultados inmunohistoquímicos, han determinado que HCAR1 no está presente en neuronas POMC, sino que esta confinada en los astrocitos hipotalámicos. Recientemente, se ha determinado que la activación de astrocitos en hipocampo y en hipotálamo, son capaces de despolarizar a las neuronas hipocampales y neuronas POMC respectivamente, mediante un mecanismo que involucra señalización de tipo Gi/o (Durkee et al. 2019; Nuzzaci et al. 2020). Específicamente en hipocampo, la activación del receptor acoplado a Gi/o resulta en liberación de glutamato que activará a las neuronas hipocampales. Para abordar esta interrogante, se registraron 3 neuronas excitadas por L-lactato, que fueron incubadas con bloqueadores de la transmisión sináptica excitatoria (CNQX 10  $\mu$ M/ D-AP5 100  $\mu$ M/ LY 367385 100  $\mu$ M), y posteriormente se evaluó su respuesta al L-lactato (15 mM). Los resultados mostraron que CNQX / D-AP5/ LY 367385 redujo de manera parcial la despolarización inducida por L-lactato en las neuronas POMC registradas (**Fig. 24A-B**;  $\Delta V_m$ , L-lactato,  $6.9 \pm 0.6$  mV vs L-lactato / CNQX / D-AP5/ LY 367385  $3.9 \pm 0.4$  mV; \*  $p < 0.05$  ) y la FPA.



**Figura 24. Despolarización de las neuronas POMC depende de señalización glutamatérgica. A.** *Whole cell* en modo *current clamp* de neuronas POMC excitadas por L-lactato y luego incubadas con L-lactato (15 mM) suplementado con CNQX 10  $\mu$ M/ D-AP5 100  $\mu$ M/ LY 367385 100  $\mu$ M, bloqueadores de la transmisión sináptica excitatoria. n=3. CNQX/D-AP5/LY367385 evita de manera parcial la despolarización de las neuronas POMC en presencia de L-lactato. El potencial de membrana en reposo es de -55 mV. **B.** Resumen de las despolarizaciones producidas por L-lactato y L-lactato/CNQX/D-AP5/LY367385 en las neuronas POMC. \*\*p<0.01.

## DISCUSION

En esta tesis a través de electrofisiología se demostró que las neuronas POMC son activadas por glucosa y en mayor proporción por L-lactato, lo que es consistente con resultados de comportamiento alimenticio en ratas, donde se demostró que la inyección icv de L-lactato induce una reducción en la ingesta alimenticia (Lam et al. 2008). De manera interesante, las células gliales del ARC como los tanicitos y astrocitos son eminentemente glicolíticas. En nuestro laboratorio se demostró que en presencia de glucosa, los tanicitos liberan lactato *in vitro* a través de MCT1 y MCT4 (Cortes-Campos et al. 2011), por lo que se ha propuesto que el lactato procedente de estas células podrían activar a las neuronas POMC (Cortes-Campos et al. 2011; Elizondo-Vega et al. 2015) por un mecanismo que involucra la incorporación de lactato a la neurona, su metabolización para producir ATP y, cómo ocurre con la glucosa, el cierre de canales de  $K_{ATP}$ . Sin embargo, nuestros resultados sugieren que este efecto podría a su vez ser modulado por HCAR1.

De acuerdo con un acucioso análisis de la literatura, este es el primer estudio que demuestra la expresión y funcionalidad de HCAR1 en el ARC. HCAR1 se describió por primera vez en adipocitos (Ge et al. 2008). Estudios posteriores demostraron su expresión en el cerebelo, hipocampo y corteza cerebral (Castillo et al. 2015; Lauritzen et al. 2014; Ma et al. 2020). Además, estudios funcionales indicaron que este receptor está acoplado a  $G_i/o$  y lo han asociado con diferentes funciones dependientes del tipo celular que lo expresa (Ahmed et al. 2010; Bozzo et al. 2013; Cai et al. 2008; de Castro Abrantes et al. 2019; Herrera-Lopez and Galvan 2018; C. Liu et al. 2009). HCAR1 está expresado en neuronas corticales, donde se demostró que el lactato produce una disminución de la excitabilidad neuronal (Bozzo et al. 2013; de Castro Abrantes et al. 2019). Sin embargo, nuestros resultados demostraron que el L-lactato, D-lactato y 3Cl-HBA despolarizaron a las neuronas POMC. Estos resultados

concuerdan con los obtenidos en neuronas piramidales CA1 del hipocampo, donde el L-lactato y el 3,5-DHBA, también aumentan la tasa de activación neuronal (Herrera-Lopez and Galvan 2018). Nos preguntamos entonces, como un GPCR inhibitorio produce este efecto excitatorio en las neuronas POMC y buscamos las respuestas a través de ensayos de localización.

De manera interesante, mediante inmunohistoquímica, no se detectó HCAR1 en estas neuronas, en cambio, se detectó en astrocitos de la región del ARC, próximos a las neuronas POMC. Mas aun, nosotros corroboramos la ausencia de expresión de HCAR1 por FACS. Esto fue posible ya que contábamos con animales POMC-EGFP, lo que no estuvo exento de dificultades principalmente por lo acotada superficie que tiene el ARC, por la misma razón se realizó evaluación de su expresión sólo a nivel de ARNm. Otros grupos de investigación han informado que HCAR1 se localiza en astrocitos hipocampales (Lauritzen et al. 2014; Ma et al. 2020). En cultivo de astrocitos se ha demostrado que la activación de HCAR1 por lactato, tendría un efecto protector, ya que reduce el daño inducido por glutamato, a través de la activación de la vía arrestina 2-MAPK, activación que reduce la entrada de calcio a los astrocitos causado por exceso de glutamato en el espacio extracelular (Ma et al. 2020). Estos autores señalan que la activación de HCAR1 mediada por lactato podría tener un efecto beneficioso y ser utilizado como blanco terapéutico para enfermedades neurodegenerativas. Además, HCAR1 se ha asociado a neurogénesis en la zona ventricular (Lambertus et al. 2021). Estos autores utilizando ratones *knockout* para HCAR1 (HCAR1-KO) demostraron por inmunohistoquímica, en rebanadas de la zona ventricular-subventricular (V-SVZ) de ratones sometidos a ejercicio físico, un aumento en el marcador neurogénico doblecortina (DCX) en los modelos WT, pero no en los HCAR1-KO (Lambertus et al. 2021). Además, mostraron que la inyección intraperitoneal de L-lactato tuvo el mismo efecto. De manera

interesante, la localización del HCAR1 fue confinada en células con morfología astrocítica de la SVZ, y utilizando modelos *in vitro* de estas células, demostraron que ellas responden a L-lactato con incrementos en la fosforilación de AKT/PKB, lo cual fue previamente reportado como una señal de activación de HCAR1 (Morland et al. 2017).

Hasta la fecha, no existen estudios morfológicos ni funcionales que relacionen la activación de HCAR1 en respuestas mediadas por calcio en los astrocitos del ARC. Sin embargo, un elegante estudio utilizando la tecnología DREADD (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs) combinada con técnicas electrofisiológicas, analizó el efecto de la expresión exógena de hM4Di (GPCR-Gi) en los astrocitos del hipocampo sobre la actividad neuronal (Durkee et al. 2019). Los autores demostraron que la activación de hM4Di con N-óxido de clozapina (CNO) aumentó el calcio intracelular en los astrocitos conduciendo a la liberación de glutamato y la despolarización de las neuronas adyacentes, producto de la activación de receptores NMDA. Por lo tanto, es plausible proponer que la despolarización de las neuronas POMC pueda producirse a través de un mecanismo similar, es decir indirecto, que involucre la participación de los astrocitos del ARC. Utilizando una estrategia similar en hipotálamo de ratón, al expresar hM4Di en astrocitos, los autores informaron por microscopia electrónica que el tratamiento con CNO aumentó la retracción de los procesos de los astrocitos alrededor del soma de las neuronas POMC, lo cual aumentó la tasa de disparo de las neuronas POMC (Nuzzaci et al. 2020). En el mismo reporte, los autores determinaron que una condición de hiperglicemia también causa la retracción de los astrocitos, produciendo un aumento en la tasa de disparo de las neuronas POMC. Este fenómeno de plasticidad en astrocitos producto de otro GPCR inhibitorio fue interpretada por los autores como un nuevo mecanismo para controlar la saciedad en respuesta a hiperglicemia (Nuzzaci et al. 2020). Por

lo tanto, nuestros estudios podrían apuntar a un mecanismo similar en el control de la ingesta alimenticia, donde el L-lactato activaría a los astrocitos hipotalámicos y liberaría gliotransmisores hacia la activación de neuronas del ARC, produciendo una la activación de las neuronas POMC.

Nuestro estudio es el primero en demostrar que el L-lactato despolariza las neuronas POMC del ARC, y esta respuesta parece ocurrir usando mecanismos de señalización intracelulares y extracelulares. Nuestros datos mostraron que el 40% de las neuronas POMC registradas fueron excitadas por L-lactato por un mecanismo dependiente de MCT. Estos resultados sugieren que el lactato podría incorporarse y metabolizarse para producir ATP y utilizar el mecanismo intracelular canónico de activación neuronal, presumiblemente a través del cierre del  $K_{ATP}$ . Los registros de voltaje en rebanadas de hipotálamo en presencia de D-glucosa y L-lactato, en el medio extracelular, mostraron que las neuronas POMC responden principalmente a L-lactato en lugar de la D-glucosa. La capacidad del lactato para suplir la función de la glucosa se informó en estudios fisiológicos en los que el L-lactato perfundido en VMH *in vivo* suprime la respuesta contrarregulatoria a la hipoglucemia (Lam et al. 2008). Por otro lado, estudios realizados en rebanadas del VMH muestran que el lactato, en condiciones de baja glucosa, aumenta la tasa de disparo de neuronas del VMH, donde residen neuronas anorexígenicas (Yang et al. 1999). Además, estudios en rebanadas de hipotálamo han reportado el rol excitatorio del lactato en neuronas del VMN, y también se demostró que el efecto excitatorio del lactato depende de la participación de  $K_{ATP}$ , al igual que los efectos ejercidos por la glucosa (Song and Routh 2005). Por otro lado, estudios realizados en rebanadas de hipocampo han determinado que, en ausencia de glucosa, el L-lactato puede mantener la transmisión sináptica y potenciación a largo plazo (Ivanov et al. 2014). Un

interesante estudio en modelos de rata sometidos a evitación inhibitoria para analizar la memoria a largo plazo, determinaron que la administración de L-lactato liberado de los astrocitos hipocampales producto de la glucogenolisis son requeridos para la formación y mantención de la memoria a largo plazo (Suzuki et al. 2011). Los estudios realizados en hipotálamo permitieron plantear la hipótesis de que el lactato podría cumplir funciones en la mantención de redes neuronales, además podría desempeñar un papel en la inducción de la saciedad; sin embargo, su mecanismo de acción sobre las neuronas POMC está recién comenzando a conocerse.

La expresión de MCT2 se demostró en hipotálamo de rata a través de *western-blot*, RT-PCR e inmunohistoquímica. Imágenes por microscopia confocal mostraron que la localización de MCT2 se confinó principalmente en neuronas y no en células gliales del hipotálamo basal. De manera interesante, MCT2 fue localizada en el 90% de las neuronas orexigénicas y en un 60% en las neuronas anorexigénicas, Además, ensayos de transporte demostraron que las neuronas incorporan L-lactato, y que su transporte es inhibido por 4-CIN, lo que sugiere que MCT2 podría estar implicado en el mecanismo de activación de neuronas POMC. Sin embargo, debido a que casi un 40% de las neuronas POMC no expresan MCT2, se puede sugerir que esta subpoblación pueda tener otros tipos de mecanismo de activación neuronal (Cortes-Campos et al. 2013).

Estudios realizados en el *locus coeruleus*, donde los astrocitos y las neuronas noradrenérgicas se relacionan estructural y funcionalmente, demostraron que la activación optogenética de astrocitos conducen a la despolarización de las neuronas noradrenérgicas (Tang et al. 2014). Mas aun, los autores demostraron que la activación por luz de los astrocitos produce liberación de lactato hacia las neuronas noradrenérgicas, las que se activan aun en presencia

de 4-CIN, mostrando independencia de MCT2. De manera interesante, ellos determinaron que este mecanismo de activación no depende de señalización glutamatérgica y que es el lactato el que tiene efecto excitatorio, desencadenando la liberación de norepinefrina. Los autores atribuyeron esta respuesta a un mecanismo de activación dependiente de un GPCR acoplado a Gs no identificado, ya que la activación fue abolida en presencia de inhibidores de la adenilato ciclasa (AC) y la PKA. En la literatura existe consenso de que los astrocitos pueden liberar L-lactato ante diversos estímulos, modulando la función neuronal, pero el mecanismo de acción del L-lactato sigue sin estar claro (Machler et al. 2016; Suzuki et al. 2011; Tang et al. 2014). Nuestros datos apoyan la idea de que la activación de las neuronas POMC inducida por lactato proviene de las células gliales. Las células gliales adyacente podrían liberar lactato u otros metabolitos frente a un incremento en la concentración de glucosa. Recientemente, Bolborea demostró que la activación optogenética de los tanicitos indujo la despolarización de las neuronas POMC y AgRP, atribuyéndolo a la liberación de ATP y la activación de receptores P2Y, y además conduciendo a una hiperfagia en ratas (Bolborea et al. 2020). Previamente, demostramos que los tanicitos son activados por una alta concentración de glucosa, liberando ATP por un mecanismo principalmente glicolítico, lo que indica que los tanicitos podrían liberar ATP y lactato. De acuerdo con esto, en modelos de ratas *knockdown* de MCT glial, detectamos un aumento en la ingesta alimenticia. Es importante destacar que los análisis de microestructura del comportamiento alimenticio demostraron que este efecto se debió a una disminución en el establecimiento de la saciedad (Elizondo-Vega et al. 2016; Elizondo-Vega et al. 2020). Por lo tanto, proponemos que el lactato pudiera actuar a través de dos mecanismos que conducen a la despolarización de las neuronas POMC; 1) un mecanismo metabólico que implica la incorporación de lactato, la producción de ATP, el cierre de  $K_{ATP}$  y la liberación de  $\alpha$ -MSH (**Fig. 25**) y 2) un mecanismo

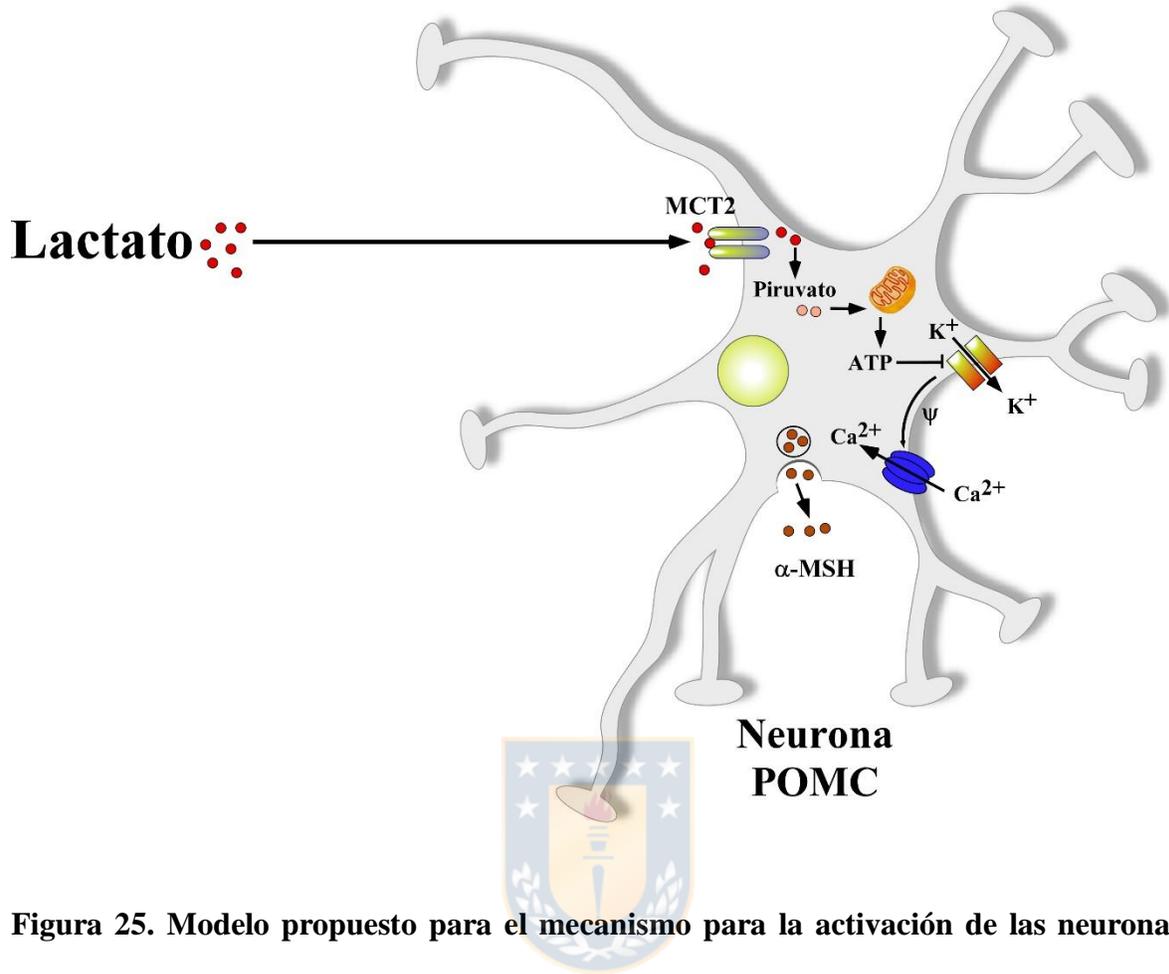
de señalización en el que la activación de HCAR1 mediada por lactato en los astrocitos podría conducir a la liberación de glutamato y la activación de las neuronas POMC (**Fig. 26**). Las diferentes respuestas que nosotros determinamos en las neuronas POMC frente a L-lactato y los agonistas relacionados, y en presencia de inhibidores da cuenta de la heterogeneidad de la población de neuronas POMC. Trabajos realizados por Dodd han determinado que las neuronas POMC responden de diferentes maneras a la insulina, catalogándose 3 subpoblaciones de estas neuronas (Dodd et al. 2018). Estudios recientes han determinado que neuronas que expresan el LEPR y del receptor del péptido 1 similar al glucagón (GLP1-R) representan diferentes subpoblaciones de neuronas POMC (Georgescu et al. 2020). Mas aun, el advenimiento de la transcriptómica de neuronas POMC ha dado información con mayor resolución acerca de la heterogeneidad de las neuronas POMC, que exhiben diferencias a nivel transcripcional en respuesta a cambios en el estatus energético (Lyu et al. 2020). Se necesita más evidencia para determinar cómo el lactato ejerce su efecto sobre las neuronas, a través de las células gliales.

### **Proyecciones.**

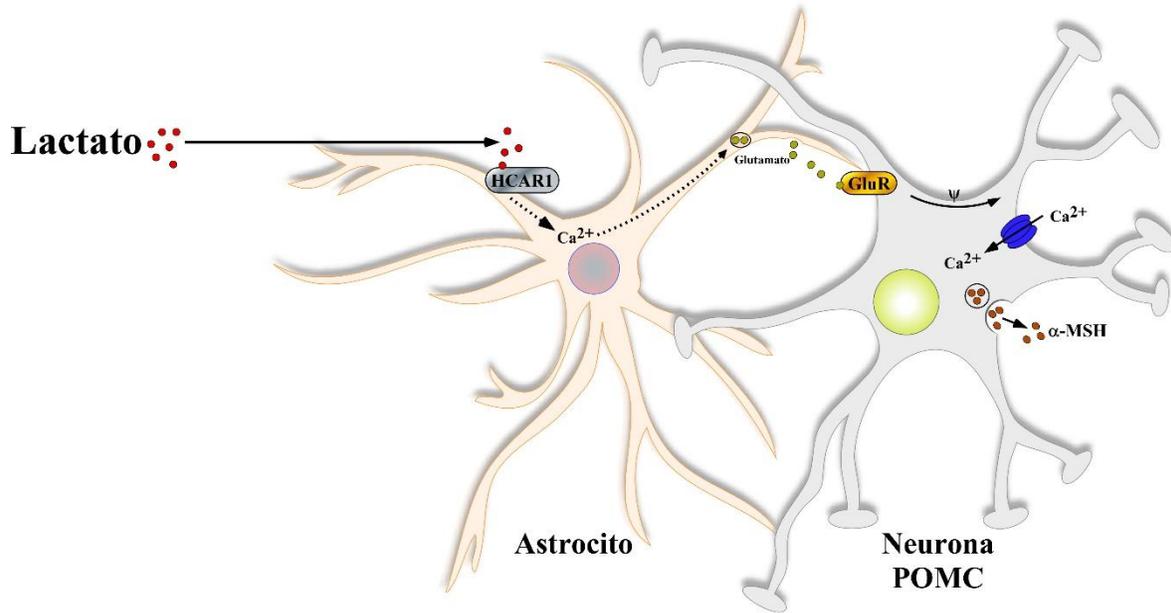
Nuestro estudio mostró que la activación de las neuronas POMC mediada por L-lactato fue suprimida sólo parcialmente al agregar una mezcla de inhibidores de la señalización glutamatérgica que podría deberse a que las neuronas registradas también expresan MCT2, por lo que se hace necesario realizar estos experimentos con el agonista específico y con D-lactato, esto debe complementarse con la utilización de un coctel de inhibición glutamatérgica, para determinar fehacientemente la participación de HCAR1. Dada la localización de HCAR1 en astrocitos cercanos a neuronas POMC, sería relevante demostrar

que la activación de HCAR1 mediada por L-lactato o 3Cl-HBA en astrocitos genera un cambio en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ i. Esto último puede realizarse utilizando un AAV que permite la expresión de GCAMP6 (sensor de calcio) en modelos de ratón GFAP-CRE, en rebanadas de hipotálamo incubadas con L-lactato y 3CL-HBA, y determinar si existe incrementos en el  $\text{Ca}^{2+}$ i en astrocitos. Además, en rebanadas de hipotálamo, se puede comprobar si la inyección de glucosa en un tanicito (células altamente acopladas) conduce a incrementos de  $\text{Ca}^{2+}$ i en los astrocitos y la posterior liberación de glutamato por parte de ellos.





**Figura 25. Modelo propuesto para el mecanismo para la activación de las neuronas POMC mediante la incorporación de lactato.** En un mecanismo clásico de activación neuronal, el lactato es captado por las neuronas POMC a través de MCT2. Por la actividad de la LDH, el lactato es transformado a piruvato y sirve como sustrato para la producción de ATP. El aumento en la relación ATP/ADP provoca el cierre de los canales de K<sup>+</sup> sensibles a ATP, lo cual produce la apertura de canales de Ca<sup>2+</sup> sensible a voltaje para incorporar Ca<sup>2+</sup> y provocar la liberación de neuropéptidos (α-MSH).



**Figura 26. Modelo propuesto para el mecanismo para la activación de las neuronas POMC mediante la activación de HCAR1 en astrocitos.** En un mecanismo de señalización que permite la activación neuronal, el lactato activaría a HCAR1 localizado en astrocitos. La unión del lactato a HCAR1 en los astrocitos, un receptor acoplado a proteína G de tipo Gi/o, que implicaría, a través de un aumento de calcio intracelular, la liberación de glutamato a las neuronas POMC. En este modelo, la activación de los receptores de glutamato provocará una despolarización de las neuronas POMC.

## V. BIBLIOGRAFIA

- Ahmed, K. (2011), 'Biological roles and therapeutic potential of hydroxy-carboxylic Acid receptors', *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2, 51.
- Ahmed, K., et al. (2010), 'An autocrine lactate loop mediates insulin-dependent inhibition of lipolysis through GPR81', *Cell Metab*, 11 (4), 311-9.
- Ainscow, E. K., et al. (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 (2), 429-45.
- Altman, J. and Bayer, S. A. (1978), 'Development of the diencephalon in the rat. III. Ontogeny of the specialized ventricular linings of the hypothalamic third ventricle', *J Comp Neurol*, 182 (4 Pt 2), 995-1015.
- Aponte, Y., Atasoy, D., and Sternson, S. M. (2011), 'AGRP neurons are sufficient to orchestrate feeding behavior rapidly and without training', *Nat Neurosci*, 14 (3), 351-5.
- Appleyard, S. M., et al. (2005), 'Proopiomelanocortin neurons in nucleus tractus solitarius are activated by visceral afferents: regulation by cholecystokinin and opioids', *J Neurosci*, 25 (14), 3578-85.
- Arner, P. (2005), 'Human fat cell lipolysis: biochemistry, regulation and clinical role', *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 19 (4), 471-82.

- Balland, E., et al. (2019), 'Leptin Signaling in the Arcuate Nucleus Reduces Insulin's Capacity to Suppress Hepatic Glucose Production in Obese Mice', *Cell Rep*, 26 (2), 346-55 e3.
- Balthasar, N., et al. (2004), 'Leptin receptor signaling in POMC neurons is required for normal body weight homeostasis', *Neuron*, 42 (6), 983-91.
- Balthasar, N., et al. (2005), 'Divergence of melanocortin pathways in the control of food intake and energy expenditure', *Cell*, 123 (3), 493-505.
- Barahona, M. J., et al. (2018), 'Glial hypothalamic inhibition of GLUT2 expression alters satiety, impacting eating behavior', *Glia*, 66 (3), 592-605.
- Becskei, C., et al. (2007), 'Lesion of the lateral parabrachial nucleus attenuates the anorectic effect of peripheral amylin and CCK', *Brain Res*, 1162, 76-84.
- Bittar, P. G., et al. (1996), 'Selective distribution of lactate dehydrogenase isoenzymes in neurons and astrocytes of human brain', *J Cereb Blood Flow Metab*, 16 (6), 1079-89.
- Blad, C. C., et al. (2011), 'Biological and pharmacological roles of HCA receptors', *Adv Pharmacol*, 62, 219-50.
- Bolborea, M., et al. (2020), 'Hypothalamic tanycytes generate acute hyperphagia through activation of the arcuate neuronal network', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 117 (25), 14473-81.
- Bozzo, L., Puyal, J., and Chatton, J. Y. (2013), 'Lactate modulates the activity of primary cortical neurons through a receptor-mediated pathway', *PLoS One*, 8 (8), e71721.

- Broer, S., et al. (1999), 'Characterization of the high-affinity monocarboxylate transporter MCT2 in *Xenopus laevis* oocytes', *Biochem J*, 341 ( Pt 3), 529-35.
- Broer, S., et al. (1997), 'Comparison of lactate transport in astroglial cells and monocarboxylate transporter 1 (MCT 1) expressing *Xenopus laevis* oocytes. Expression of two different monocarboxylate transporters in astroglial cells and neurons', *J Biol Chem*, 272 (48), 30096-102.
- Cai, T. Q., et al. (2008), 'Role of GPR81 in lactate-mediated reduction of adipose lipolysis', *Biochem Biophys Res Commun*, 377 (3), 987-91.
- Cardoso, F. L., Brites, D., and Brito, M. A. (2010), 'Looking at the blood-brain barrier: molecular anatomy and possible investigation approaches', *Brain Res Rev*, 64 (2), 328-63.
- Castillo, X., et al. (2015), 'A probable dual mode of action for both L- and D-lactate neuroprotection in cerebral ischemia', *J Cereb Blood Flow Metab*, 35 (10), 1561-9.
- Challis, B. G., et al. (2002), 'A missense mutation disrupting a dibasic prohormone processing site in pro-opiomelanocortin (POMC) increases susceptibility to early-onset obesity through a novel molecular mechanism', *Hum Mol Genet*, 11 (17), 1997-2004.
- Chen, A. S., et al. (2000), 'Inactivation of the mouse melanocortin-3 receptor results in increased fat mass and reduced lean body mass', *Nat Genet*, 26 (1), 97-102.
- Cheng, W., et al. (2020), 'Leptin receptor-expressing nucleus tractus solitarius neurons suppress food intake independently of GLP1 in mice', *JCI Insight*, 5 (7).

- Choi, H. B., et al. (2012), 'Metabolic communication between astrocytes and neurons via bicarbonate-responsive soluble adenylyl cyclase', *Neuron*, 75 (6), 1094-104.
- Chuquet, J., et al. (2010), 'Predominant enhancement of glucose uptake in astrocytes versus neurons during activation of the somatosensory cortex', *J Neurosci*, 30 (45), 15298-303.
- Claret, M., et al. (2007), 'AMPK is essential for energy homeostasis regulation and glucose sensing by POMC and AgRP neurons', *J Clin Invest*, 117 (8), 2325-36.
- Cornejo, M. P., et al. (2016), 'Neuroendocrine Regulation of Metabolism', *J Neuroendocrinol*, 28 (7).
- Cortes-Campos, C., et al. (2011), 'MCT expression and lactate influx/efflux in tanycytes involved in glia-neuron metabolic interaction', *PLoS One*, 6 (1), e16411.
- Cortes-Campos, C., et al. (2013), 'MCT2 expression and lactate influx in anorexigenic and orexigenic neurons of the arcuate nucleus', *PLoS One*, 8 (4), e62532.
- Cowley, M. A., et al. (2001), 'Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus', *Nature*, 411 (6836), 480-4.
- Creemers, J. W., et al. (2008), 'Mutations in the amino-terminal region of proopiomelanocortin (POMC) in patients with early-onset obesity impair POMC sorting to the regulated secretory pathway', *J Clin Endocrinol Metab*, 93 (11), 4494-9.

- Cunnane, S., et al. (2011), 'Brain fuel metabolism, aging, and Alzheimer's disease', *Nutrition*, 27 (1), 3-20.
- de Castro Abrantes, H., et al. (2019), 'The Lactate Receptor HCAR1 Modulates Neuronal Network Activity through the Activation of Galpha and Gbetagamma Subunits', *J Neurosci*, 39 (23), 4422-33.
- de Vries, M. G., et al. (2003), 'Extracellular glucose in rat ventromedial hypothalamus during acute and recurrent hypoglycemia', *Diabetes*, 52 (11), 2767-73.
- Deitmer, J. W., et al. (2019), 'Energy Dynamics in the Brain: Contributions of Astrocytes to Metabolism and pH Homeostasis', *Front Neurosci*, 13, 1301.
- Demidowich, A. P., Jun, J. Y., and Yanovski, J. A. (2017), 'Polymorphisms and mutations in the melanocortin-3 receptor and their relation to human obesity', *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 1863 (10 Pt A), 2468-76.
- DiGirolamo, M., Newby, F. D., and Lovejoy, J. (1992), 'Lactate production in adipose tissue: a regulated function with extra-adipose implications', *FASEB J*, 6 (7), 2405-12.
- Dimmer, K. S., et al. (2000), 'The low-affinity monocarboxylate transporter MCT4 is adapted to the export of lactate in highly glycolytic cells', *Biochem J*, 350 Pt 1, 219-27.
- do Carmo, J. M., et al. (2013), 'Differential control of metabolic and cardiovascular functions by melanocortin-4 receptors in proopiomelanocortin neurons', 305 (4), R359-68.
- Dodd, G. T., et al. (2018), 'Insulin regulates POMC neuronal plasticity to control glucose metabolism', *Elife*, 7.

- Dunn-Meynell, A. A., et al. (2016), 'Endogenous VMH amylin signaling is required for full leptin signaling and protection from diet-induced obesity', *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 310 (4), R355-65.
- Durkee, C. A., et al. (2019), 'Gi/o protein-coupled receptors inhibit neurons but activate astrocytes and stimulate gliotransmission', *Glia*, 67 (6), 1076-93.
- Dvorak, C. A., et al. (2012), 'Identification of Hydroxybenzoic Acids as Selective Lactate Receptor (GPR81) Agonists with Antilipolytic Effects', *ACS Med Chem Lett*, 3 (8), 637-9.
- Ebrahim, I. O., et al. (2002), 'The hypocretin/orexin system', *J R Soc Med*, 95 (5), 227-30.
- Elizondo-Vega, R., et al. (2015), 'The role of tanycytes in hypothalamic glucosensing', *J Cell Mol Med*, 19 (7), 1471-82.
- Elizondo-Vega, R., et al. (2016), 'Inhibition of hypothalamic MCT1 expression increases food intake and alters orexigenic and anorexigenic neuropeptide expression', *Sci Rep*, 6, 33606.
- Elizondo-Vega, R., et al. (2020), 'Inhibition of Hypothalamic MCT4 and MCT1-MCT4 Expressions Affects Food Intake and Alters Orexigenic and Anorexigenic Neuropeptide Expressions', *Mol Neurobiol*, 57 (2), 896-909.
- Emond, M., et al. (1999), 'Central leptin modulates behavioral and neural responsivity to CCK', *Am J Physiol*, 276 (5), R1545-9.

- Ewaschuk, J. B., Naylor, J. M., and Zello, G. A. (2005), 'D-lactate in human and ruminant metabolism', *J Nutr*, 135 (7), 1619-25.
- Fenselau, H., et al. (2017), 'A rapidly acting glutamatergic ARC-->PVH satiety circuit postsynaptically regulated by alpha-MSH', *Nat Neurosci*, 20 (1), 42-51.
- Fioramonti, X., et al. (2007), 'Characterization of glucosensing neuron subpopulations in the arcuate nucleus: integration in neuropeptide Y and pro-opio melanocortin networks?', *Diabetes*, 56 (5), 1219-27.
- Frayling, C., Britton, R., and Dale, N. (2011), 'ATP-mediated glucosensing by hypothalamic tanycytes', *J Physiol*, 589 (Pt 9), 2275-86.
- Garcia, M., et al. (2003), 'Hypothalamic ependymal-glia cells express the glucose transporter GLUT2, a protein involved in glucose sensing', *J Neurochem*, 86 (3), 709-24.
- Garcia, M. A., et al. (2001), 'Elevated expression of glucose transporter-1 in hypothalamic ependymal cells not involved in the formation of the brain-cerebrospinal fluid barrier', *J Cell Biochem*, 80 (4), 491-503.
- Garfield, A. S., et al. (2015), 'A neural basis for melanocortin-4 receptor-regulated appetite', *Nat Neurosci*, 18 (6), 863-71.
- Ge, H., et al. (2008), 'Elucidation of signaling and functional activities of an orphan GPCR, GPR81', *J Lipid Res*, 49 (4), 797-803.
- Georgescu, T., et al. (2020), 'Neurochemical Characterization of Brainstem Pro-Opiomelanocortin Cells', *Endocrinology*, 161 (4).

- Grollman, E. F., et al. (2000), 'Determination of transport kinetics of chick MCT3 monocarboxylate transporter from retinal pigment epithelium by expression in genetically modified yeast', *Biochemistry*, 39 (31), 9351-7.
- Guh, D. P., et al. (2009), 'The incidence of co-morbidities related to obesity and overweight: a systematic review and meta-analysis', *BMC Public Health*, 9, 88.
- Hadzic, A., et al. (2020), 'The Lactate Receptor HCA1 Is Present in the Choroid Plexus, the Tela Choroidea, and the Neuroepithelial Lining of the Dorsal Part of the Third Ventricle', *Int J Mol Sci*, 21 (18).
- Halestrap, A. P. (2012), 'The monocarboxylate transporter family--Structure and functional characterization', *IUBMB Life*, 64 (1), 1-9.
- Halestrap, A. P. and Wilson, M. C. (2012), 'The monocarboxylate transporter family--role and regulation', *IUBMB Life*, 64 (2), 109-19.
- Herrera-Lopez, G. and Galvan, E. J. (2018), 'Modulation of hippocampal excitability via the hydroxycarboxylic acid receptor 1', *Hippocampus*, 28 (8), 557-67.
- Hill, J. W., et al. (2010), 'Direct insulin and leptin action on pro-opiomelanocortin neurons is required for normal glucose homeostasis and fertility', *Cell Metab*, 11 (4), 286-97.
- Hu, J., et al. (2014), 'Glucose rapidly induces different forms of excitatory synaptic plasticity in hypothalamic POMC neurons', *PLoS One*, 9 (8), e105080.
- Huszar, D., et al. (1997), 'Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice', *Cell*, 88 (1), 131-41.

- Ibrahim, N., et al. (2003), 'Hypothalamic proopiomelanocortin neurons are glucose responsive and express K(ATP) channels', *Endocrinology*, 144 (4), 1331-40.
- Itoh, Y., et al. (2003), 'Dichloroacetate effects on glucose and lactate oxidation by neurons and astroglia in vitro and on glucose utilization by brain in vivo', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 (8), 4879-84.
- Ivanov, A. I., et al. (2014), 'Glycolysis and oxidative phosphorylation in neurons and astrocytes during network activity in hippocampal slices', *J Cereb Blood Flow Metab*, 34 (3), 397-407.
- Jackson, R. S., et al. (2003), 'Small-intestinal dysfunction accompanies the complex endocrinopathy of human proprotein convertase 1 deficiency', *J Clin Invest*, 112 (10), 1550-60.
- Jais, A., et al. (2020), 'PNO(ARC) Neurons Promote Hyperphagia and Obesity upon High-Fat-Diet Feeding', *Neuron*, 106 (6), 1009-25 e10.
- Jeong, J. H., Chang, J. S., and Jo, Y. H. (2018), 'Intracellular glycolysis in brown adipose tissue is essential for optogenetically induced nonshivering thermogenesis in mice', *Sci Rep*, 8 (1), 6672.
- Kim, E. R., et al. (2015), 'Hypothalamic Non-AgRP, Non-POMC GABAergic Neurons Are Required for Postweaning Feeding and NPY Hyperphagia', *J Neurosci*, 35 (29), 10440-50.
- Kirk, P., et al. (2000), 'CD147 is tightly associated with lactate transporters MCT1 and MCT4 and facilitates their cell surface expression', *EMBO J*, 19 (15), 3896-904.

- Kishi, T., et al. (2003), 'Expression of melanocortin 4 receptor mRNA in the central nervous system of the rat', *J Comp Neurol*, 457 (3), 213-35.
- Krashes, M. J., et al. (2013), 'Rapid versus delayed stimulation of feeding by the endogenously released AgRP neuron mediators GABA, NPY, and AgRP', *Cell Metab*, 18 (4), 588-95.
- Lam, C. K., et al. (2008), 'Central lactate metabolism regulates food intake', *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 295 (2), E491-6.
- Lambertus, M., et al. (2021), 'L-lactate induces neurogenesis in the mouse ventricular-subventricular zone via the lactate receptor HCA1', *Acta Physiol (Oxf)*, 231 (3), e13587.
- Langlet, F., et al. (2013), 'Tanycytic VEGF-A boosts blood-hypothalamus barrier plasticity and access of metabolic signals to the arcuate nucleus in response to fasting', *Cell Metab*, 17 (4), 607-17.
- Laughton, J. D., et al. (2007), 'Metabolic compartmentalization in the human cortex and hippocampus: evidence for a cell- and region-specific localization of lactate dehydrogenase 5 and pyruvate dehydrogenase', *BMC Neurosci*, 8, 35.
- Lauritzen, K. H., et al. (2014), 'Lactate receptor sites link neurotransmission, neurovascular coupling, and brain energy metabolism', *Cereb Cortex*, 24 (10), 2784-95.
- Lin, R. Y., et al. (1998), 'Human monocarboxylate transporter 2 (MCT2) is a high affinity pyruvate transporter', *J Biol Chem*, 273 (44), 28959-65.

- Liu, C., et al. (2009), 'Lactate inhibits lipolysis in fat cells through activation of an orphan G-protein-coupled receptor, GPR81', *J Biol Chem*, 284 (5), 2811-22.
- Liu, H., et al. (2003), 'Transgenic mice expressing green fluorescent protein under the control of the melanocortin-4 receptor promoter', *J Neurosci*, 23 (18), 7143-54.
- Luquet, S., et al. (2005), 'NPY/AgRP neurons are essential for feeding in adult mice but can be ablated in neonates', *Science*, 310 (5748), 683-5.
- Lyu, P., et al. (2020), 'Unveiling the transcriptome alteration of POMC neuron in diet-induced obesity', *Exp Cell Res*, 389 (1), 111848.
- Ma, K., et al. (2020), 'Lactate enhances Arc/arg3.1 expression through hydroxycarboxylic acid receptor 1-beta-arrestin2 pathway in astrocytes', *Neuropharmacology*, 171, 108084.
- Machler, P., et al. (2016), 'In Vivo Evidence for a Lactate Gradient from Astrocytes to Neurons', *Cell Metab*, 23 (1), 94-102.
- Magni, P., et al. (2009), 'Feeding behavior in mammals including humans', *Ann N Y Acad Sci*, 1163, 221-32.
- Mangmool, S. and Kurose, H. (2011), 'G(i/o) protein-dependent and -independent actions of Pertussis Toxin (PTX)', *Toxins (Basel)*, 3 (7), 884-99.
- Mason, B. L., Wang, Q., and Zigman, J. M. (2014), 'The central nervous system sites mediating the orexigenic actions of ghrelin', *Annu Rev Physiol*, 76, 519-33.

- Mayer, J. (1955), 'Regulation of energy intake and the body weight: the glucostatic theory and the lipostatic hypothesis', *Ann N Y Acad Sci*, 63 (1), 15-43.
- Mercer, A. J., et al. (2013), 'Unraveling the central proopiomelanocortin neural circuits', *Front Neurosci*, 7, 19.
- Meredith, D. and Christian, H. C. (2008), 'The SLC16 monocarboxylate transporter family', *Xenobiotica*, 38 (7-8), 1072-106.
- Mergenthaler, P., et al. (2013), 'Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function', *Trends Neurosci*, 36 (10), 587-97.
- Millan, C., et al. (2010), 'Glial glucokinase expression in adult and post-natal development of the hypothalamic region', *ASN Neuro*, 2 (3), e00035.
- Millington, G. W. (2007), 'The role of proopiomelanocortin (POMC) neurones in feeding behaviour', *Nutr Metab (Lond)*, 4, 18.
- Morland, C., et al. (2017), 'Exercise induces cerebral VEGF and angiogenesis via the lactate receptor HCAR1', *Nat Commun*, 8, 15557.
- Mountjoy, K. G. (2015), 'Pro-Opiomelanocortin (POMC) Neurones, POMC-Derived Peptides, Melanocortin Receptors and Obesity: How Understanding of this System has Changed Over the Last Decade', *J Neuroendocrinol*, 27 (6), 406-18.
- Nuzzaci, D., et al. (2015), 'Plasticity of the Melanocortin System: Determinants and Possible Consequences on Food Intake', *Front Endocrinol (Lausanne)*, 6, 143.

- Nuzzaci, D., et al. (2020), 'Postprandial Hyperglycemia Stimulates Neuroglial Plasticity in Hypothalamic POMC Neurons after a Balanced Meal', *Cell Rep*, 30 (9), 3067-78 e5.
- Offermanns, S. (2017), 'Hydroxy-Carboxylic Acid Receptor Actions in Metabolism', *Trends Endocrinol Metab*, 28 (3), 227-36.
- Orellana, J. A., et al. (2012), 'Glucose increases intracellular free Ca(2+) in tanycytes via ATP released through connexin 43 hemichannels', *Glia*, 60 (1), 53-68.
- Ovens, M. J., et al. (2010), 'The inhibition of monocarboxylate transporter 2 (MCT2) by AR-C155858 is modulated by the associated ancillary protein', *Biochem J*, 431 (2), 217-25.
- Parton, L. E., et al. (2007), 'Glucose sensing by POMC neurons regulates glucose homeostasis and is impaired in obesity', *Nature*, 449 (7159), 228-32.
- Pellerin, L. and Magistretti, P. J. (1994), 'Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91 (22), 10625-9.
- Philp, N. J., et al. (2003), 'Loss of MCT1, MCT3, and MCT4 expression in the retinal pigment epithelium and neural retina of the 5A11/basigin-null mouse', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 44 (3), 1305-11.
- Qi, G., Mi, Y., and Yin, F. (2019), 'Cellular Specificity and Inter-cellular Coordination in the Brain Bioenergetic System: Implications for Aging and Neurodegeneration', *Front Physiol*, 10, 1531.

- Qian, S., et al. (2002), 'Neither agouti-related protein nor neuropeptide Y is critically required for the regulation of energy homeostasis in mice', *Mol Cell Biol*, 22 (14), 5027-35.
- Rau, A. R., Hughes, A. R., and Hentges, S. T. (2018), 'Various transgenic mouse lines to study proopiomelanocortin cells in the brain stem label disparate populations of GABAergic and glutamatergic neurons', *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 315 (1), R144-R52.
- Recabal, A., et al. (2018), 'Connexin-43 Gap Junctions Are Responsible for the Hypothalamic Tanycyte-Coupled Network', *Front Cell Neurosci*, 12, 406.
- Rodriguez, E. M., Blazquez, J. L., and Guerra, M. (2010), 'The design of barriers in the hypothalamus allows the median eminence and the arcuate nucleus to enjoy private milieus: the former opens to the portal blood and the latter to the cerebrospinal fluid', *Peptides*, 31 (4), 757-76.
- Rodriguez, E. M., et al. (2005), 'Hypothalamic tanycytes: a key component of brain-endocrine interaction', *Int Rev Cytol*, 247, 89-164.
- Roman, C. W., Derkach, V. A., and Palmiter, R. D. (2016), 'Genetically and functionally defined NTS to PBN brain circuits mediating anorexia', *Nat Commun*, 7, 11905.
- Roseberry, A. G., et al. (2004), 'Neuropeptide Y-mediated inhibition of proopiomelanocortin neurons in the arcuate nucleus shows enhanced desensitization in ob/ob mice', *Neuron*, 41 (5), 711-22.
- Rossi, J., et al. (2011), 'Melanocortin-4 receptors expressed by cholinergic neurons regulate energy balance and glucose homeostasis', *Cell Metab*, 13 (2), 195-204.

- Salgado, M., et al. (2014), 'Dynamic localization of glucokinase and its regulatory protein in hypothalamic tanycytes', *PLoS One*, 9 (4), e94035.
- Sanchez-Lasheras, C., Konner, A. C., and Bruning, J. C. (2010), 'Integrative neurobiology of energy homeostasis-neurocircuits, signals and mediators', *Front Neuroendocrinol*, 31 (1), 4-15.
- Schreiber, R., Xie, H., and Schweiger, M. (2019), 'Of mice and men: The physiological role of adipose triglyceride lipase (ATGL)', *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 1864 (6), 880-99.
- Schurr, A. and Payne, R. S. (2007), 'Lactate, not pyruvate, is neuronal aerobic glycolysis end product: an in vitro electrophysiological study', *Neuroscience*, 147 (3), 613-9.
- Schwartz, M. W., et al. (2000), 'Central nervous system control of food intake', *Nature*, 404 (6778), 661-71.
- Shi, Y. C., et al. (2013), 'Arcuate NPY controls sympathetic output and BAT function via a relay of tyrosine hydroxylase neurons in the PVN', *Cell Metab*, 17 (2), 236-48.
- Smith, R. S., et al. (2015), 'Differential Muscarinic Modulation in the Olfactory Bulb', *J Neurosci*, 35 (30), 10773-85.
- Song, Z. and Routh, V. H. (2005), 'Differential effects of glucose and lactate on glucosensing neurons in the ventromedial hypothalamic nucleus', *Diabetes*, 54 (1), 15-22.
- Suzuki, A., et al. (2011), 'Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation', *Cell*, 144 (5), 810-23.

- Tang, F., et al. (2014), 'Lactate-mediated glia-neuronal signalling in the mammalian brain', *Nat Commun*, 5, 3284.
- Timper, K. and Bruning, J. C. (2017), 'Hypothalamic circuits regulating appetite and energy homeostasis: pathways to obesity', *Dis Model Mech*, 10 (6), 679-89.
- Tong, Q., et al. (2008), 'Synaptic release of GABA by AgRP neurons is required for normal regulation of energy balance', *Nat Neurosci*, 11 (9), 998-1000.
- Uner, A. G., et al. (2019), 'Role of POMC and AgRP neuronal activities on glycaemia in mice', *Sci Rep*, 9 (1), 13068.
- Uranga, R. M., et al. (2019), 'Author Correction: Adenovirus-mediated suppression of hypothalamic glucokinase affects feeding behavior', *Sci Rep*, 9 (1), 12664.
- Valassi, E., Scacchi, M., and Cavagnini, F. (2008), 'Neuroendocrine control of food intake', *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 18 (2), 158-68.
- van den Pol, A. N., et al. (2019), 'Defining the caudal hypothalamic arcuate nucleus with a focus on anorexic excitatory neurons', *J Physiol*, 597 (6), 1605-25.
- Varela, L. and Horvath, T. L. (2012), 'Leptin and insulin pathways in POMC and AgRP neurons that modulate energy balance and glucose homeostasis', 13 (12), 1079-86.
- Wang, R., et al. (2004), 'The regulation of glucose-excited neurons in the hypothalamic arcuate nucleus by glucose and feeding-relevant peptides', *Diabetes*, 53 (8), 1959-65.
- Wardlaw, S. L. (2011), 'Hypothalamic proopiomelanocortin processing and the regulation of energy balance', *Eur J Pharmacol*, 660 (1), 213-9.

- Wattez, J. S., et al. (2013), 'Perinatal nutrition programs the hypothalamic melanocortin system in offspring', *Horm Metab Res*, 45 (13), 980-90.
- Wilkinson, C. W. (2006), 'Roles of acetylation and other post-translational modifications in melanocortin function and interactions with endorphins', *Peptides*, 27 (2), 453-71.
- Wilson, M. C., et al. (2005), 'Basigin (CD147) is the target for organomercurial inhibition of monocarboxylate transporter isoforms 1 and 4: the ancillary protein for the insensitive MCT2 is EMBIGIN (gp70)', *J Biol Chem*, 280 (29), 27213-21.
- Wilson, M. C., et al. (2013), 'The neuroplastin adhesion molecules are accessory proteins that chaperone the monocarboxylate transporter MCT2 to the neuronal cell surface', *PLoS One*, 8 (11), e78654.
- Wyss, M. T., et al. (2011), 'In vivo evidence for lactate as a neuronal energy source', *J Neurosci*, 31 (20), 7477-85.
- Xu, J., et al. (2018), 'Genetic identification of leptin neural circuits in energy and glucose homeostases', *Nature*, 556 (7702), 505-09.
- Xu, Y., et al. (2010), 'A serotonin and melanocortin circuit mediates D-fenfluramine anorexia', *J Neurosci*, 30 (44), 14630-4.
- Yang, X. J., et al. (1999), 'Hypothalamic glucose sensor: similarities to and differences from pancreatic beta-cell mechanisms', *Diabetes*, 48 (9), 1763-72.
- Yaswen, L., et al. (1999), 'Obesity in the mouse model of pro-opiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin', *Nat Med*, 5 (9), 1066-70.



Zhan, C., et al. (2013), 'Acute and long-term suppression of feeding behavior by POMC neurons in the brainstem and hypothalamus, respectively', *J Neurosci*, 33 (8), 3624-32.

Zhang, X. and van den Pol, A. N. (2016), 'Hypothalamic arcuate nucleus tyrosine hydroxylase neurons play orexigenic role in energy homeostasis', *Nat Neurosci*, 19 (10), 1341-7.

Zhao, C., et al. (2001), 'Expression and distribution of lactate/monocarboxylate transporter isoforms in pancreatic islets and the exocrine pancreas', *Diabetes*, 50 (2), 361-6.

