



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

Participación del receptor de lactato hipotalámico HCAR1 en la regulación de la ingesta de alimentos mediada por neuronas POMC

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

SERGIO AUGUSTO LÓPEZ FONSECA
CONCEPCIÓN, CHILE
2026

Profesora guía de tesis: Dra. María de los Ángeles García Robles
Dpto. de Biología Celular, Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Profesor guía de tesis: Dr. Roberto Javier Elizondo Vega
Dpto. de Biología Celular, Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Esta tesis fue realizada en el Departamento de Biología Celular, perteneciente a la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción
Profesores integrantes de la Comisión Evaluadora:

Dra. María de los Ángeles García
Profesora guía de tesis
Universidad de Concepción

Dr. Roberto Elizondo Vega
Profesor guía de tesis
Universidad de Concepción

Dra. Amparo Uribe Pérez
Profesora evaluadora interna
Universidad de Concepción

Dr. Luis Aguayo
Profesor evaluador interno
Universidad Adolfo Ibáñez

Dra. Eugenia Morselli
Profesora evaluadora externa
Universidad San Sebastián

Dra. Marcela Torrejón Quezada
Directora del programa
Universidad de Concepción

Tesis de doctorado financiada por:
Proyecto FONDECYT regular # 1221508 (2022-2025).
Beca ANID de doctorado nacional (2021-2025).

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado gracias al financiamiento otorgado por ANID, a través de los proyectos Fondecyt regular y la beca de doctorado nacional, junto a sus beneficios complementarios.

En primer lugar, quiero agradecer a mis tutores, la Dra. María de los Ángeles y el Dr. Roberto, quienes me han orientado en este camino de investigación y, además, han sido científicos y personas ejemplares para mí. Gracias por su disposición para reunirme a discutir, festejar y recordar los distintos momentos que vivimos como grupo durante estos años. Agradezco al Dr. Ricardo Araneda, quien me recibió de pasantía en la Universidad de Maryland y me enseñó lo necesario para realizar la electrofisiología y estudios de calcio en esta tesis. También un sincero agradecimiento a los diferentes miembros que han estado, están y seguirán estando en este lindo grupo de trabajo que es BioCel, de quienes pude aprender y compartir en distintas instancias: Vinka, Alanis, Antonia, Alejandra, Andrés V, Andrés R, Raúl, Vania, Francisca, Danitza, Marcela y Sara. Gracias por soportarme y por reírse tanto.

Adicionalmente, quiero agradecerle a mi familia: Gladys, César y Santiago, por seguir apoyándome a la distancia, por atreverse a venir a visitarme y conocer Chile, pero, sobre todo, por compartir mi felicidad y mi tristeza cuando más lo necesité en este proceso. Gracias por seguir siendo inspiración y motivación para alcanzar momentos como este. Finalmente le quiero agradecer a Valentina Paz por haber sido el apoyo más grande e importante en este camino. Gracias por darme tranquilidad, por escucharme, por tener paciencia y por organizarme la vida en los momentos más álgidos de este doctorado; en los días buenos, pero, sobre todo, en los malos.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
ABREVIATURAS.....	ix
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT.....	xvi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. Generalidades de la regulación de la ingesta de alimentos.....	1
2. Relación fisiológica entre obesidad y homeostasis energética.....	3
3. El hipotálamo como centro regulador de la ingesta de alimentos y otros núcleos cerebrales involucrados.....	5
3.1 Señales hormonales que modulan la ingesta de alimentos en el hipotálamo..	6
3.2 Detección de otras señales nutricionales y metabólicas en el hipotálamo	10
3.3 Metabolismo de glucosa y transporte de lactato en el hipotálamo.....	12
3.4 Lactato como molécula de señalización intercelular en el hipotálamo.....	14
4. Neuronas POMC: integración neuroendocrina y control de la ingesta.....	16

5. Contribución de los tanicitos en el sensing de glucosa y regulación de la ingesta de alimentos	18
5.1 Dinámica de formación del complejo GK/GKRP en el glucosensing hipotalámico	21
6. Participación de astrocitos hipotalámicos en la interacción tanicito-neurona.....	22
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	29
III. HIPÓTESIS	32
IV. OBJETIVOS.....	32
Objetivo general.....	32
Objetivos específicos.....	32
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
1. Animales experimentales y declaración bioética	33
2. Cirugía estereotáxica	33
3. Imágenes de calcio y registros de patch clamp en rebanadas	34
4. Cultivo primario de tanicitos	36
5. Cultivo primario de astrocitos.....	37
6. Cuantificación de lactato y glutamato	38
7. Captación de DAPI e imágenes de calcio in vitro	38
8. Inmunofluorescencia	39
9. Hibridación in situ.....	41

10.	RT-PCR (transcripción reversa y PCR cuantitativo).....	43
11.	Análisis de imágenes y análisis estadístico.....	45
VI.	RESULTADOS.....	47
1.	Localización del receptor de lactato HCAR1 en cerebro y tejido adiposo.....	47
2.	Distribución de HCAR1 en hipocampo e hipotálamo de ratón.	51
3.	Evaluación de la expresión y funcionalidad de HCAR1 en cultivos primarios de astrocitos hipotalámicos.	58
4.	Modulación de la producción y liberación de lactato en cultivos de tanicitos.....	63
5.	La modulación del lactato derivado de tanicitos altera la activación de calcio en astrocitos hipotalámicos dependiente de HCAR1	66
6.	Liberación de glutamato inducida por la activación de HCAR1 en cultivos de astrocitos hipotalámicos.	70
7.	Identificación de células en ARC sensibles a la activación de HCAR1	75
8.	Modulación de la dinámica intracelular de calcio mediada por la activación de HCAR1 en astrocitos del ARC.....	81
9.	Activación astrogliol dependiente de HCAR1 tras metabolismo glucolítico en tanicitos.....	92
10.	Estimulación de HCAR1 en astrocitos incrementa la excitabilidad de neuronas POMC en rebanadas hipotalámicas	95

11. Identificación y caracterización de corrientes lentas de entrada o slow inward currents (SICs) en neuronas POMC.....	101
12. La activación astrogliar de HCAR1 modula la generación de SICs en neuronas POMC.....	106
13. Modulación dependiente del tiempo de las SICs por HCAR1 astrogliar sobre neuronas POMC.....	110
VII. DISCUSIÓN.....	116
1. La distribución del receptor de lactato HCAR1 en el hipocampo y el hipotálamo es principalmente glial.....	116
2. El lactato derivado de tanicitos activa HCAR1 astrogliar estimula la gliotransmisión a través de hemicanales.....	124
3. El silenciamiento astrogliar de HCAR1 reduce la magnitud y sincronía de las respuestas de Ca^{2+}	127
4. La activación de la señalización metabólica local tanicito-astrocito-neurona POMC es dependiente de HCAR1.....	132
5. El lactato potencia la gliotransmisión hacia neuronas POMC al aumentar la frecuencia de corrientes lentas de origen astrogliar.....	136
6. La activación de HCAR1 astrogliar aumenta la frecuencia y modula la dinámica temporal de SICs en neuronas POMC.....	137
VIII. CONCLUSIONES.....	144
IX. REFERENCIAS.....	146

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Integración hipotalámica de señales relacionadas con la alimentación en el control metabólico.....	9
Figura 2. Activación de astrocitos vía Gi DREADDs induce slow inward currents en neuronas.....	24
Figura 3. Señalización astrocito–neurona en la sinapsis tripartita.....	26
Figura 4. Mecanismos subyacentes a los aumentos de calcio intracelular y la liberación de gliotransmisores desde los astrocitos.....	27
Figura 5. Representación esquemática de la interacción metabólica hipotalámica glía-neurona.....	31
Figura 6. HCAR1 se localiza ampliamente en tejido adiposo y en astrocitos del hipocampo de ratón.....	49
Figura 7. Detección del ARNm de Hcar1 en el núcleo arqueado (ARC) mediante hibridación in situ.....	50
Figura 8. Localización de HCAR1 en el hipocampo de ratones POMC-GFP.....	52
Figura 9. Distribución de HCAR1 en el hipotálamo de ratones POMC-GFP y NPY-GFP.....	57
Figura 10. Estandarización del cultivo primario de astrocitos hipotalámicos.....	60
Figura 11. Expresión y localización de HCAR1 en astrocitos del núcleo arqueado.....	61
Figura 12. Activación funcional de HCAR1 en astrocitos hipotalámicos.....	63

Figura 13. Inhibición selectiva de proteínas relacionadas con el metabolismo glucolítico en cultivos primarios de tanicitos.	65
Figura 14. Activación de astrocitos hipotalámicos inducida por medios condicionados de tanicitos (T ^{CM}).	70
Figura 15. Efecto de la activación de HCAR1 sobre la liberación de glutamato en astrocitos hipotalámicos mediado por hemicanales de Cx43.	74
Figura 16. La activación de HCAR1 incrementa la dinámica de calcio en células del ARC, en rebanadas hipotalámicas.	77
Figura 17. Activación secuencial de HCAR1 revela ausencia de desensibilización en células del ARC.	80
Figura 18. Evaluación de la expresión de GcaMP6f y el silenciamiento de HCAR1 en astrocitos del ARC mediado por AAVs.	82
Figura 19. El silenciamiento de HCAR1 en astrocitos del ARC reduce la proporción y magnitud de activación por L-Lactato.	85
Figura 20. El silenciamiento de HCAR1 disminuye la proporción de astrocitos activados por 3Cl-HBA en el ARC.	88
Figura 21. El silenciamiento de HCAR1 disminuye la activación astrogliar inducida por D-Lactato en el ARC.	91
Figura 22. La activación de astrocitos del ARC inducida por la perfusión de glucosa en tanicito único depende de la expresión de HCAR1.	94
Figura 23. Validación del modelo para realizar registros simultáneos de actividad en astrocitos y neuronas POMC.	97

Figura 24. Efecto de la activación de HCAR1 astroglial sobre la excitabilidad de neuronas POMC.	101
Figura 25. Caracterización de SICs y comparación con EPSCs en neuronas POMC.	103
Figura 26. L-Lactato incrementa la frecuencia de SICs en neuronas POMC dependiente de activación de los receptores NMDA.	105
Figura 27. HCAR1 en astrocitos modula la frecuencia de SICs inducidas por agonistas en neuronas POMC.	109
Figura 28. HCAR1 en astrocitos controla la progresión temporal de las SICs en neuronas POMC.	115
Figura 29. Modelo propuesto de interacción metabólica tanicito-astrocito-neurona POMC involucrando la activación de HCAR1 astroglial por lactato.....	143

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Anticuerpos primarios empleados en inmunofluorescencia.....	40
Tabla 2. Anticuerpos primarios empleados en inmunofluorescencia.....	41
Tabla 3. Partidores utilizados en RT-qPCR.	44

ABREVIATURAS

3V	: tercer ventrículo
3Cl-HBA	: ácido 3-cloro-5-hidroxibenzoico
4-CIN	: α -ciano-4-hidroxicinamato
AAV	: adenovirus asociado
Ad	: adenovirus
ADN	: ácido desoxirribonucleico
ADNc	: AND complementario
ADP	: adenosin difosfato
AgRP	: péptido relacionado con Agouti
AKT	: proteína quinasa B (PKB)
AMPc	: adenosín monofosfato cíclico
AMPK	: proteína quinasa activada por adenosín monofosfato
ARC	: núcleo arqueado del hipotálamo
ARN	: ácido ribonucleico
ATP	: adenosín trifosfato
AUC	: área bajo la curva
BEST1	: canales de bestrofina 1
BHE	: barrera hematoencefálica
Ca ²⁺	: calcio iónico
[[Ca ²⁺] _i]	: concentración de calcio intracelular
CaCl ₂	: cloruro de calcio
CART	: transcrito regulado por anfetamina y cocaína

CCK	: colecistoquinina
CD31	: grupo de diferenciación 31
Crabp1	: proteína 1 de unión al ácido retinoico celular
CSF	: líquido cefalorraquídeo
-Ctrl	: control negativo
Cx43	: conexina 43
D-AP5	: ácido D-2-amino-5-fosfonovalérico
DAPI	: 4',6-diamidino-2-fenilindol
DMEM	: medio eagle modificado de Dulbeco
DMH	: hipotálamo dorsomedial
DREADD	: receptores diseñados y activados exclusivamente por drogas diseñadas
EDTA	: ácido etilendiamin tetra-acético
EGFP	: proteína verde fluorescente mejorada
EPSC	: corrientes postsinápticas excitatorias
ERK	: quinasa regulada por señales extracelulares
FACS	: <i>sorteo</i> de células activadas por fluorescencia
FBS	: suero bovino fetal
FGF21	: factor de crecimiento de fibroblastos 21
GABA	: ácido γ -aminobutírico
GCaMP6f	: indicador de calcio genéticamente codificado
GE	: excitado por glucosa
GFAP	: proteína fibrilar ácida

GFP	: proteína verde fluorescente
GI	: inhibido por glucosa
G _i -GPCR	: receptor acoplado a proteína G inhibitoria
GK	: glucoquinasa
GKRP	: proteína reguladora de la glucoquinasa
GLUT1	: transportador de glucosa 1
GLUT2	: transportador de glucosa 2
GLP-1	: péptido 1 tipo glucagón
HBSS	: solución salina balanceada de Hank
HCAR1	: receptor de ácido hidroxicarboxílico 1
HCl	: ácido clorhídrico
HEPES	: ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazin etanosulfónico
Hm-Cx	: hemicanales de conexinas
Iba1	: molécula adaptadora de unión a calcio 1
icv	: intracerebroventricular
IP ₃	: inositol 1,4,5-trifosfato
IMC	: índice de masa corporal
K _{ATP}	: canales de potasio sensibles a ATP
KCl	: cloruro de potasio
KD	: <i>Knock-down</i>
KO	: <i>Knock-out</i>
KOH	: hidróxido de potasio
LDH	: lactato deshidrogenasa

LepR	: receptor de leptina
LHA	: área lateral hipotalámica
MCR	: receptor de melanocortina
MCT	: transportador de monocarboxilatos
ME	: eminencia media
Mg ²⁺	: magnesio iónico
MgCl ₂	: cloruro de magnesio
mTOR	: blanco mecanístico de rapamicina
NADH	: nicotinamida dinucleótido reducida
NaCl	: cloruro de sodio
Na ₂ HPO ₄	: fosfato ácido de sodio
NMDA	: N-metil-D-aspartato
NPY	: neuropéptido Y
NVM	: núcleo ventromedial
PCR	: reacción en cadena de la polimerasa
PDH	: piruvato deshidrogenasa
PFA	: paraformaldehido
PI3K	: fosfatidil inositol 3 quinasa
PKA	: proteína quinasa A
POMC	: pro-opiomelanocortina
PVN	: núcleo paraventricular
PYY	: péptido YY
RFP	: proteína fluorescente roja

RT-qPCR	: transcripción inversa y PCR cuantitativo
ROI	: región de interés
SEM	: error estándar de la media
shRNA	: ARN de horquilla corta
siRNA	: ARN de interferencia pequeño
SD	: desviación estándar
SIC	: corrientes lentas de entrada
SNC	: sistema nervioso central
T ^{CM}	: medio condicionado de tanicitos
u.a.	: unidades arbitrarias
VEGFA	: factor de crecimiento endotelial vascular A
V _m	: potencial de membrana
VMH	: hipotálamo ventromedial
WT	: tipo salvaje
α-MSH	: hormona estimulante de melanocitos alfa

RESUMEN

La obesidad es una epidemia global resultante del desbalance energético crónico, cuya regulación depende críticamente de la capacidad del hipotálamo para detectar nutrientes circulantes. El núcleo arqueado (ARC) en el hipotálamo alberga las neuronas pro-opiomelanocortina (POMC), que promueven la saciedad y aumentan el gasto energético. Si bien, se ha demostrado que el lactato producido y liberado por tanicitos en respuesta a glucosa, incrementa la excitabilidad de las neuronas POMC, en un mecanismo que involucra su transporte, se desconoce su rol como molécula señalizadora intercelular. A pesar de que el lactato activa estas neuronas, carecen del receptor de lactato HCAR1, que sí se expresa en astrocitos hipotalámicos. Esta tesis investigó si el lactato producido por tanicitos promueve la activación de HCAR1 en astrocitos hipotalámicos, incrementando la actividad de neuronas POMC.

Confirmamos la expresión de HCAR1 en una subpoblación de astrocitos del ARC y células endoteliales empleando inmunofluorescencia e hibridación *in situ*, e identificamos novedosamente su expresión en neuronas NPY, a través de citometría de flujo. Por medio de imágenes de calcio *in vitro* e *in situ*, demostramos que L-Lactato, D-Lactato y el agonista farmacológico 3CI-HBA activan HCAR1 en astrocitos, induciendo incrementos robustos en la concentración de calcio intracelular a través de una vía no canónica. Esta respuesta de calcio desencadenó la liberación de glutamato, proceso conocido como gliotransmisión, mediada parcialmente por la apertura de hemicanales de conexina 43, proceso que fue suprimido por el silenciamiento génico de HCAR1 (siRNA/shRNA) o el bloqueo de hemicanales. En experimentos *in situ* de

patch-clamp en neuronas POMC, la estimulación con lactato incrementó la frecuencia de corrientes lentas (SICs), asociadas a gliotransmisión. Estos eventos fueron bloqueados por el antagonista de receptores NMDA, D-AP5, mientras que el silenciamiento específico de HCAR1 en astrocitos, redujo significativamente la frecuencia de SICs *in situ*. Además, demostramos un acoplamiento funcional en el que la perfusión de glucosa en un tanicito único indujo ondas de calcio en astrocitos adyacentes, de manera dependiente de HCAR1 astrogliar.

En conclusión, estos hallazgos establecen un nuevo circuito de integración metabólica en el ARC, donde el lactato liberado por tanicitos no solo activa directamente a las neuronas POMC, sino que también actúa por un mecanismo indirecto que involucra la gliotransmisión glutamatérgica extrasináptica inducida por la activación de HCAR1 en astrocitos del ARC. Este mecanismo revela un rol activo y regulatorio de la glía en la homeostasis energética y posiciona al receptor HCAR1 como un blanco potencial para el tratamiento de desórdenes metabólicos.

ABSTRACT

Obesity is a global epidemic resulting from chronic energy imbalance, the regulation of which critically depends on the hypothalamus's ability to sense circulating nutrients. The arcuate nucleus (ARC) of the hypothalamus houses pro-opiomelanocortin (POMC) neurons, which promote satiety and increase energy expenditure. Although it has been demonstrated that lactate, produced and released by tanycytes in response to glucose, increases the excitability of POMC neurons through a transport-dependent mechanism, its role as an intercellular signaling molecule remains unknown. Despite lactate's ability to activate these neurons, they lack the lactate receptor HCAR1, which is expressed in hypothalamic astrocytes. This thesis investigated whether tanycyte-derived lactate promotes HCAR1 activation in hypothalamic astrocytes, thereby increasing POMC neuron activity.

Using immunofluorescence and *in situ* hybridization, we confirmed HCAR1 expression in a subpopulation of ARC astrocytes and endothelial cells; notably, we also identified its expression in NPY neurons using flow cytometry. Through *in vitro* and *in situ* calcium imaging, we demonstrated that L-lactate, D-lactate, and the pharmacological agonist 3CI-HBA activate HCAR1 in astrocytes, inducing robust increases in intracellular calcium concentration via a non-canonical pathway. This calcium response triggered glutamate release, a process known as gliotransmission, partially mediated by the opening of connexin 43 hemichannels. This process was suppressed by HCAR1 gene silencing (siRNA/shRNA) or hemichannel blockade. In *in situ* patch-clamp experiments on POMC neurons, lactate stimulation increased the frequency of slow inward currents

(SICs) associated with gliotransmission. These events were blocked by the NMDA receptor antagonist D-AP5, while astrocyte-specific HCAR1 silencing significantly reduced the frequency of SICs *in situ*. Furthermore, we demonstrated a functional coupling in which glucose perfusion into a single tanycyte induced calcium waves in adjacent astrocytes in an astrocyte-HCAR1-dependent manner.

In conclusion, these findings establish a novel metabolic integration circuit in the ARC, where lactate released by tanycytes not only directly activates POMC neurons but also acts through an indirect mechanism involving extrasynaptic glutamatergic gliotransmission induced by HCAR1 activation in ARC astrocytes. This mechanism reveals an active regulatory role for glia in energy homeostasis and positions the HCAR1 receptor as a potential target for the treatment of metabolic disorders.

I. INTRODUCCIÓN

1. Generalidades de la regulación de la ingesta de alimentos

La ingesta de alimentos es un proceso regulado por la interacción entre mecanismos homeostáticos, orientados a mantener el balance energético y mecanismos hedónicos asociados al placer y la recompensa (Rossi & Stuber, 2018). En el control homeostático, el sistema nervioso central (SNC), en particular el hipotálamo, integra señales hormonales y metabólicas que informan sobre la disponibilidad de nutrientes y el estado de las reservas energéticas, generando respuestas que promueven o inhiben la ingesta. En paralelo, los circuitos de recompensa modulan el comportamiento alimentario en función del valor motivacional de los alimentos, favoreciendo el consumo de alimentos altamente palatables aun en ausencia de necesidad metabólica (Castro et al., 2015).

El mantenimiento del equilibrio entre la energía ingerida y la gastada es esencial para la estabilidad del peso corporal. Un balance energético positivo sostenido favorece el desarrollo del sobrepeso y obesidad, condición asociada a una mayor morbimortalidad y a comorbilidades metabólicas, como la diabetes mellitus tipo 2 y la enfermedad cardiovascular (GBD Obesity Collaborators, 2017; Guh et al., 2009). Comprender cómo el organismo detecta nutrientes circulantes y traduce esa

información en respuestas neuronales constituye, por tanto, un objetivo central de la fisiología metabólica.

Además de señales hormonales clásicas como leptina, insulina y grelina, en los últimos años ha tomado relevancia la identificación de metabolitos capaces de actuar como señales tanto periféricas como centrales. Entre ellos, el lactato ha emergido no solo como un sustrato energético, sino también como molécula señalizadora a través su receptor acoplado a proteína G, HCAR1 (del inglés *Hydroxycarboxylic Acid Receptor 1*), expresado en diversas poblaciones celulares del SNC. La activación de HCAR1 permite acoplar el estado metabólico y especialmente el metabolismo glucolítico, a cambios en la actividad neuronal, lo que lo posiciona como un potencial modulador del control hipotalámico de la ingesta.

Funcionalmente, la regulación de la alimentación puede analizarse en términos de hambre (impulso para iniciar la ingesta), saciación (procesos que determinan su terminación) y saciedad (mecanismos postprandiales que regulan el intervalo entre comidas) (Cifuentes & Acosta, 2022). Estos estados reflejan la integración dinámica de señales endocrinas neurales y metabólicas dentro de circuitos hipotalámicos, donde la comunicación neuroglial y la señalización por metabolitos emergen como componentes críticos.

2. Relación fisiológica entre obesidad y homeostasis energética

La obesidad se define como un aumento del peso corporal producido por un incremento del tejido adiposo en una magnitud suficiente para generar efectos adversos en la salud (Spiegelman & Flier, 2001). Su incremento a nivel poblacional se explica por la interacción entre predisposición genética y un entorno obesogénico, caracterizado por la abundante disponibilidad de alimentos densos en energía y altamente palatables (ricos en azúcares, grasas y sal), bajo costo, facilidad de acceso y preparación, además de factores psicológicos como el estrés y ansiedad, y un estilo de vida progresivamente sedentario (Woods, 2009). En línea con estos cambios ambientales, se ha descrito un aumento marcado en la disponibilidad y consumo de azúcares añadidos, principalmente sacarosa, observándose una duplicación en los últimos treinta años (Jürgens et al., 2005).

En Chile, la magnitud del problema es especialmente relevante: estimaciones recientes sitúan a 42% de la población adulta viviendo con obesidad en 2025 y a 83% con IMC elevado (≥ 25 kg/m²) (World Obesity Federation., 2025). En el ámbito de políticas públicas, en el año 2014 la reforma tributaria modificó el Impuesto Adicional a las Bebidas Azucaradas (IABA), incrementando la tasa para bebidas con 6.25 g de azúcar añadida/100 mL y disminuyéndolas para las de menor contenido (Nakamura et al., 2018). Evaluaciones basadas en datos de compra han reportado una disminución de 21,6 % en el volumen mensual adquirido de bebidas azucaradas, con una reducción más evidente en sectores socioeconómicos medios y altos (Fuster et al., 2021).

Desde el punto de vista fisiológico, la obesidad se relaciona principalmente con un balance energético positivo crónico, es decir, una ingesta calórica que excede de forma

sostenida el gasto energético. Este desequilibrio refleja una alteración de la homeostasis energética, entendida como el conjunto de mecanismos que ajustan ingesta, gasto y almacenamiento, para mantener relativamente estables las reservas corporales. Órganos periféricos como estómago, páncreas e hígado, participan activamente en este control al producir, utilizar y almacenar sustratos energéticos, además de liberar señales hormonales (greлина, leptina e insulina) que informan al sistema nervioso central sobre el estado nutricional (Balland et al., 2019; Mason et al., 2014; Schwartz et al., 2000). Estas señales, junto con cambios postprandiales en la concentración de metabolitos circulantes, son integradas por el cerebro para promover respuestas orexigénicas (hambre) o anorexigénicas (saciedad), modulando el apetito y la conducta alimentaria. Entre los nutrientes señalizadores, la glucosa destaca como sustrato central para el cerebro (Mergenthaler et al., 2013) y como señal capaz de modular poblaciones neuronales sensibles a variaciones en su concentración, concepto clásico propuesto en el marco de la “hipótesis glucoestática” (Mayer, 1955). No obstante, el cerebro puede utilizar sustratos alternativos a la glucosa, tales como lactato, ácidos grasos y cuerpos cetónicos, cuando la disponibilidad de glucosa es baja (Cunnane et al., 2011).

A nivel de circuitos, la homeostasis energética cerebral involucra principalmente redes del hipotálamo mediobasal y del complejo dorsal vagal, además de otras áreas que integran señales metabólicas y hormonales periféricas para regular el comportamiento alimentario (Marty et al., 2007; Mobbs et al., 2013). Por ello, el hipotálamo se ha consolidado como un nodo clave para comprender la fisiopatología de la obesidad y para orientar estrategias preventivas o terapéuticas dirigidas a

restaurar el control del balance energético (Schwartz et al., 2000; Simpson et al., 2009).

3. El hipotálamo como centro regulador de la ingesta de alimentos y otros núcleos cerebrales involucrados

El hipotálamo es un centro integrador que coordina señales metabólicas, hormonales y neuronales para regular el metabolismo y múltiples funciones fisiológicas, incluyendo presión arterial, temperatura corporal, conducta sexual, conducta alimentaria y ritmo circadiano (Cornejo et al., 2016). En este contexto, distintas poblaciones neuronales hipotalámicas integran información periférica (hormonas y metabolitos circulantes), permitiendo ajustar la ingesta y el gasto energético de manera dinámica (Magni et al., 2009).

Funcionalmente, el hipotálamo se organiza en núcleos con conexiones específicas. Entre los principales núcleos implicados en la regulación de la ingesta se encuentran en su zona ventromedial (VMH) el núcleo arqueado (ARC) y el núcleo ventromedial (NVM), el núcleo dorsomedial (DMH), el núcleo paraventricular (PVN) y el área hipotalámica lateral (LHA) (Elizondo-Vega et al., 2015; Millhouse, 1973). El núcleo arqueado del hipotálamo (ARC) constituye un centro clave en la regulación del balance energético y la homeostasis metabólica. Las poblaciones neuronales más caracterizadas en esta región corresponden a las neuronas anorexigénicas que coexpresan proopiomelanocortina (POMC) y el transcrito regulado por amfetamina y cocaína (CART), y a las neuronas orexigénicas que coexpresan neuropéptido Y (NPY) y proteína relacionada con agutí (AgRP), cuya actividad funcional antagónica permite

modular finamente la ingesta y el gasto energético (Cowley et al., 2001; Schwartz, 1997; Schwartz et al., 1996).

Sin embargo, esta organización no se limita exclusivamente a estos dos circuitos clásicos. El ARC alberga además otras poblaciones neuronales relevantes, incluyendo neuronas que expresan prepronociceptina (PNOC), neuronas somatostatina (SST), neuronas tiroxina hidroxilasa (TH), neuronas glutamatérgicas y subpoblaciones que expresan el receptor de oxitocina, las cuales participan en la integración de señales metabólicas, hormonales y conductuales (Fig. 1). Estas poblaciones se encuentran funcionalmente interconectadas y contribuyen a la complejidad del control hipotalámico del metabolismo (Solheim et al., 2025).

A su vez, estas neuronas no operan de manera aislada, sino que están insertas en una red neuroglial altamente organizada. En este contexto, los astrocitos y los procesos especializados de los tanicitos desempeñan un papel estructural y funcional fundamental, regulando la disponibilidad de metabolitos, la señalización paracrina y la excitabilidad neuronal. La interacción dinámica entre neuronas y células gliales amplía la comprensión del núcleo arqueado, que debe concebirse como una unidad neuroglial integrada más que como un simple conjunto de circuitos neuronales antagónicos (Brüning & Fenselau, 2023; Campbell et al., 2017).

3.1 Señales hormonales que modulan la ingesta de alimentos en el hipotálamo

La regulación homeostática de la alimentación depende en gran medida de señales hormonales que comunican el estado energético del organismo al SNC, en particular al ARC del hipotálamo, donde neuronas especializadas ajustan la ingesta y el gasto

energético mediante mecanismos de retroalimentación. Dentro de estas señales se incluyen leptina (tejido adiposo), insulina (páncreas), grelina (estómago) y las incretinas intestinales, particularmente el péptido 1 similar al glucagón (GLP-1) y el polipéptido insulínico dependiente de glucosa (GIP), cuyos receptores se expresan en neuronas del ARC (Belgardt et al., 2009; Wen et al., 2019) (Fig. 1). Cabe destacar que, en los últimos años, los receptores de GLP-1 y GIP han adquirido especial relevancia clínica debido al desarrollo de agonistas y coagonistas utilizados en el tratamiento farmacológico de la obesidad y la diabetes tipo 2, lo que subraya la importancia fisiológica y terapéutica de estas vías de señalización.

Dentro de este marco, el sistema de melanocortina constituye una vía central en el control de la ingesta. En condiciones de baja disponibilidad energética, aumentan las señales orexigénicas como grelina y se favorece la activación de neuronas NPY/AgRP, promoviendo el inicio y mantenimiento de la alimentación. Por el contrario, señales asociadas a balance energético positivo, como leptina e insulina, tienden a inhibir NPY/AgRP y a activar neuronas POMC/CART, reduciendo la ingesta y modulando el gasto energético (Fig. 1) (Brüning & Fenselau, 2023; Wen et al., 2019). En este contexto, leptina e insulina funcionan como indicadores del estado energético a largo plazo, puesto que sus niveles circulantes se correlacionan con la masa grasa y el estado nutricional general.

Adicionalmente, existen señales de corto plazo originadas en el tracto gastrointestinal que contribuyen a controlar principalmente el tamaño de cada comida (Morton et al., 2014; Valassi et al., 2008). La grelina es la única hormona periférica con efecto orexigénico robusto; se eleva antes de la ingesta y activa neuronas NPY/AgRP,

facilitando el inicio de la alimentación (Cifuentes & Acosta, 2022). En contraste, GLP-1 y PYY se liberan tras la ingesta y actúan como potentes anorexigénicos, disminuyendo el consumo posterior (Valassi et al., 2008). Por su parte, la colecistoquinina (CCK) se libera en respuesta a grasas y proteínas, y promueve señales de saciedad, en parte mediadas por aferencias vagales hacia el SNC (Simpson et al., 2009).

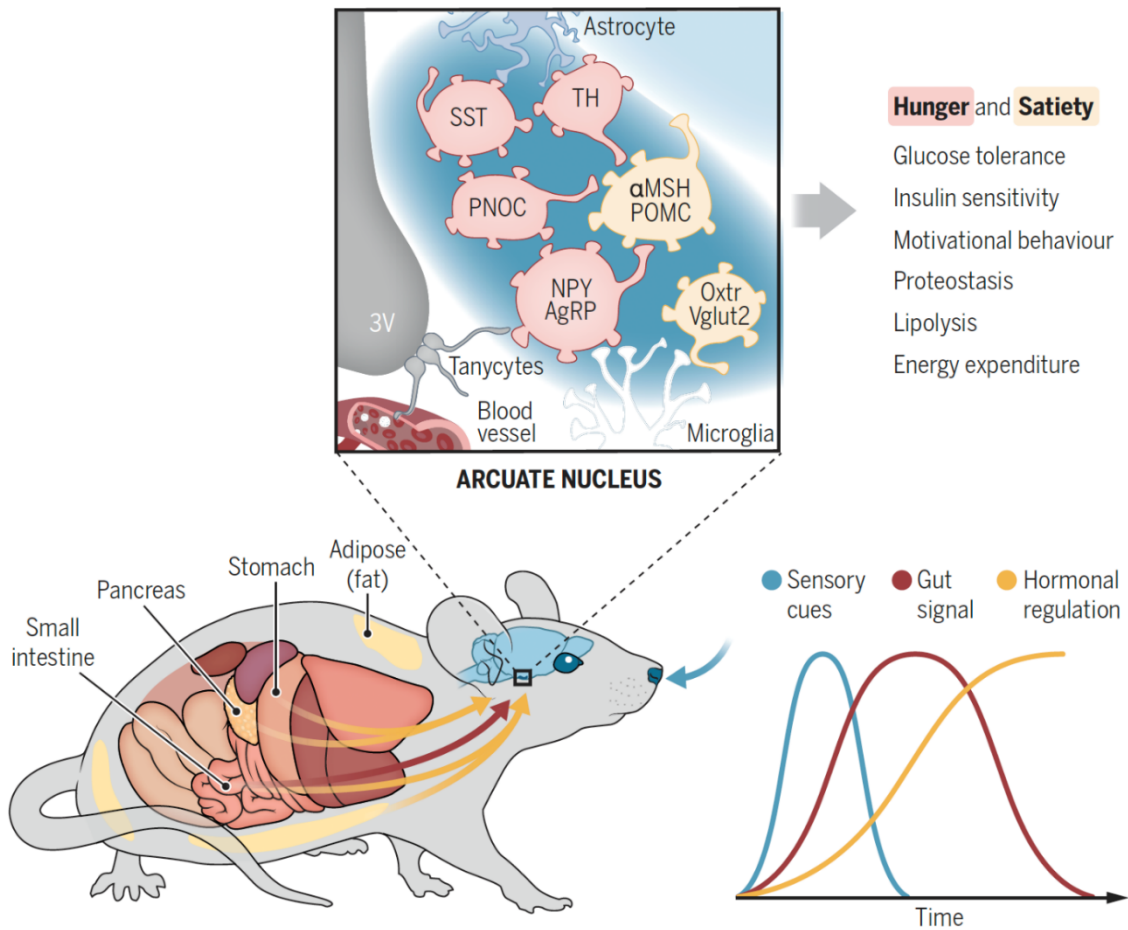


Figura 1. Integración hipotalámica de señales relacionadas con la alimentación en el control metabólico.

Los circuitos hipotalámicos que regulan el hambre y la saciedad integran señales relacionadas con los nutrientes en distintas escalas temporales: (i) durante la percepción sensorial de los alimentos (líneas azules), (ii) señales post-ingestivas derivadas del intestino (líneas rojas) y (iii) señales hormonales que reflejan el estado energético del organismo (líneas amarillas). Además de regular la ingesta, estos neurocircuitos coordinan respuestas fisiológicas y conductuales en tejidos periféricos de acuerdo con el estado energético del organismo. Tomado de (Brüning & Fenselau, 2023).

3.2 Detección de señales nutricionales y metabólicas en el hipotálamo

Además de integrar señales hormonales, el hipotálamo puede detectar cambios en metabolitos presentes tanto en el líquido cefalorraquídeo (CSF, del inglés *cerebrospinal fluid*) como en la circulación sanguínea. Esto se relaciona con la organización vascular del área hipotalámica: la eminencia media (ME, del inglés *median eminence*) contiene abundantes capilares fenestrados, mientras que el parénquima hipotalámico presenta capilares no fenestrados (Burdakov et al., 2005; Elizondo-Vega et al., 2015; Levin et al., 2004).

En rebanadas hipotalámicas, registros electrofisiológicos identificaron células que modifican su actividad eléctrica en función de la glucosa extracelular, revelando neuronas especializadas con respuestas opuestas a esta señal (Yoshimatsu et al., 1984). Bajo condiciones experimentales, las neuronas activadas por concentraciones altas de glucosa (15-20 mM), se denominaron *glucose-excited* (GE), mientras que aquellas activadas por concentraciones bajas (1-5 mM) se denominaron *glucose-inhibited* (GI) (Yang et al., 1999). En el hipotálamo, se ha descrito que las neuronas GE se distribuyen preferentemente hacia el ARC lateral, mientras que las neuronas GI predominan hacia el ARC medial (Wang et al., 2004).

Sin embargo, la disponibilidad real de metabolitos para las neuronas hipotalámicas está modulada por barreras de difusión. Aun cuando la ME ofrece un entorno vascular más permeable, gran parte del parénquima hipotalámico permanece protegido por la barrera hematoencefálica (BHE) y por la barrera CSF–parénquima, conformada por tanicitos que delimitan las paredes y el piso del tercer ventrículo (3V) (Rodríguez et al., 2005). En este escenario, se propone que células gliales especializadas,

particularmente los tanicitos, actúan como sensores metabólicos, traduciendo señales del CSF o de nichos vasculares más permeables hacia circuitos neuronales del ARC (Elizondo-Vega et al., 2015; Levin et al., 2004).

La detección central de lípidos y aminoácidos también contribuye de forma relevante al balance energético, frecuentemente vinculado con mecanismos anorexigénicos. Por ejemplo, la administración central de ácidos grasos de cadena larga (como ácido oleico) reduce la ingesta y modula la producción de glucosa hepática, fenómeno asociado a cambios en la expresión de neuropéptidos del ARC (Simpson et al., 2009; Wen et al., 2019). Asimismo, el eje melanocortinérgico (POMC/AgRP) participa en la regulación del metabolismo lipídico periférico y en la movilización de grasas mediante el control simpático.

A nivel molecular, se ha descrito que el metabolismo lipídico hipotalámico involucra enzimas sensoras/reguladoras como AMPK, FAS y ACC, con alta expresión en ARC, PVN y VMN (Diéguez et al., 2011). En paralelo, la L-leucina destaca como señal de saciedad: su administración intracerebroventricular en el 3V reduce la ingesta en ratas (Cota et al., 2006). Este efecto se asocia a la activación de mTOR (del inglés *mammalian target of rapamycin*) en neuronas del hipotálamo mediobasal, integrando disponibilidad de nutrientes con respuestas celulares y conductuales (Wen et al., 2019). mTOR es un sensor energético conservado con roles tanto centrales como periféricos, que favorece procesos anabólicos como la síntesis proteica (Cota et al., 2006; Lenard & Berthoud, 2008). Finalmente, se ha demostrado que los tanicitos pueden detectar cambios en ácidos grasos libres en el CSF y, en respuesta, liberar

factores como FGF21 (del inglés *fibroblast growth factor 21*), vinculando el sensing central con la regulación de la lipólisis periférica (Geller et al., 2019).

3.3 Metabolismo de glucosa y transporte de lactato en el hipotálamo

Históricamente, el lactato fue considerado un subproducto asociado a hipoxia y fatiga muscular. No obstante, la neurobiología ha redefinido su rol, situándolo como un componente relevante de la homeostasis energética y de la comunicación metabólica intercelular, enmarcado en la hipótesis del acoplamiento metabólico astrocito–neurona (Pellerin & Magistretti, 1994). En apoyo a esta idea, se ha observado que, en ausencia de glucosa, neuronas hipocampales pueden mantener actividad eléctrica cuando se provee lactato, lo que respalda su capacidad como sustrato alternativo (Wyss et al., 2011).

Durante la activación neuronal, parte importante de la glucosa es captada y metabolizada por astrocitos, donde se convierte en piruvato y posteriormente en lactato, que puede ser transferido a las neuronas (Bélanger et al., 2011). Esta direccionalidad se sustenta en perfiles metabólicos asimétricos: los astrocitos presentan una alta tasa glucolítica (Deitmer et al., 2019), y una regulación que limita el flujo oxidativo del piruvato (Piruvato deshidrogenasa o PDH con alta fosforilación), favoreciendo la producción de lactato (Itoh et al., 2003). Además, la expresión predominante de LDH5 en astrocitos y una elevada razón NADH/NAD⁺ desplazan el equilibrio hacia la síntesis de lactato (Bittar et al., 1996; Laughton et al., 2007). En contraste, las neuronas expresan mayoritariamente LDH1 y mantienen una razón

NADH/NAD⁺ más baja, facilitando la reconversión de lactato en piruvato y su uso en fosforilación oxidativa para la producción eficiente de ATP (Laughton et al., 2007).

En el hipotálamo, este acoplamiento resulta especialmente pertinente para el control de la ingesta e involucra no solo astrocitos, sino también tanicitos. Estas células son altamente glicolíticas y expresan componentes clave para detectar rangos elevados de glucosa, como glucoquinasa (GK) y el transportador GLUT2 (Garcia et al., 2003; Millan et al., 2010; Salgado et al., 2014). A nivel funcional, la inhibición de GLUT2 y GK en modelos *in vivo* incrementa la ingesta, sugiriendo que el metabolismo de glucosa mediado por tanicitos contribuye al control del balance energético (Barahona et al., 2018; Uranga et al., 2017). En este esquema, se ha propuesto que los tanicitos liberan lactato en respuesta a glucosa, el cual es captado por neuronas adyacentes para modular su actividad eléctrica (Elizondo-Vega et al., 2015; Salgado et al., 2022).

El transporte transcelular de lactato depende de la familia de transportadores de monocarboxilatos (MCTs), que operan acoplados al gradiente de protones (Halestrap & Wilson, 2012). En ARC, la distribución de estas isoformas favorece un flujo direccional: tanicitos expresan MCT1 y MCT4 (exportación), mientras que cerca del 60% de las neuronas POMC expresan MCT2, un transportador de alta afinidad ($K_m \approx 0,74 \text{ mM}$) adecuado para la captación (BRÖER et al., 1999; Cortes-Campos et al., 2013). La relevancia de este eje se ha evaluado mediante *knockdown* (KD): tanto el KD de MCT1/MCT4 en tanicitos como el KD de MCT2 en neuronas hipotalámicas incrementan la ingesta, sugiriendo que el flujo de lactato es parte de una señalización asociada a saciedad (Coca et al., 2025; Roberto Elizondo-Vega et al., 2020; Lhomme

et al., 2021; Órdenes et al., 2021). Además, este sistema se integra mediante un acoplamiento panglial mediado por conexinas (Cx) entre tanicitos y astrocitos, facilitando redes de distribución de sustratos metabólicos en el parénquima hipotalámico (Recabal et al., 2018b).

3.4 Lactato como molécula de señalización intercelular en el hipotálamo

Además de su rol como sustrato energético, el lactato ha emergido como una molécula de señalización intercelular mediante la activación del receptor de ácido hidroxicarboxílico 1 (HCAR1, anteriormente conocido como GPR81). Este receptor, acoplado a proteína G inhibitoria (G_iGPCR), reduce los niveles de AMPc tras su activación, efecto ampliamente descrito en tejidos periféricos (Ahmed et al., 2010; Offermanns, 2017). Inicialmente, HCAR1 fue caracterizado en tejido adiposo por su acción antilipolítica (inhibición de la lipasa sensible a hormonas) (Ahmed et al., 2010; Schreiber et al., 2019). Sin embargo, su presencia en el SNC sugiere roles adicionales: se ha reportado expresión de HCAR1 en regiones como hipocampo, neocorteza, plexo coroideo y estructuras del revestimiento ventricular (Hadzic et al., 2020; Lauritzen et al., 2014). En estudios electrofisiológicos, la activación de HCAR1 reduce la excitabilidad neuronal en corteza e hipocampo, disminuyendo la frecuencia de disparo y de corrientes postsinápticas excitatorias; este efecto es sensible a la toxina pertussis, consistente con señalización G_i (Bozzo et al., 2013; de Castro Abrantes et al., 2019; Herrera-López & Galván, 2018).

No obstante, en el hipotálamo, la interacción entre lactato y neuronas POMC plantea una aparente paradoja. Por un lado, la administración central de lactato reduce la ingesta y se ha asociado a un aumento de excitabilidad de neuronas POMC (Lam et al., 2008; Órdenes et al., 2021). Por otra parte, estas neuronas carecen de expresión de HCAR1, mientras que el receptor se localiza predominantemente en los astrocitos circundantes, sugiriendo un mecanismo indirecto: donde el lactato activaría HCAR1 en astrogliá y, a través de una señal glía-neurona, modularía la actividad eléctrica de neuronas POMC (Órdenes et al., 2021). Este tipo de organización es coherente con modelos en los que la activación glial promueve cambios metabólicos y señales que impactan la excitabilidad neuronal (Tang et al., 2014). Además, la reciente identificación de la N-lactoil-fenilalanina (Lac-Phe) como un metabolito supresor del apetito inducido por el ejercicio en ratones obesos, subraya la complejidad de la señalización por lactato y sus derivados en la regulación del balance energético sistémico (Li et al., 2022).

En conjunto, aunque existe evidencia consistente que vincula el metabolismo del lactato con la saciedad, permanece abierta una pregunta mecanística central: cómo la activación de HCAR1 en astrocitos hipotalámicos se traduce en cambios en la actividad de neuronas POMC, y cuál(es) molécula(s) median esta comunicación metabólica. Resolver este punto es crucial para comprender la señalización por lactato en circuitos hipotalámicos de control de la ingesta. Por ello, caracterizar la distribución celular de HCAR1 en el ARC y definir el mecanismo glía–neurona por el cual el lactato modula circuitos anorexigénicos, constituye un eje relevante para comprender la homeostasis energética hipotalámica.

4. Neuronas POMC: integración neuroendocrina y control de la ingesta

El control homeostático del balance energético depende de circuitos hipotalámicos que integran señales hormonales y metabólicas para ajustar la ingesta y el gasto energético. Dentro del ARC, las neuronas que expresan POMC constituyen una población clave con función anorexigénica: se activan ante señales de saciedad y su estimulación suprime la ingesta y favorece el gasto energético (Schwartz, 1997). En contraste con las neuronas orexigénicas adyacentes NPY/AgRP, las neuronas POMC ejercen un control más sostenido sobre la conducta alimentaria. De hecho, estudios optogenéticos y farmacogenéticos (DREADD, del inglés, *Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs*) muestran que el efecto hipofágico de su activación puede exhibir una latencia prolongada, de hasta 24 horas, lo que sugiere la participación de mecanismos de plasticidad sináptica y regulación transcripcional más allá de la modulación electrofisiológica aguda (Aponte et al., 2011; Atasoy et al., 2012).

La función anorexigénica de estas neuronas depende del procesamiento postraducciona del precursor POMC, mediante clivajes secuenciales mediados por proconvertasas (PC1/3 y PC2) y carboxipeptidasa E (CPE). Este procesamiento culmina en la síntesis y liberación de α -MSH, agonista de los receptores de melanocortina MC3R y MC4R (Wardlaw, 2011). Una vez liberada, α -MSH activa neuronas de segundo orden en el núcleo paraventricular (PVN) que expresan MC4R, promoviendo vías catabólicas asociadas a reducción de ingesta e incremento de gasto energético (Mercer et al., 2013). Por otra parte, MC3R se ha descrito como modulador autorregulatorio en neuronas POMC y también se expresa en neuronas NPY/AgRP,

contribuyendo a la coordinación del equilibrio funcional entre estados orexigénicos y anorexigénicos (Cowley et al., 2001; Demidowich et al., 2017).

A nivel neuroendocrino, la actividad de las neuronas POMC está modulada por hormonas periféricas que reflejan el estado energético a largo plazo. Leptina (tejido adiposo) e insulina (páncreas) convergen sobre rutas intracelulares como PI3K/AKT en estas neuronas (Hill et al., 2012). La unión de leptina a LepRb induce fosforilación de STAT3, favoreciendo la transcripción de *pomc* y aumentando la excitabilidad neuronal (Varela & Horvath, 2012). Complementariamente, la señalización por insulina promueve la fosforilación de FOXO1 por AKT, induciendo su exclusión nuclear y suprimiendo la represión sobre *pomc* (Wattez et al., 2013).

Además de señales hormonales, se ha propuesto que una subpoblación de neuronas POMC puede responder a nutrientes, particularmente a glucosa, aunque este punto ha sido debatido. Inicialmente, se planteó que algunas neuronas POMC serían *glucose-excited* (GE) mediante un mecanismo dependiente del cierre de canales de potasio sensibles a ATP (K_{ATP}), análogo al descrito en células β pancreáticas: el aumento de glucosa elevaría la relación ATP/ADP, cerraría canales K_{ATP} y despolarizaría la membrana (Ibrahim et al., 2003; Parton et al., 2007). Sin embargo, estudios posteriores han mostrado respuestas heterogéneas y cuestionan que todas las neuronas excitadas por glucosa sean POMC-positivas, sugiriendo que la sensibilidad a glucosa podría depender del contexto celular y del microambiente local (Fioramonti et al., 2007; Hu et al., 2014). Adicionalmente, la arquitectura del ARC

limita el acceso directo de metabolitos del CSF al parénquima por la barrera CSF–parénquima (Rodríguez et al., 2005).

Esta aparente discrepancia entre la respuesta funcional a glucosa versus limitaciones anatómicas para detectarla de forma directa, ha reforzado el interés en el rol de la glía circundante. Astrocitos y tanicitos participan activamente en el acoplamiento metabólico local y pueden traducir señales nutricionales hacia las neuronas del ARC. En particular, evidencia reciente sugiere que el lactato producido por la glía en respuesta a glucosa actúa como señal metabólica relevante para la activación de neuronas POMC. En rebanadas hipotalámicas, se ha observado que ~60% de neuronas POMC responden a lactato, mientras que una fracción menor responde tanto a lactato como a glucosa (Órdenes et al., 2021). Consistentemente, la delección de transportadores MCTs o la inhibición de lactato deshidrogenasa (LDH) atenúa respuestas anorexigénicas, con incremento de ingesta y peso corporal (Coca et al., 2025; Lhomme et al., 2021). En conjunto, estos hallazgos apoyan la idea de que el *glucosensing* neuronal podría estar mediado, en gran medida, por lactato derivado de glía. No obstante, permanece abierta una pregunta central: ¿el lactato modula las neuronas POMC solo como sustrato energético (vía MCT/K_{ATP}) o también activa vías de señalización que potencian la liberación de melanocortinas?

5. Contribución de los tanicitos en el *sensing* de glucosa y regulación de la ingesta de alimentos

Los tanicitos son células especializadas de tipo glía radial que recubren las paredes y el piso del 3V en el hipotálamo, al mismo nivel en el que se encuentran el

ARC, NDM y NVM. Son células polarizadas: su dominio apical contacta directamente el CSF y contribuye a una barrera de difusión hacia el parénquima, mientras que sus prolongaciones basales se extienden hacia núcleos hipotalámicos e incluso hacia superficies más distales (Elizondo-Vega et al., 2015). Además, forman una red altamente acoplada mediante uniones comunicantes mediadas por Cx43 (Langlet et al., 2013; Recabal et al., 2018b; Rodríguez et al., 2010).

De acuerdo con su posición a lo largo del 3V, los tanicitos se han clasificado en subtipos α (más dorsales) y β (más ventrales, incluyendo el piso ventricular), con subpoblaciones definidas por marcadores moleculares y por los territorios hipotalámicos que contactan (Akmayev et al., 1973; Elizondo-Vega et al., 2015; Robins et al., 2013). En el piso del 3V, los tanicitos $\beta 2$ forman una barrera con uniones estrechas que restringe el intercambio entre CSF y eminencia media (ME), estructura considerada un órgano circunventricular con alta permeabilidad por su vascularización fenestrada (Langlet et al., 2013). Esta organización posiciona a los tanicitos como una interfaz privilegiada para detectar señales nutricionales del compartimento ventricular y modular su acceso al parénquima hipotalámico.

A nivel molecular, se ha descrito que los tanicitos expresan la maquinaria para captar y metabolizar glucosa desde el CSF, incluyendo GLUT2, glucoquinasa (GK) y la proteína reguladora de GK (GKRP) (García et al., 2003; Millan et al., 2010; Salgado et al., 2014). Además, expresan transportadores de monocarboxilatos MCT1 y MCT4, que permiten exportar lactato hacia el parénquima (Cortés-Campos et al., 2011), el

cual puede ser captado por neuronas del ARC como neuronas POMC y NPY/AgRP, que expresan MCT2 (Coca et al., 2025; Cortes-Campos et al., 2013). Esta arquitectura sugiere un eje funcional en el que la glucosa es captada por los tanicitos desde el CSF, siendo metabolizada y liberada en forma de lactato hacia las neuronas.

En línea con esta hipótesis, nuestro grupo y otros han demostrado que los tanicitos generan ondas de calcio *in vitro* e *in situ* en respuesta a incrementos de glucosa extracelular, en un proceso dependiente de GK (Frayling et al., 2011; Orellana et al., 2012). Además, manipulaciones *in vivo* que reducen la expresión de componentes clave del metabolismo/transporte en tanicitos son suficientes para alterar la ingesta. Por ejemplo, el *knockdown* (KD) de GLUT2 en tanicitos mediante herramientas adenovirales inyectadas intracerebroventriculares (icv), se asoció a cambios en neuropéptidos orexigénicos/anorexigénicos y a un aumento de ingesta y peso frente a los controles, especialmente bajo condiciones de alta glucosa ventricular y tras ayuno (Barahona et al., 2018). De manera similar, el KD de GK incrementó ingesta, peso corporal y parámetros de alimentación, además de reducir el intervalo entre comidas tras ayuno (Uranga et al., 2017).

Complementariamente, la inhibición simultánea de MCT1/MCT4 en tanicitos mediante herramientas adenovirales icv produjo una pérdida de regulación frente a glucosa en el CSF, con menor expresión de neuropéptidos anorexigénicos (POMC y CART) y un fenotipo conductual consistente con baja saciedad (Roberto Elizondo-Vega et al., 2020). En conjunto, estos hallazgos sustentan la existencia de una

conversación metabólica tanicito–neurona mediada por transportadores, en la que la producción y exportación de lactato emergen como un componente crítico de la señalización asociada a saciedad.

5.1 Dinámica de formación del complejo GK/GKRP en el *glucosensing* hipotalámico

En el hipotálamo, los tanicitos expresan GK y su modulador endógeno GKRP, una de las principales proteínas reguladoras de la actividad y compartimentalización de GK. GK (hexoquinasa IV) es una enzima de baja afinidad por glucosa, lo que le permite responder a incrementos de concentración sin saturarse rápidamente (Cardenas et al., 1998). En humanos, se utilizan rangos clínicos referenciales para clasificar estados glicémicos, por ejemplo: hipoglicemia <70 mg/dL, normoglicemia ~70–120 mg/dL e hiperglicemia >140 mg/dL (Abraham et al., 2018; Jackson et al., 2012). Aunque estos rangos se establecen en sangre, ilustran el principio general de que GK opera de forma especialmente relevante cuando la glucosa aumenta.

La regulación de GK por GKRP ha sido ampliamente caracterizada en hígado, donde GKRP se localiza predominantemente en el núcleo y controla la translocación de GK entre compartimentos: en condiciones de baja glucosa, GK es secuestrada en el núcleo, disminuyendo su disponibilidad citosólica; en condiciones de alta glucosa, el complejo se disocia y GK retorna al citosol, favoreciendo la fosforilación de glucosa. En tanicitos, GKRP también se expresa, pero la dinámica de formación del complejo parece diferir, posiblemente por la expresión relativa de ambas proteínas y por

particularidades del microambiente hipotalámico (Salgado et al., 2019; Salgado et al., 2014).

Recientemente, nuestro laboratorio dilucidó un rol funcional de GGRP en tanicitos sobre la conducta alimentaria. La disminución de GGRP mediante herramientas adenovirales icv se asoció a un aumento de producción de lactato *in vitro* y a una disminución significativa de la ingesta y del peso corporal en ratas GGRP-KD. Además, la excitabilidad de neuronas POMC aumentó tras la adición de lactato en rebanadas hipotalámicas. En contraste, la sobreexpresión de GGRP en tanicitos incrementó la ingesta (Salgado et al., 2022). En conjunto, estos hallazgos posicionan a GGRP como un potencial blanco para modular saciedad a través de rutas metabólicas gliales.

6. Participación de astrocitos hipotalámicos en la interacción tanicito-neurona

Además del acoplamiento tanicito–neurona, los astrocitos del parénquima hipotalámico pueden contribuir al suministro y distribución de sustratos metabólicos hacia las neuronas. En términos generales, los astrocitos captan glucosa principalmente mediante GLUT1 desde la vasculatura parenquimatosa, la metabolizan a lactato y lo exportan para su utilización neuronal, fenómeno conceptualizado como acoplamiento metabólico glía–neurona (Pellerin & Magistretti, 1994). A diferencia de los tanicitos, los astrocitos no expresan GLUT2, GK o GGRP; en cambio expresan GLUT1, hexoquinasas de alta afinidad y transportadores de monocarboxilatos que

permiten el intercambio de lactato en el microambiente (Cortes-Campos et al., 2013; Garcia et al., 2003; Sánchez-Alvarez et al., 2004).

En este marco, la localización de HCAR1 en astrocitos hipotalámicos (y no en neuronas POMC) sugiere una vía señalizadora adicional: el lactato liberado por tanicitos como producto del metabolismo de glucosa podría no solo ser captado por neuronas del ARC, sino también activar HCAR1 en astrogliá y desencadenar señales sobre las neuronas (Órdenes et al., 2021). HCAR1 es un receptor acoplado a proteína G_i que reduce AMPc en las células que lo expresan; sin embargo, el resultado funcional de activar vías G_i puede depender del tipo celular. En este sentido, estudios usando DREADD (G_i -GPCRs) bajo promotores específicos, han mostrado que su activación en neuronas produce respuestas inhibitorias, mientras que su activación en astrocitos puede inducir incrementos de calcio intracelular y, de manera indirecta, aumentar la excitabilidad neuronal (Fig. 2) (Durkee et al., 2019).

De manera consistente, la liberación astrogliá de glutamato puede generar corrientes neuronales características denominadas SICs (del inglés *slow inward currents*), mediadas por receptores NMDA extrasinápticos. Estas corrientes, a diferencia de las corrientes sinápticas, son más prolongadas en el tiempo y sensibles al antagonista D-AP5, por lo que se han utilizado como un correlato funcional de liberación de glutamato inducida por activación astrogliá (Fig. 2) (Araque et al., 1999; Csemer et al., 2023; Durkee et al., 2019; Kovács & Pál, 2017; Martín et al., 2015).

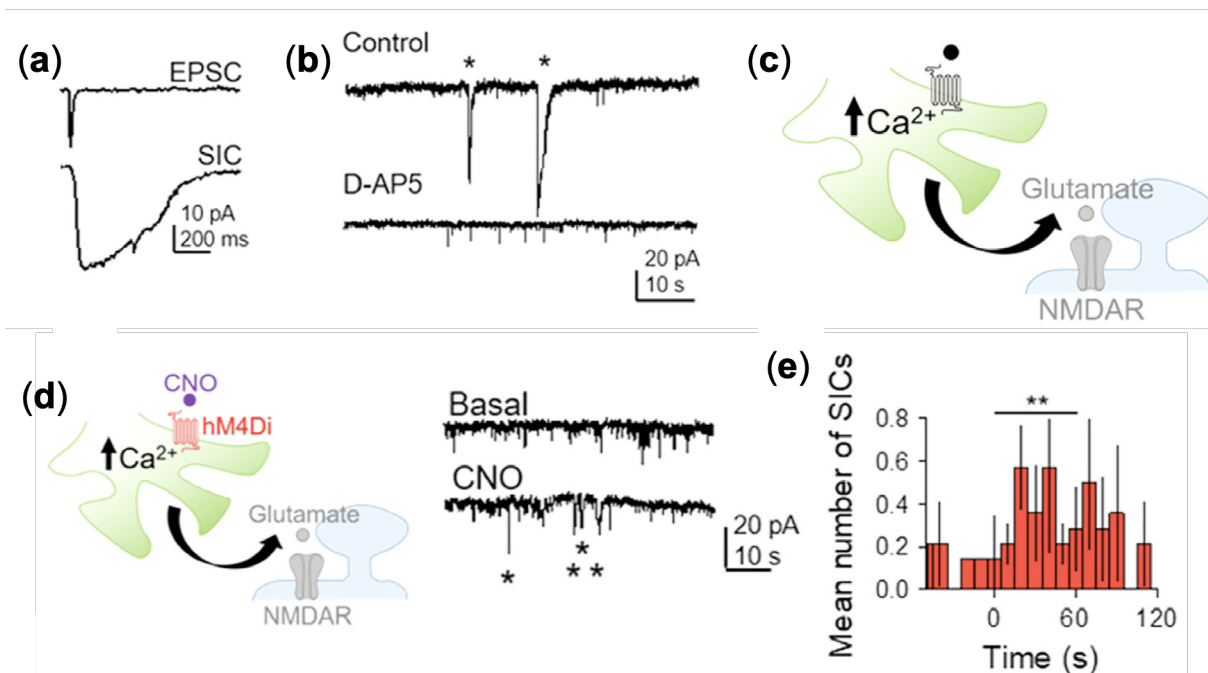


Figura 2. Activación de astrocitos vía Gi DREADDs induce slow inward currents en neuronas.

- a)** *Excitatory postsynaptic current (EPSC) y slow inward current (SIC) representativas.*
- b)** Trazos representativos mostrando SICs (asteriscos) en control y con DAP-5. **c)** Esquema de elementos sinápticos astrocito-neurona y gliotransmisión. **d)** Activación selectiva de astrocitos que expresan Gi-DREADDs tras la aplicación de CNO (clozapina N-óxido) e inducción de SICs en neuronas. **e)** Incremento significativo de SICs tras 1 min de aplicación de CNO.

Aunque los astrocitos carecen de potenciales de acción, exhiben una forma de excitabilidad basada en cambios dinámicos en el calcio intracelular, lo que puede gatillar la liberación de moléculas neuroactivas o gliotransmisores, como glutamato, ATP/adenosina, D-serina y GABA, modulando la transmisión sináptica y plasticidad neuronal (Fig. 3) (De Ceglia et al., 2023; Durkee & Araque, 2019; Goenaga et al., 2023). Además de la dependencia del Ca^{2+} intracelular, se han propuesto múltiples vías por las cuales los astrocitos liberan glutamato. Estas incluyen un mecanismo clásico de exocitosis vesicular dependiente del complejo SNARE (vesículas con transportadores vesiculares de glutamato), exocitosis lisosomal, y la liberación a través de canales iónicos y hemicanales; por ejemplo, canales Bestrofina-1 (BEST1) y hemicanales de Cx43. También se describen mecanismos independientes de calcio, mediados por canales K2P (como TREK-1) que permiten la salida de glutamato en respuesta a activación de GPCRs (Fig. 4) (Murat & García-Cáceres, 2021).

En conjunto, estos antecedentes sostienen que el lactato puede operar en el hipotálamo como (i) sustrato metabólico que alimenta neuronas anorexigénicas y (ii) como señal que activa rutas astrogliales (vía HCAR1) capaces de modular circuitos de neuronas POMC. Sin embargo, aún no se ha definido el mecanismo que conecta la activación de HCAR1 en astrocitos con cambios electrofisiológicos y/o secretorios en neuronas POMC, y cuál sería el mediador glial específico responsable de esa comunicación.

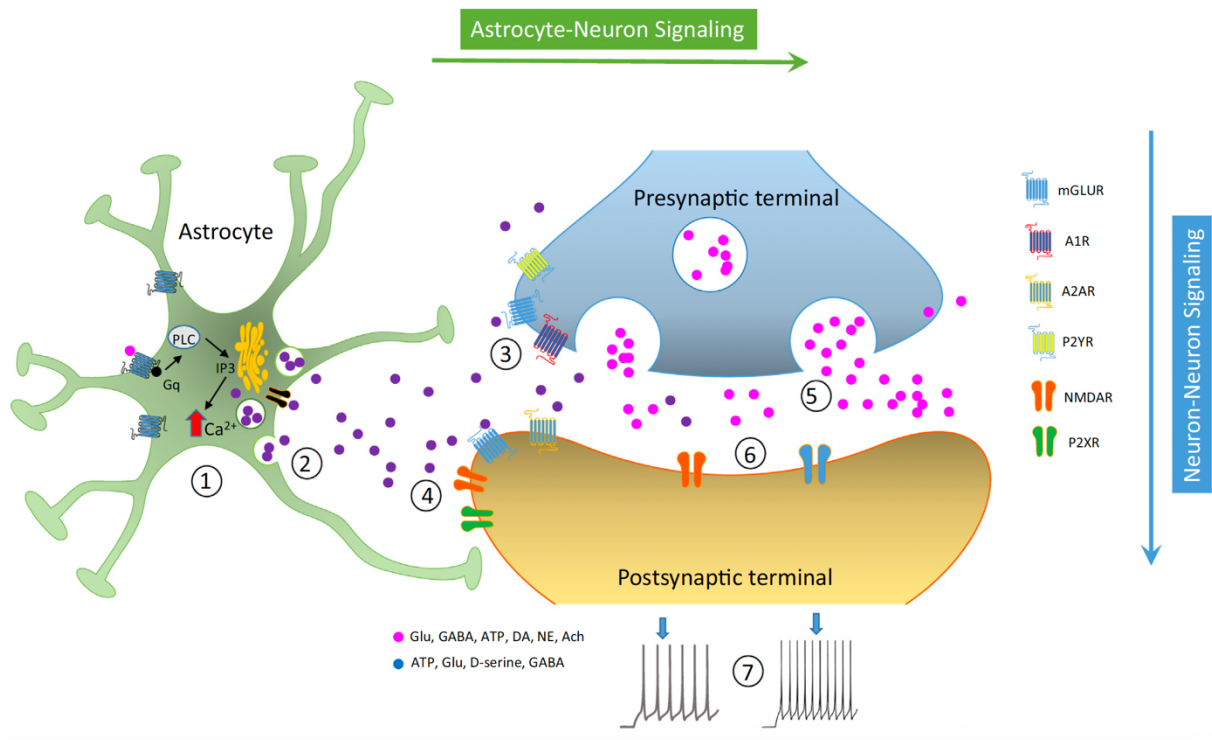


Figura 3. Señalización astrocito–neurona en la sinapsis tripartita.

El aumento del Ca^{2+} intracelular (1) promueve la liberación de gliotransmisores (2), los cuales actúan sobre receptores acoplados a proteína G (GPCRs) o canales localizados tanto en la terminal presináptica (3) como en la membrana postsináptica (4). En consecuencia, la liberación presináptica (5) o la excitabilidad postsináptica (6), son reguladas por los gliotransmisores liberados por los astrocitos. Tomado de (Kofuji & Araque, 2021).

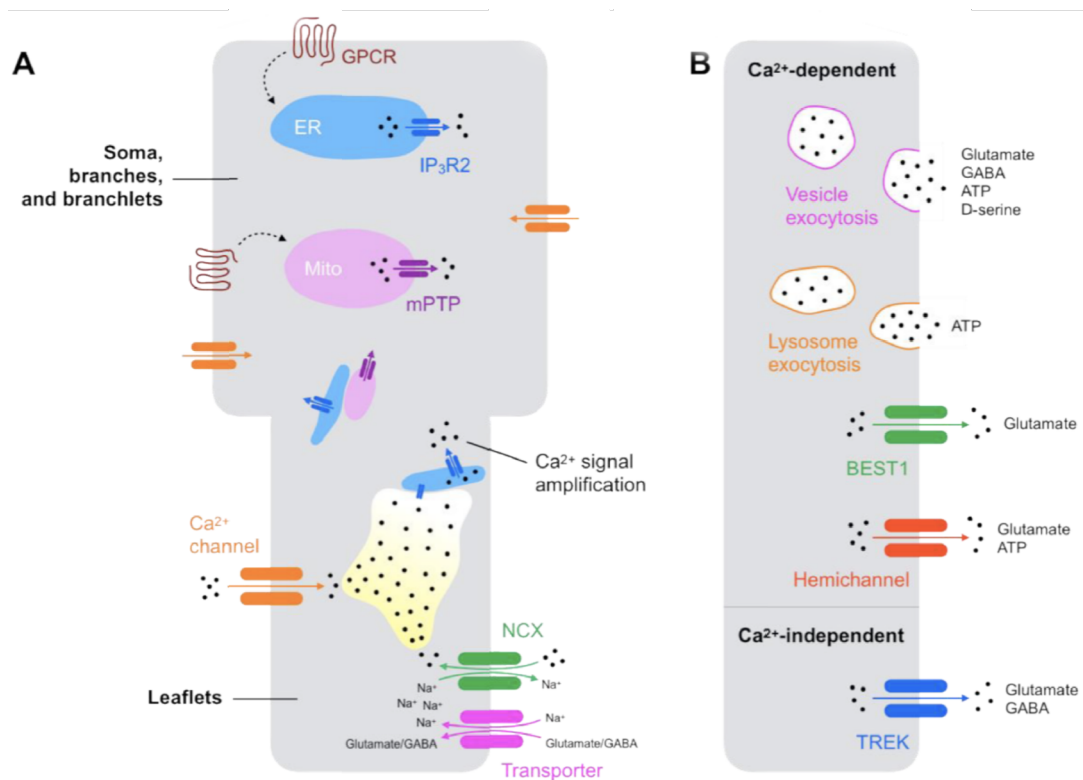


Figura 4. Mecanismos subyacentes a los aumentos de calcio intracelular y la liberación de gliotransmisores desde los astrocitos.

(A) En astrocitos, la activación de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) desencadena elevaciones de Ca^{2+} citosólico mediante diversos mecanismos, tales como la movilización de Ca^{2+} dependiente del receptor de inositol 1,4,5-trifosfato tipo 2 (IP_3R2) desde el retículo endoplásmico (ER) o el flujo de salida de Ca^{2+} a través de los poros de transición de permeabilidad de la membrana mitocondrial (mPTPs). En los procesos finos de los astrocitos (*leaflets*), el incremento de la actividad sináptica puede promover el cotransporte de neurotransmisores y Na^+ hacia el citosol; esto aumenta la actividad de los intercambiadores Na^+/Ca^{2+} (NCX), lo que resulta en elevaciones de Ca^{2+} citosólico. Adicionalmente, los canales permeables a Ca^{2+} contribuyen al ingreso de Ca^{2+} en los *leaflets*. **(B)** Diversos mecanismos se han

propuesto para explicar la liberación de gliotransmisores desde los astrocitos. En su mayoría, estos procesos ocurren de manera dependiente de Ca^{2+} mediante la exocitosis de vesículas. También se ha descrito que la exocitosis lisosomal, los canales de bestrofina-1 (BEST1) y los hemicanales participan en los mecanismos de liberación de gliotransmisores dependientes de Ca^{2+} . Además, se ha reportado la participación de una liberación de gliotransmisores independiente de Ca^{2+} a través de canales de K^+ de dominio de dos poros (TREK). Modificado de (Murat & García-Cáceres, 2021).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

De acuerdo con los antecedentes experimentales, los tanicitos han sido propuestos como las principales células *sensoras* de glucosa en el hipotálamo, capaces de detectar variaciones en los niveles de glucosa tanto en sangre como en el líquido cefalorraquídeo. Estas células expresan una maquinaria molecular especializada que favorece una elevada tasa glucolítica, incluyendo los transportadores y enzimas GLUT2, glucocinasa IV (GK) y su proteína reguladora GKRP, lo que permite la producción eficiente de lactato. Este lactato es exportado hacia el parénquima hipotalámico y el líquido cefalorraquídeo mediante transportadores monocarboxilato MCT1 y MCT4, facilitando su disponibilidad para otras células del núcleo arqueado (ARC).

Se ha demostrado en diversos estudios realizados por nuestro laboratorio y otros grupos, que el aumento en la concentración de lactato en el CSF y ARC se asocia con una disminución en la ingesta de alimentos, lo que indica que el lactato actúa como una señal metabólica relevante en el control central del balance energético. Se ha descrito que el lactato incrementa la excitabilidad de las neuronas POMC mediante su transporte mediado por MCT2, lo que sugiere un mecanismo dependiente de su metabolismo intracelular. Sin embargo, evidencia reciente ha demostrado que el D-lactato, un enantiómero que es pobremente transportado y metabolizado, también puede activar un subconjunto de neuronas POMC. Este hallazgo sugiere la existencia de un mecanismo alternativo de señalización mediado por lactato, independiente de su transporte intracelular y metabolismo. En este contexto, el receptor de lactato

HCAR1 ha emergido como un candidato clave en este proceso. Notablemente, este receptor no se encuentra expresado en neuronas POMC, sino que lo está predominantemente en astrocitos del ARC, lo que posiciona a estas células gliales como potenciales intermediarias en la señalización intercelular inducida por lactato.

En este escenario, aunque se ha establecido que los tanicitos liberan lactato y que este metabolito modula la actividad de neuronas POMC, aún no se ha caracterizado la existencia de un mecanismo de acoplamiento funcional entre tanicitos y astrocitos mediado por lactato y el receptor HCAR1. Asimismo, se desconoce el mecanismo mediante el cual los astrocitos, tras la activación de HCAR1, podrían modular la actividad neuronal, incluyendo la posible liberación de gliotransmisores capaces de regular la excitabilidad de neuronas POMC.

Por lo tanto, el problema científico central que aborda esta tesis es determinar si el lactato liberado por tanicitos, puede activar astrocitos hipotalámicos mediante el receptor HCAR1 y, a través de este mecanismo, modular indirectamente la actividad eléctrica de las neuronas POMC (Fig. 5). La elucidación de este mecanismo permitirá comprender un nuevo nivel de integración metabólica mediado por la comunicación glía-neurona en el control central del balance energético.

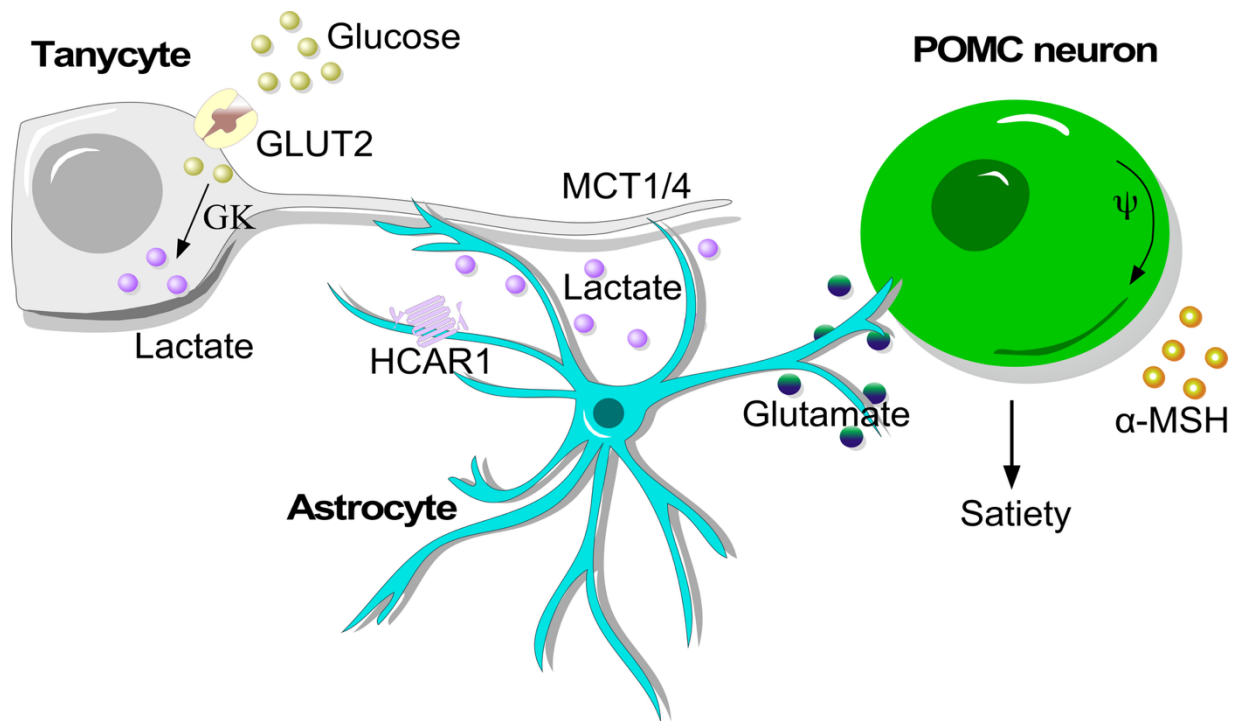


Figura 5. Representación esquemática de la interacción metabólica hipotalámica glía-neurona.

La glucosa es captada por transportador GLUT2 de tanicitos, donde es fosforilada por la glucoquinasa (GK) y genera lactato como producto de la glucólisis. Este es liberado por MCTs al parénquima, donde podría activar el receptor de lactato HCAR1 de astrocitos, incrementando los niveles intracelulares de Ca^{2+} , lo cual favorecería la producción y liberación de glutamato. Este evento incrementaría la excitabilidad de neuronas POMC, relacionado con el incremento en la saciedad.

III. HIPÓTESIS

El lactato producido por tanicitos promueve la activación de HCAR1 en astrocitos hipotalámicos, incrementando la actividad de neuronas POMC.

IV. OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar si astrocitos y tanicitos en conjunto modulan la actividad de neuronas POMC a través de señalización intercelular mediada por lactato y su receptor HCAR1.

Objetivos específicos

- 1) Determinar si la metabolización de glucosa a lactato en tanicitos induce la producción y liberación de glutamato dependiente de calcio en astrocitos, mediado por HCAR1 *in vitro*.
- 2) Evaluar el efecto del incremento de glucosa intracelular en tanicitos sobre la activación de neuronas POMC de animales *knock-down* para HCAR1 en astrocitos hipotalámicos *in situ*.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales experimentales y declaración bioética

Los experimentos con ratones realizados en la Universidad de Concepción, Chile, fueron aprobados y revisados por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias Biológicas, y aquellos realizados en la Universidad de Maryland, College Park, MD, EE.UU., fueron aprobados por el *Institutional Animal Care and Use Committee* (IACUC), de acuerdo con las directrices del *National Institutes of Health* (NIH).

Los ratones se mantuvieron en grupos (2–5 hermanos), a 21 ± 2 °C, bajo un ciclo luz–oscuridad de 12 h, con acceso *ad libitum* a agua y dieta estándar en pellets. Los procedimientos experimentales se realizaron con ratones C57BL/6J (Jax, #000664), POMC-Cre (Jax, #005965), POMC-EGFP (Jax, #009593) y NPY-EGFP (Jax, #006417).

2. Cirugía estereotáctica

Las cirugías estereotácticas en el hipotálamo se realizaron para la administración parenquimal de AAV-FLEX-GFP (título $2,3 \times 10^{13}$; Addgene #28304), AAV-FLEX-tdTomato (título $2,1 \times 10^{13}$; Addgene #59462), AAV5-gfaABC1D-cyto-GCaMP6f (título $2,1 \times 10^{13}$; Addgene #52925), AAV5-GFAP-shHCAR1-mCherry (título $1,9 \times 10^{13}$; VectorBuilder #VB240506-1660rzw) y/o AAV5-GFAP-Scramble-mCherry (título $1,8 \times 10^{13}$; VectorBuilder #VB240506-1660hkb).

Ratones de 10 a 12 semanas de edad fueron anestesiados con isoflurano (1 mg/mL) mediante un vaporizador veterinario (Matrx VIP 300) y posicionados en un equipo estereotáxico (KOPF modelo #940). Tras la exposición del cráneo, se perforaron pequeños orificios en coordenadas relativas a bregma (en mm): -1,70 A-P; -5,80 D-V; $\pm 0,30$ M-L, utilizando una jeringa de 1 μ L (Hamilton, #65458-01), para inyectar 100 nL de cada AAV en el núcleo arqueado (ARC) a una velocidad de 25 nL/min.

Posterior a la cirugía, los animales recibieron cuidados postoperatorios adecuados y se administró meloxicam por vía intraperitoneal (0,5 mg/kg). Todos los experimentos se realizaron tres semanas después de la cirugía.

3. Imágenes de calcio y registros de *patch clamp* en rebanadas

Las rebanadas hipotalámicas de ratones C57BL/6J o POMC-Cre se prepararon en solución de líquido cefalorraquídeo artificial (aCSF) fría y oxigenada, con baja concentración de Ca^{2+} (0,5 mM) y alta concentración de Mg^{2+} (3 mM). Se obtuvieron rebanadas coronales de 250 μ m de grosor que contenían el ARC, utilizando un vibrátomo (Leica Biosystems VT1200S), y se mantuvieron durante 30 min a 35 °C en aCSF normal (en mM: 125 NaCl, 25 NaHCO_3 , 1,25 NaH_2PO_4 , 3 KCl, 2 CaCl_2 , 1 MgCl_2 , 3 mio-inositol, 0,3 ácido ascórbico, 2 piruvato de sodio y 10 glucosa).

Las rebanadas se mantuvieron continuamente oxigenadas (95 % O_2 – 5 % CO_2), a pH 7,4 y una osmolaridad de 305 mOsm. Posteriormente, se transfirieron a una cámara

de incubación con aCSF normal y se permitió su recuperación durante 30 min a 35 °C, seguida de incubación a temperatura ambiente hasta su uso.

Las rebanadas se colocaron en una cámara montada sobre un microscopio vertical (Olympus BX51W1 DIC), equipado con óptica de contraste interferencial infrarrojo diferencial (IR-DIC), y fueron perfundidas con aCSF bajo en glucosa (1 mM) a una velocidad de 2–3 mL/min a temperatura ambiente. Las células fluorescentes se identificaron mediante iluminación por epifluorescencia. Las rebanadas se observaron con un objetivo de inmersión en agua 40x y se visualizaron mediante una cámara (Photometrics, CoolSNAP-EZ). Los registros de calcio se realizaron adquiriendo imágenes de fluorescencia cada 4 s por 16 min y los cambios de fluorescencia fueron cuantificados en al menos 10 regiones de interés (ROIs) por cada rebanada. El protocolo de registros consistió en 4 min de actividad basal, seguidos de 4 min de aplicación de los agonistas y 8 min de lavado. Los cambios en la intensidad de fluorescencia por cada ROI individual fueron expresados como $\Delta F/F_0$. Las células clasificadas con incremento significativo de actividad de Ca^{2+} , describieron un $\Delta F/F_0$ superior a tres veces la desviación estándar del periodo basal.

Los registros de patch clamp se realizaron utilizando un amplificador dual EPC10 (HEKA). Los electrodos de registro se fabricaron a partir de pipetas de vidrio estándar (5–7 M Ω ; Sutter Instruments) utilizando un estirador Flaming-Brown (Sutter Instruments) y se llenaron con una solución interna con la siguiente composición (en mM) para registros en *current clamp*: 10 Na-gluconato, 4 NaCl, 120 K-gluconato, 10 HEPES, 10 fosfocreatina de sodio, 2 Na-ATP, 4 Mg-ATP y 0,3 GTP, ajustada a pH 7,3

con KOH. Para registros en *voltage clamp*, el K-gluconato fue reemplazado por Cs-gluconato en la solución interna, y el Mg^{2+} fue omitido del aCSF para facilitar la identificación de SICs. La estimulación eléctrica y los registros se realizaron utilizando el software PatchMaster (HEKA). El potencial de membrana se mantuvo en -55 mV para *current clamp* o -70 mV para *voltage clamp*.

4. Cultivo primario de tanicitos

Cultivos primarios enriquecidos de tanicitos se obtuvieron a partir de cerebros de ratones neonatos de 1 día postnatal (~6 animales). El hipotálamo fue disecado para obtener la región cercana a la capa endimaria. Los tejidos disecados se sumergieron en solución salina balanceada de Hank (HBSS, Gibco) suplementada con 10 mM HEPES (pH 7,4). Posteriormente, se incubaron con tripsina 0,25 %, EDTA 0,2 % (p/v) y DNasa I 2 mg/mL (Sigma-Aldrich) durante 15 min a 37 °C, y se disgregaron mediante resuspensión suave. La suspensión celular se transfirió a frascos de cultivo T25 previamente recubiertos con poli-L-lisina 0,2 mg/mL (Sigma-Aldrich), utilizando medio MEM (Gibco™) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS, v/v), 2 mM L-glutamina, 100 U/mL penicilina, 100 U/mL estreptomina y 2,5 mg/mL fungizona (Thermo Fisher Scientific). Las células se mantuvieron en cultivo durante dos semanas, con recambio de medio cada 2 días.

Para evaluar la eficiencia de transducción adenoviral y la viabilidad celular, las células se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de 50.000 células/cm², se cultivaron en DMEM con 2 % FBS y luego se transdujeron con 5×10^7 IFU/mL durante 72 h, previo a los análisis por inmunocitoquímica. Los tanicitos fueron transducidos con

adenovirus previamente generados y validados por nuestro grupo: Adsh β Gal-EGFP, AdshMCT4-EGFP y AdshGKRP-EGFP. Posteriormente, los tanicitos transducidos se incubaron con 10 mM glucosa en DMEM sin rojo fenol (Gibco) durante 2 h, tras lo cual el medio condicionado de tanicitos (T^{CM}) fue recolectado y almacenado a -80°C .

5. Cultivo primario de astrocitos

Los cultivos primarios de astrocitos hipotalámicos se obtuvieron a partir de cerebros de ratones de 5 días postnatales (~6 animales). El hipotálamo fue cuidadosamente disecado para separar el núcleo arcuato de la capa ependimaria en pequeños fragmentos, los cuales se sumergieron en HBSS. Posteriormente, los tejidos se incubaron con tripsina 0,25 %, EDTA 0,2 % (p/v) y DNasa I 2 mg/mL durante 15 min a 37°C . La disgregación mecánica se realizó en medio DMEM suplementado con 10 % FBS, 2 mM glutamina, 100 U/mL penicilina, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ estreptomina, 2 mM glucosa y 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ fungizona. Las células se sembraron en placas de cultivo a una densidad de 50.000 células/cm², y el medio fue reemplazado cada 48 h durante 14 días.

Para generar cultivos con silenciamiento de HCAR1 (HCAR1-KD), los astrocitos se transfectaron con 15 nM de un siRNA específico contra HCAR1 (Ambion #4390815) o un siRNA control negativo (Ambion #4390843), utilizando Lipofectamina 3000 (Invitrogen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, las células fueron estimuladas con L-lactato 10 mM (Sigma-Aldrich, #L7022), 3CI-HBA 40 μM (Cayman Chemical, #16795) o distintos T^{CM} durante 15 min. Posteriormente, el medio fue recolectado y almacenado a -80°C , y las células se utilizaron para la extracción de ARN total.

6. Cuantificación de lactato y glutamato

Para la cuantificación de liberación de lactato, los tanicitos transducidos se incubaron con glucosa 10 mM en DMEM sin rojo fenol (Gibco) durante 2 h. Posteriormente, el T^{CM} fue recolectado y almacenado a -80 °C para la medición de lactato. Para la cuantificación de liberación de glutamato, los astrocitos se utilizaron 48 h después de la transfección y se estimularon con L-lactato 10 mM, 3CI-HBA 40 µM o diferentes T^{CM} durante 15 min. El medio fue recolectado y almacenado a -80 °C, y las células se utilizaron para la extracción de ARN total.

Los ensayos de lactato y glutamato se realizaron utilizando kits colorimétricos: kit de ensayo de L-lactato (Sigma-Aldrich, #MAK329) y kit de ensayo de glutamato (Sigma-Aldrich, #MAK004), siguiendo las instrucciones del fabricante.

7. Captación de DAPI e imágenes de calcio *in vitro*

Para las imágenes de calcio, los astrocitos hipotalámicos se cultivaron bajo las mismas condiciones descritas previamente y se cargaron durante 20 min a 37 °C con Fluo-4 AM 5 µM (Invitrogen), seguido de 10 min a temperatura ambiente. Los registros de calcio se realizaron utilizando distintas moléculas diluidas en una solución externa que contenía (en mM): 154 NaCl, 5,4 KCl, 2,3 CaCl₂, 2 glucosa y 5 HEPES (pH 7,4).

Las células en cubreobjetos se colocaron en un microscopio de células vivas (Nikon Eclipse Ti-FL) con un objetivo de 40x. Los datos se adquirieron cada 3 s durante 15 min y se expresaron como $\Delta F/F_0$ en función del tiempo. Las células que se

consideraron con incremento en la actividad de Ca^{2+} mostraron un incremento en el $\Delta F/F_0$ superior al doble de lo registrado en el periodo basal. Las células que no exhibieron cambios por encima del doble de actividad, fueron clasificadas como sin respuesta frente al estímulo y fueron excluidas de los análisis. Para los experimentos de captación de DAPI, las células se registraron en la misma solución externa con 5 mM DAPI, adquiriendo imágenes cada 15 s durante 15 min con el software NIS Elements. Las pendientes se calcularon y compararon entre periodos de 5 min.

En todos los experimentos, se registró fluorescencia basal durante 5 min, seguida de 5 min de estimulación y un periodo final en el que se añadió el ionóforo A23187 (5 μM ; Sigma-Aldrich, #C7522) para los experimentos de calcio, o el inhibidor de hemicanales D4 (Qianyan Shenzhen Pharmatech) para los ensayos de captación de DAPI. Al menos 10 células o núcleos por cubreobjetos se definieron como regiones de interés (ROIs), y se midió el cambio promedio de la intensidad de fluorescencia a lo largo del tiempo.

8. Inmunofluorescencia

Los ratones fueron sometidos a perfusión vascular y posteriormente sus cerebros se fijaron por inmersión en paraformaldehído (PFA) al 4 % (p/v) durante 24 h. Luego, los cerebros se cortaron con un vibrátomo en secciones de 40 μm . Los cultivos celulares se sembraron sobre cubreobjetos de vidrio previamente recubiertos con poli-L-lisina, a una densidad de 30.000 células/ cm^2 , y se fijaron por inmersión en PFA al 4 % durante 30 min.

Los tejidos o cultivos celulares se incubaron con anticuerpos diluidos en tampón Tris-HCl (pH 7,8) que contenía (en mM): 8,4 Na₂HPO₄, 3,5 KH₂PO₄, 120 NaCl y 10 Tris, además de 1 % albúmina sérica bovina y 0,2 % Triton X-100. Las muestras se incubaron con anticuerpos primarios durante la noche a temperatura ambiente y posteriormente durante 2 h con anticuerpos secundarios y DAPI (los anticuerpos empleados se describen en las Tablas 1 y 2). Las muestras se analizaron mediante microscopía confocal de barrido láser (Carl Zeiss LSM780).

Tabla 1. Anticuerpos primarios empleados en inmunofluorescencia.

Anticuerpo primario	Especie	Clon	Dilución	Compañía	#Catalogo
GFAP	Ratón	Monoclonal	1/400	Merck Millipore	MAB360
GFAP	Conejo	Policlonal	1/400	Agilent	Z0334
Vimentina	Pollo	Policlonal	1/1000	Merck Millipore	AB5733
HCAR1	Conejo	Policlonal	1/200	Alomone Labs	AHR-011
CD31	Conejo	Monoclonal	1/800	Cell Signalling	F2N3M

Tabla 2. Anticuerpos primarios empleados en inmunofluorescencia.

Anticuerpo secundario	Especie	Dilución	Compañía	#Catalogo
Alexa Fluor 488	Ratón	1/250	Jackson IR	615-545-214
Alexa Fluor 488	Conejo	1/250	Jackson IR	111-545-003
Alexa Fluor 555	Pollo	1/1000	Invitrogen	A21437
Alexa Fluor 647	Conejo	1/250	Jackson IR	711-605-152

9. Hibridación *in situ*.

Se adquirió un plásmido que contiene el inserto de HCAR1 junto con los promotores SP6 y T7 (ID del clon: OMu21605D, sintetizado a partir del vector pcDNA3.1+/C-(K)-DYK, GenScript). Este plásmido fue amplificado en bacterias competentes DH5 α y purificado utilizando el kit MaxiPrep (MACHEREY-NAGEL). Para la transcripción *in vitro* de las ribosondas, se siguieron las instrucciones del fabricante DIG RNA Labeling Kit SP6/T7 (Roche). Se linealizaron 10 μ g del plásmido con las enzimas HindIII y SmaI (New England Biolabs) incubadas por 3 h a 37°C. La digestión se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa, y luego se extrajo el ADN del gel utilizando el kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (MACHEREY-NAGEL). Posteriormente, se preparó la mezcla que contenía 1 μ g del plásmido, 2 μ L NTP labeling mixture 10X, 2 μ L Transcription buffer 10X, 1 μ L RNase Inhibitor y 2 μ L RNA Polymerase SP6 o T7, el cual se incubó por 2 h a 37°C. Luego, se añadieron 2 μ L de DNase I y se incubó por 15 min a 37°C. Finalmente, las ribosondas fueron purificadas para remover los nucleótidos no unidos, siguiendo las instrucciones del fabricante

(Quick Spin Columns for radiolabeled RNA purification, Sephadex G-50) y almacenadas a -80°C .

Posteriormente, para la hibridación de las ribosondas, los cortes coronales de 7 μm (obtenidos por micrótopo) fueron desparafinados. En un coupling de vidrio, los cortes fueron lavados a temperatura ambiente con PBS 1X- H_2O DEPC (0.1% v/v; #D5758, Sigma-Aldrich). Seguido de esto, los cortes fueron tratados por 10 min con trietanolamina acética pH 8.0, compuesto de 120 mM trietanolamina (90279, Sigma Aldrich) y 26 mM anhídrido acético (320102, Sigma-Aldrich) diluido en H_2O DEPC.

A continuación, se realizó la prehibridación por 4 h a temperatura ambiente con el tampón de hibridación (1 mL Salt Solution, 5 mL Formamida, 2 mL Dextran sulfato 50%, 0.5 mL tRNA (20 mg/mL), 0.2 mL solución de Denhart's (50 mg/mL) y 1.3 mL H_2O DEPC), utilizando aproximadamente 50 μL por corte. Para la hibridación, se incubó la solución de hibridación (tampón de hibridación junto a la ribosonda) por 5 min a 50°C . Esta solución se agregó sobre los cortes, y se incubó durante toda la noche a 42°C en cámara húmeda.

Al día siguiente, se realizaron lavados con SSC 4X por 15 min a 42°C , luego a 37°C y finalmente, a 60°C . Posteriormente, los cortes fueron lavados a temperatura ambiente, con Buffer 1 (Tris-HCl 2 M pH 7.5, NaCl 5 M y H_2O DEPC), y bloqueados con 1 mL de suero de oveja diluido en Buffer 1 durante 30 min. Luego, los cortes se incubaron anti-digoxigenina 1:1000 (Roche) en suero de oveja diluido en Buffer 1. El último día, se realizaron lavados con Buffer 1 por 10 min y luego con Buffer 2 (Tris-HCl 2 M pH 9.5, NaCl 5 M, MgCl_2 y H_2O DEPC) por 10 min. El revelado se realizó con

NBT/BCIP en oscuridad, hasta identificar la marca de color morado y se detuvo con Buffer 1.

10. RT-PCR (transcripción reversa y PCR cuantitativo)

El ARN total de tejidos o cultivos celulares se aisló utilizando TRIzol (Invitrogen) y se trató con DNasa I (Thermo Fisher Scientific) para eliminar contaminación por ADN genómico. Se utilizaron 2 µg de ARN total por muestra para la síntesis de ADNc, de acuerdo con el protocolo del kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems #4368813).

Las reacciones de RT-qPCR se prepararon utilizando SsoAdvanced Universal SYBR Green qPCR Supermix (Bio-Rad #1725271), en un volumen final de 10 µL que contenía 1 µL de ADNc y 500 nM de cada par de partidores descritos en la Tabla 3. Las reacciones se incubaron a 95 °C durante 5 min, seguidas de 40 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 55 °C y 30 s a 72 °C, con una extensión final de 7 min a 72 °C, utilizando un sistema Mx3000P (Agilent Technologies). La expresión relativa se determinó mediante el método comparativo $2^{-\Delta\Delta Ct}$, utilizando ciclofilina como gen de referencia.

Tabla 3. Partidores utilizados en RT-qPCR.

Partidores ADN	Secuencia (5'-3')	Producto (pb)
Actin Sn	GCT CGT CGT CGA CAA CGG CTC	353
Actin As	CAA ACA TGA TCT GGG TCA TCT TCT C	
Cyclophilin A Sn	ATA ATG GCA CTG GTG GCA AGT C	239
Cyclophilin A As	ATT CCT GGA CCC AAA ACG CTC C	
GFAP Sn	CTC AAT GCT GGC TTC AAG GAG A	635
GFAP As	GAC GCA GCG TCT GTG AGG TC	
Vim Sn	TTC AAG AAC ACC CGC ACC AAC G	356
Vim As	GAA GCA TTG TCA ACA TCC TGT CTG	
(1) HCAR1 Sn	TCC TCT ACT CAT CCT GGT CTT C	288
(1) HCAR1 As	AA TAC CTA TCC ACA GCC ACC	
(2) HCAR1 Sn	CAT GAT CTG CTT ACC CCT TCG	135
(2) HCAR1 As	ACC ACA GTG AGG AAG ACA ATG	
(3) HCAR1 Sn	ATC CTG GTC TTC GTG CTT GG	151
(3) HCAR1 As	CTG TCC GAA GGG GTA AGC AG	
Cx26 Sn	TTG CTC AGG GAA GTC CAA AAG ACC	231
Cx26 As	TGG GCC TTT GTT TGG GAG CTT T	
Cx30 Sn	GTG AAC AAG CAC TCG ACC AGC ATA	288
Cx30 As	GCG GAT AAAC TTT CGG GCA GTT TC	
Cx43 Sn	TGG GTA CAA GCT GGT TAC TGG TGA	221
Cx43 As	TGG CTA ATG GCT GGA GTT CAT GTC	
GK Sn	TGT GAG GCA CGA AGA CCT AGA CAA	273
GK As	ACC AGC TCC ACA TTC TGC ATT TCC	
GKRP Sn	TGG TGA ATG GGA GTT GTC AGG GTA	218

GKRP As	TTC CAG CCA CTT GCA ACA TGG T	
MCT4 Sn	TTC TCC AGT GCC ATT GGT CTC GTG	121
MCT4 As	CCC GCC AGG ATG AAC ACA TAC TTG	
EGFP Sn	CTG GAC GGC GAC GTA AAC GG	592
EGFP As	CAC GAA CTC CAG CAG GAC CAT	

11. Análisis de imágenes y análisis estadístico

Los resultados se presentan como media \pm error estándar de la media (SEM), y el valor n experimental indica el número de animales o cultivos celulares utilizados. Para el análisis estadístico, cada tratamiento se comparó con su respectivo control. Las diferencias entre dos grupos se analizaron mediante la prueba t de Student. Cuando se incluyeron más de dos grupos, se utilizó ANOVA de una vía. Pruebas estadísticas adicionales o *post hoc* específicos se describen en las leyendas de cada figura. Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$.

Las variaciones en la fluorescencia se cuantificaron utilizando Fiji (ImageJ, National Institutes of Health), y se expresaron como el cambio en la señal de fluorescencia sobre la fluorescencia basal. Se consideraron células con incremento significativo de actividad de Ca^{2+} aquellas que aumentaron el $\Delta F/F_0$ al menos tres veces tras la estimulación, comparadas con la desviación estándar del registro basal. El análisis de registros electrofisiológicos se realizó con el software Igor Pro 9 (Wavemetrics) y el *plug-in* SutterPatch (Sutter Instruments). Los análisis cuantitativos de codistribución

fueron realizados con el software QuPath 6.0 (GNU general public license). Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism 10 (GraphPad Software, Inc.) o R, versión 4.4.2 (R Foundation for Statistical Computing).

VI. RESULTADOS

1. Localización del receptor de lactato HCAR1 en cerebro y tejido adiposo

Previamente, un estudio de nuestro laboratorio demostró la localización de HCAR1 en un número reducido de astrocitos hipotalámicos mediante inmunohistoquímica de fluorescencia. En el presente trabajo de investigación, empleamos diversas técnicas para demostrar que HCAR1 se expresa y es funcional en astrocitos hipotalámicos, lo que destaca su rol en el proceso de gliotransmisión, evaluado en neuronas POMC.

Con el objetivo de validar la localización tisular del receptor de lactato, se realizó inmunofluorescencia confocal en tejido adiposo visceral y en secciones coronales de hipocampo (Fig. 5). En el tejido adiposo se observó una señal intensa de HCAR1 (verde) con un patrón periférico compatible con localización en membrana plasmática (Fig. 5B). El comarcaje con vimentina (rojo), marcador de filamentos intermedios característico del estroma adipocitario, permitió visualizar la arquitectura celular del tejido y la red estromal que rodea las gotas lipídicas (Fig. 6A). La señal de HCAR1 se observó en estrecha proximidad y superposición parcial con estructura vimentina-positivas (Fig. 6C-D), consistente con la expresión del receptor en este tejido adiposo y con la especificidad del anticuerpo bajo estas condiciones experimentales.

Posteriormente, se analizó la localización de HCAR1 en el hipocampo, una región cerebral en la que su expresión se ha reportado previamente en células gliales.

El comarcaje con la proteína ácida fibrilar glial (GFAP, rojo) reveló una amplia distribución de astrocitos en el parénquima y en regiones cercanas a estructuras vasculares (Fig. 6E). La señal de HCAR1 (Fig. 6F) mostró un patrón asociado a procesos astrogliales GFAP positivos, observándose enriquecimiento en zonas adyacentes a vasos (asterisco), compatible con localización en dominios perivasculares/terminales astrogliales (Fig. 6G). La ampliación de un área representativa confirmó la presencia de señal HCAR1 en procesos terminales y cuerpos astrogliales en proximidad a núcleos teñidos con DAPI (Fig. 6H).

Para evaluar la expresión del ARNm de HCAR1 en el ARC, se realizó hibridación *in situ* cromogénica en cortes coronales de cerebro (Fig. 7). La incubación con la sonda sentido (control negativo) no mostró señal específica detectable en la región analizada (Fig. 7A-A2). En contraste, la sonda antisentido reveló una señal puntiforme de color morado enriquecida en el territorio correspondiente al ARC, adyacente al piso del tercer ventrículo (3V) y con mayor presencia hacia la porción ventral del núcleo (Fig. 7B-B2). En las ampliaciones (Fig. 7B1-B2) se observaron células positivas con diferente intensidad y patrón de señal (flechas), lo que es compatible con una expresión heterogénea del receptor en el ARC. En base a estos hallazgos, se realizaron análisis complementarios con marcadores celulares específicos para definir los tipos celulares que expresan este HCAR1.

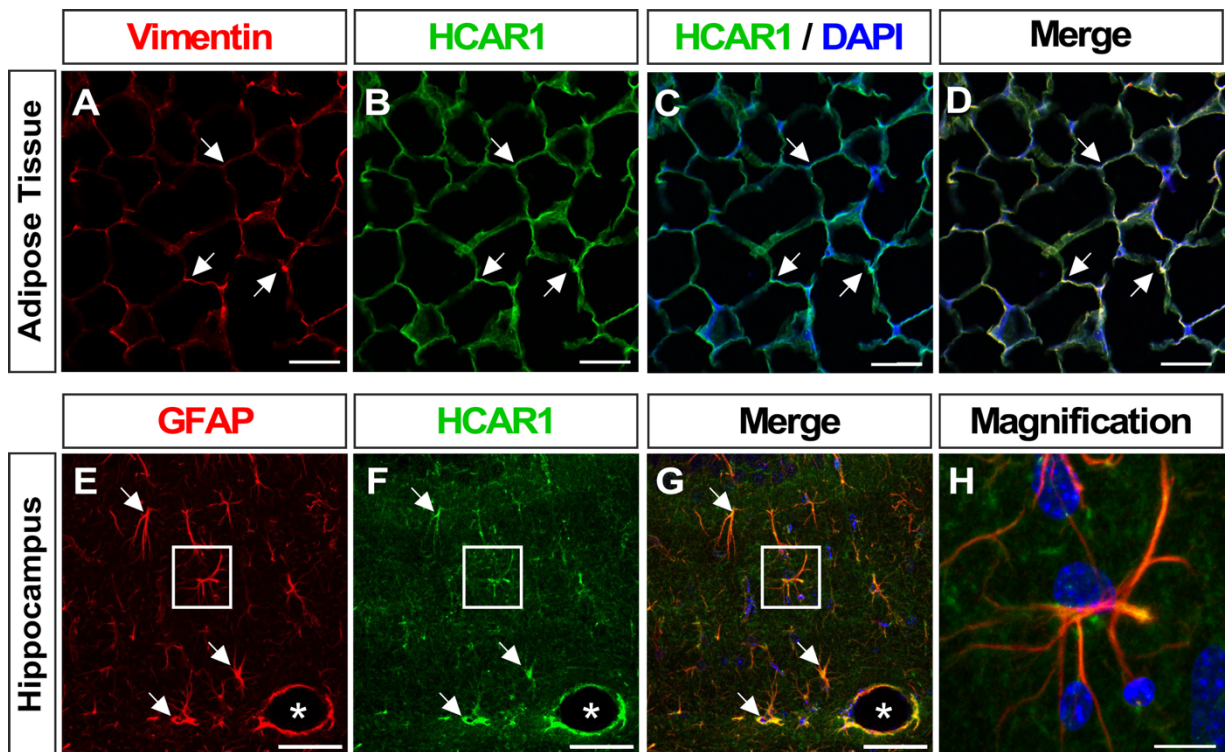


Figura 6. HCAR1 se localiza ampliamente en tejido adiposo y en astrocitos del hipocampo de ratón.

(A-D) El tejido adiposo visceral se procesó mediante inmunofluorescencia con vimentina (rojo, **A**), codistribuida con HCAR1 (verde, **B**) y DAPI como marcador nuclear (azul, **C-D**). Barra de escala: 100 μm (A-D). (E-H) Cortes coronales de cerebro de ratón se procesaron mediante inmunohistoquímica para el marcador astrogliar GFAP (rojo, **E**), HCAR1 (verde, **F**) y DAPI como marcador nuclear (azul, **G-H**). Las flechas blancas indican la codistribución de ambos marcadores proteicos. El recuadro mostrado en E-G se amplió en H. Barra de escala: 50 μm (E-G) y 10 μm (H).

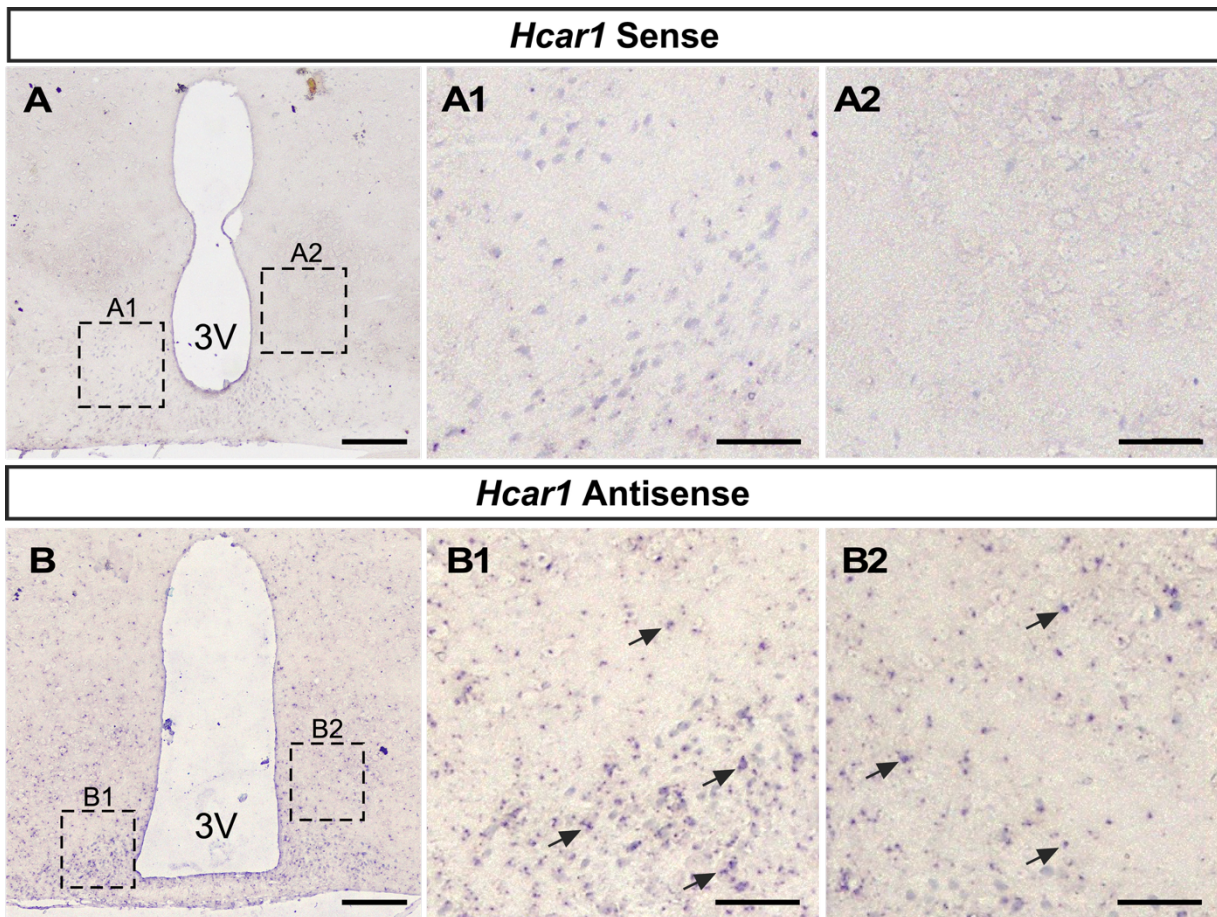


Figura 7. Detección del ARNm de Hcar1 en el núcleo arqueado (ARC) mediante hibridación in situ.

(**A-A2**) Control negativo: incubación de sonda sentido para HCAR1. (**B-B2**) Incubación con sonda antisentido para HCAR1 mostrando señal cromogénica puntiforme (morado) enriquecida en el ARC adyacente al piso del tercer ventrículo (3V) y el área ventral del ARC. Las flechas en (B1-B2) señalan ejemplos de células positivas con diferente morfología e intensidad de señal. Barras de escala: 400 μ m (A y B), 100 μ m (A1-2 y B1-2).

2. Distribución de HCAR1 en hipocampo e hipotálamo de ratón.

Para determinar la distribución de HCAR1 en el hipocampo, se realizaron análisis de inmunofluorescencia en ratones transgénicos POMC-GFP (Fig. 8). En la zona subgranular del giro dentado, las neuronas GFP positivas (magenta) no presentaron inmunorreactividad detectable para HCAR1 (Fig. 8A, verde). Este hallazgo es consistente con observaciones previas de nuestro laboratorio en neuronas hipotalámicas del mismo modelo transgénico, en las que tampoco se detectó el receptor en neuronas POMC (Órdenes et al., 2021).

Para examinar la localización glial de HCAR1, se empleó GFAP (rojo) como marcador de astrocitos, junto con DAPI para la delimitación nuclear y estructural del giro dentado (Fig. 8B–C). La señal de HCAR1 mostró un patrón de distribución superpuesto con procesos de astrocitos, particularmente en regiones cercanas a la capa granular del giro dentado. En las figuras 8A`-C` las flechas muestran astrocitos que expresan HCAR1, mientras que las cabezas de flecha señalan astrocitos sin señal aparente del receptor de lactato. Este análisis cualitativo reveló que HCAR1 no se localiza en todos los astrocitos hipocampales, lo que sugiere una distribución selectiva del receptor en la población glial. El análisis cuantitativo de codistribución se llevó a cabo con el software QuPath, mediante la proyección de máxima intensidad de diferentes planos de imágenes de microscopía confocal. El análisis reveló una proporción del $57,43 \pm 5,79$ % de astrocitos HCAR1 positivos, distribuidos de manera uniforme en las distintas secciones coronales evaluadas (Fig. 8D). Este patrón de

localización parcial sugiere la existencia de subpoblaciones de astrocitos que pueden o no responder a lactato vía señalización extracelular.

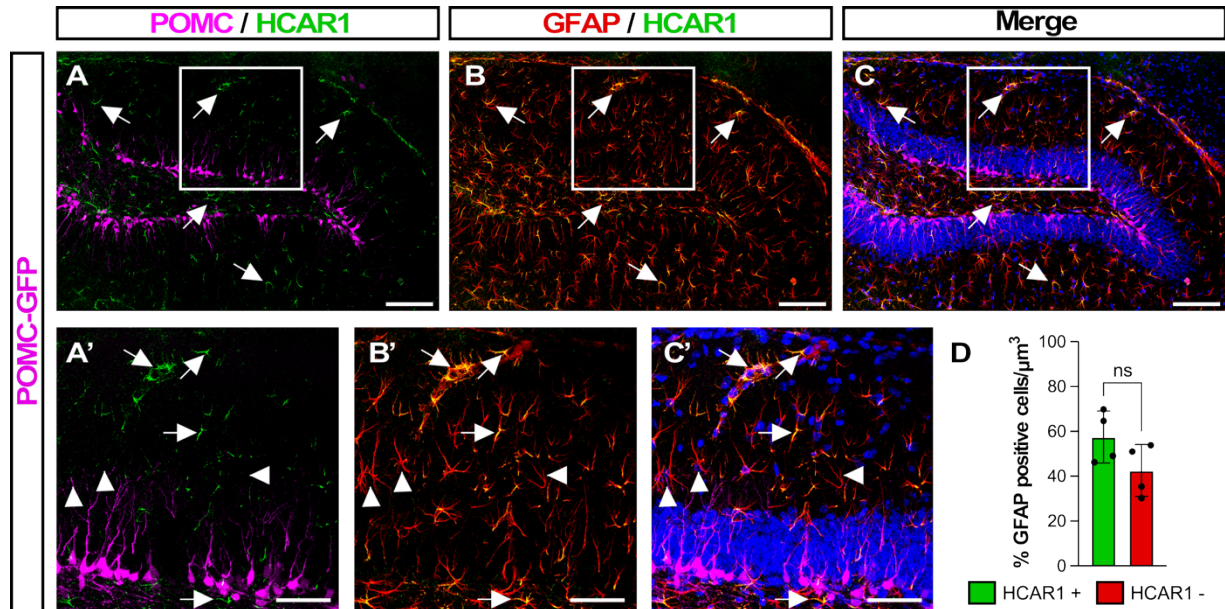


Figura 8. Localización de HCAR1 en el hipocampo de ratones POMC-GFP.

(A–C) Imágenes de inmunofluorescencia confocal que muestran la expresión de HCAR1 (verde) en el giro dentado del hipocampo. (A) Neuronas GFP positivas (magenta) que no presentan colocalización con HCAR1. (B) El comarceaje con GFAP (rojo) permite identificar astrocitos que expresan HCAR1, señalados con flechas blancas. (C) Imagen combinada con DAPI (azul). Los recuadros en A–C indican las áreas ampliadas en A’–C’, donde se muestran astrocitos con señal positiva (flechas) y negativa (cabezas de flecha) para HCAR1. (D) Porcentaje de astrocitos GFAP positivos con inmunorreactividad para HCAR1 en secciones coronales del hipocampo. Barras de escala: 50 μm . Los datos se presentan como media \pm SD. N=4.

Dado que el hipotálamo responde a señales metabólicas derivadas de la glucosa como el lactato nos centramos en analizar la distribución de HCAR1 en el ARC, donde se concentran neuronas oxigénicas y anoxigénicas. Se realizaron estudios de inmunofluorescencia en dos líneas de ratones transgénicos: POMC-GFP y NPY-GFP (Fig. 9, magenta). En concordancia con los resultados obtenidos en hipocampo se corroboró la ausencia de HCAR1 en neuronas POMC y su localización en células positivas para GFAP (rojo) en el hipotálamo (Fig. 9A-D). No se detectó señal del receptor en las paredes del tercer ventrículo (3V), delimitadas por tanicitos, algunos de ellos GFAP positivos, ni en sus procesos (Fig. 9A-C). HCAR1 se encontró localizado en un subgrupo de astrocitos hipotalámicos (Fig. 9B-C, flechas; cabezas de flecha señalan astrocitos sin señal detectable del receptor)

Tomando en cuenta que la localización de HCAR1 no ha sido descrita previamente en neuronas NPY realizamos un acabado estudio de localización combinado con cell sorting, en ratones NPY-GFP (Fig. 9E-H, magenta). Se detectó HCAR1 en el contorno de algunas neuronas NPY; sin embargo, las ampliaciones revelaron que esta señal correspondía a algunas estructuras que eran a su vez GFAP positivas, sugiriendo que puede tratarse de astrocitos adyacentes a dichas neuronas. En esta misma región se identificó una señal intensa de HCAR1 en una estructura compatible con un vaso sanguíneo (Fig. 9F, asterisco). El análisis cualitativo indica que, al igual que en hipocampo, la expresión de HCAR1 en hipotálamo se restringe a una fracción de la población glial. La cuantificación en secciones coronales de ambos modelos transgénicos mostró una proporción de codistribución con GFAP del $69,54 \pm 5,65$ % (Fig. 9I), significativamente mayor que la población de astrocitos HCAR1

negativos. Además, se detectaron células positivas para HCAR1 en la eminencia media (ME), junto con una señal intensa del receptor en la zona ventral de esta estructura, donde se concentra una densa red de capilares fenestrados (Fig. 9J–L).

Con el fin de delimitar la extensión que alcanzan los tanicitos en la ME e identificar si a estos corresponde la intensa marca de HCAR1 en la zona ventral, analizamos la distribución de vimentina en rebanadas de ratones NPY-GFP (Fig. 9M–N, blanco). Los tanicitos vimentina positivos extienden sus procesos hacia el ARC y la parte más ventral de la ME, donde se encuentran los capilares fenestrados. Por lo anterior, empleamos CD31 como marcador de células endoteliales (Fig. 9O, verde), con el que identificamos una distribución similar en morfología y área para este marcador, a la obtenida previamente con HCAR1 (Fig. 9J–L). Debido a que la especie en la que fueron producidos los anticuerpos para HCAR1 y CD31, fue la misma, no logramos obtener imágenes de codistribución entre ambos marcadores, pero sí una caracterización de la región donde ambos presentan una amplia a intensa localización. Por lo anterior, se requiere procesar los tejidos con distintos marcadores de células endoteliales para identificar una posible codistribución con HCAR1 y determinar si existen diferencias en su localización entre capilares fenestrados y no fenestrados.

Finalmente, para esclarecer la posible expresión de HCAR1 en neuronas NPY, decidimos purificarlas del hipotálamo de ratones NPY-GFP mediante citometría de flujo (FACS, del inglés *Fluorescence-Activated Cell Sorting*; Fig. 9P–R). En el análisis de dispersión (FSC-A vs SSC-A) se evaluaron y compararon los perfiles de tamaño y granularidad de los eventos identificados en ratones NPY-GFP, respecto al control sin

células fluorescentes (ratón Wild Type) (Fig. 9P-Q). Los histogramas insertos en la Fig. 9P-Q muestran la intensidad de fluorescencia en el canal FITC, donde se identificó una población fluorescente en las muestras NPY-GFP, ausente en la muestra WT. Con esta información se seleccionó la población GFP positiva y se aislaron aproximadamente 1800 eventos hipotalámicos de cinco ratones NPY-GFP. Esta población describió un perfil homogéneo de pequeño tamaño y baja granularidad, coherente con un fenotipo neuronal. Posteriormente, se realizó RT-qPCR para cuantificar la expresión de HCAR1 en las células NPY-GFP sorteadas, encontrándose una expresión 30 veces mayor que la identificada en el extracto del hipotálamo completo.

En conjunto, estos resultados demuestran que HCAR1 presenta una distribución selectiva en el hipotálamo, principalmente en una subpoblación de astrocitos, así como en neuronas NPY y células endoteliales. No obstante, se desconoce cualquier mecanismo específico que implique la activación del receptor de lactato en cada una de estas poblaciones y su rol en la señalización metabólica hipotalámica.

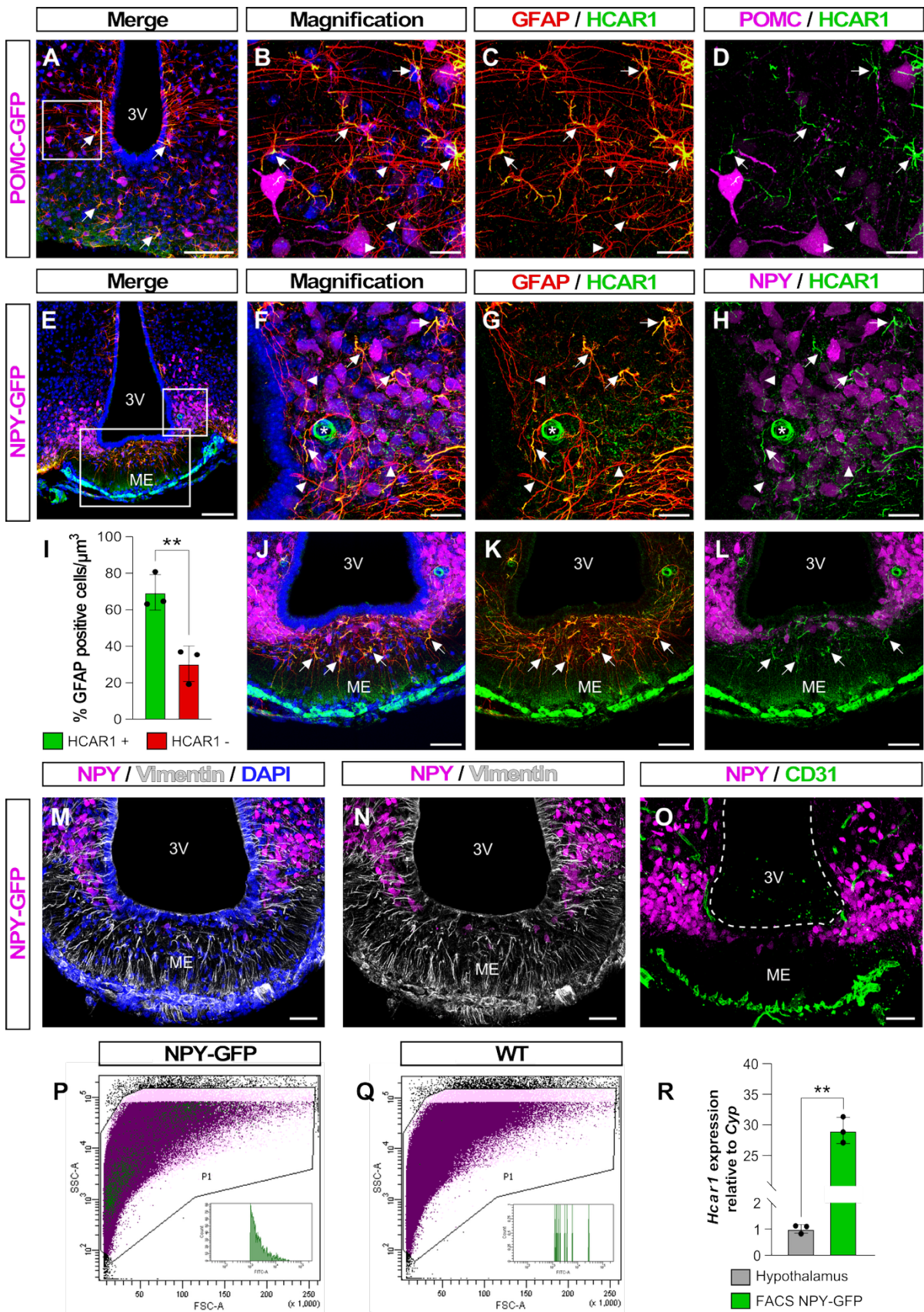


Figura 9. Distribución de HCAR1 en el hipotálamo de ratones POMC-GFP y NPY-GFP.

(A–D) Imágenes de inmunofluorescencia confocal que muestran la señal de HCAR1 (verde) en cortes coronales de hipotálamo de ratones POMC-GFP (magenta). El marcador GFAP (rojo) delimita astrocitos HCAR1 positivos (flechas blancas) y negativos (cabezas de flecha). (E–H) Imágenes de inmunofluorescencia de ratones NPY-GFP (magenta) que muestran la distribución de HCAR1 (verde) en ARC y eminencia media (ME), con notable ausencia en tanicitos que delimitan el tercer ventrículo (3V). Las ampliaciones (F–H) muestran la colocalización de HCAR1 con GFAP (rojo), mientras que no es evidente con neuronas NPY-GFP. El asterisco señala una estructura vascular con señal intensa para HCAR1. (I) Porcentaje de células GFAP positivas y negativas que presentan colocalización con HCAR1 en secciones coronales de hipotálamo. (J–L) Ampliaciones ME, donde se distingue la señal de HCAR1 en la región ventral, asociada a la red capilar fenestrada. (M–N) Distribución y proyección de procesos de tanicitos hacia el área ventral de ME (vimentina, blanco). (O) Implementación de CD31 (verde) como marcador de vasos sanguíneos para identificar una alta densidad de capilares en el área ventral de ME. (P–Q) Gráficos de comparación del tamaño y complejidad celular de neuronas GFP purificadas por FACS de los modelos NPY-GFP y WT, respectivamente. Los insertos corresponden a la distribución de la intensidad de FITC en los eventos sorteados. (R) qRT-PCR para evaluar la expresión de HCAR1 en muestras de hipotálamo total y en células sorteadas de ratones NPY-GFP. Barras de escala: 100 μm (A y E), 20 μm (B-D y F-H), 50 μm (J-L). Los datos se presentan como media \pm SD. **p < 0,01; n = 3.

3. Evaluación de la expresión y funcionalidad de HCAR1 en cultivos primarios de astrocitos hipotalámicos.

Dado que previamente no se habían realizado cultivos primarios de astrocitos hipotalámicos en nuestro laboratorio, procedimos a estandarizar su obtención a partir del núcleo arqueado (ARC) de ratones postnatales de cinco días (P5), empleando dos condiciones de cultivo distintas: DMEM y DMEM/F-12 (Fig. 10). El objetivo fue optimizar un sistema que permitiera obtener cultivos enriquecidos en astrocitos, considerando que en el hipotálamo predominan los tanicitos frente a otros tipos de glía.

Para evaluar la composición celular de cada condición, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia con los marcadores GFAP (verde) y vimentina (rojo), junto con tinción nuclear para determinar el número total de células (Fig. 10A-F). El cultivo en medio DMEM/F-12 produjo un incremento significativo en la proporción de células positivas para GFAP, alcanzando un $38,75 \pm 3,37 \%$, frente a $14,25 \pm 2,95 \%$ en las células mantenidas en DMEM (Fig. 10G). En contraste, no se registraron diferencias significativas en la proporción de células vimentina positivas entre ambos medios, con valores de $65,0 \pm 5,77 \%$ en DMEM/F-12 y $77,25 \pm 6,47 \%$ en DMEM (Fig. 10H). Asimismo, el porcentaje de células positivas para GFAP y vimentina se mantuvo sin cambios relevantes entre condiciones, con $26,00 \pm 4,55 \%$ en DMEM/F-12 y $10,75 \pm 1,25 \%$ en DMEM (Fig. 10I). En conjunto, estos resultados sugieren que el uso de DMEM/F-12 favorece la expansión de células con fenotipo compatible con astrocitos, sin alterar la proporción de células vimentina positivas.

Una vez optimizado el protocolo de cultivo primario de células del ARC con enriquecimiento en astrocitos, se evaluaron los niveles de expresión y localización del receptor HCAR1 (Fig. 11). Mediante RT-qPCR, se comparó la expresión relativa del receptor entre diferentes muestras provenientes de cerebro de ratón, normalizando a la expresión de HCAR1 en el hipotálamo total. La expresión de HCAR1 en el hipotálamo no mostró diferencias significativas en comparación con los cultivos de fibroblastos de meninges, empleados como control positivo ($95,64 \pm 0,03 \%$; $n = 5$). En contraste, los cultivos primarios de astrocitos del ARC presentaron una expresión significativamente menor que la observada en el hipotálamo completo ($45,13 \pm 0,05 \%$; $n = 5$) (Fig. 11A).

Posteriormente, se evaluó la distribución subcelular de HCAR1 en cultivos primarios de astrocitos del ARC mediante inmunofluorescencia (Fig. 11B–D). La señal del receptor (verde) se detectó en la membrana celular y también, como ha sido previamente descrito, en el núcleo (Mohammad Nezhady et al., 2023; Nezhady et al., 2025) mostrando codistribución con el marcador de filamentos intermedios, GFAP (rojo).

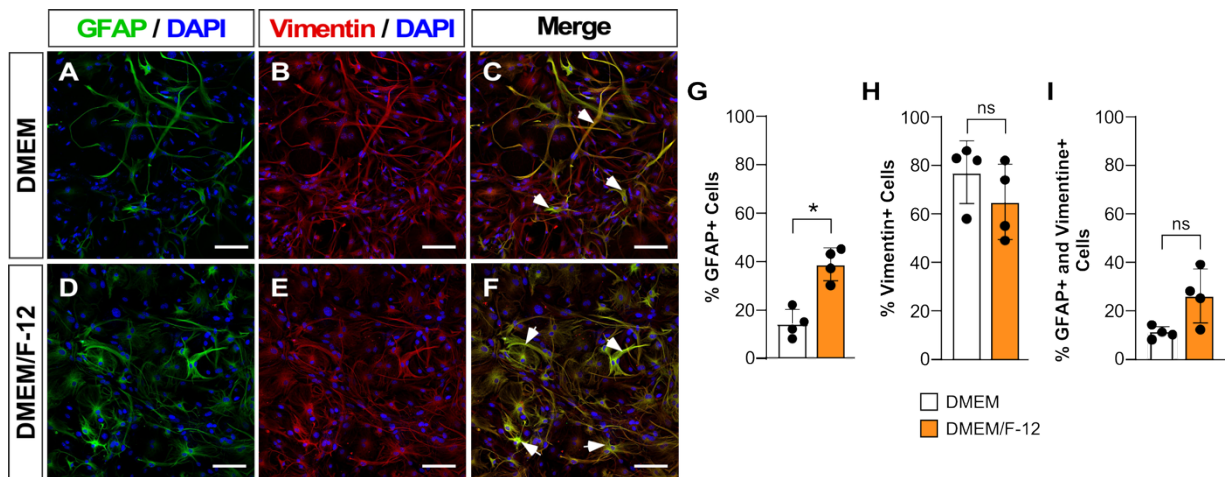


Figura 10. Estandarización del cultivo primario de astrocitos hipotálamicos.

(A–F) Imágenes de inmunofluorescencia de cultivos primarios de hipotálamo obtenidos de ratones P5, mantenidos en DMEM (A–C) o DMEM/F-12 (D–F). Las células fueron marcadas con GFAP (verde) y vimentina (rojo), y los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). (G–I) Porcentaje de células positivas para GFAP (G), vimentina (H) y ambos marcadores (I) en cada condición de cultivo. Los datos se presentan como media \pm SD. * $p < 0,05$. Barra de escala: 50 μ m. N=4 cultivos independientes.

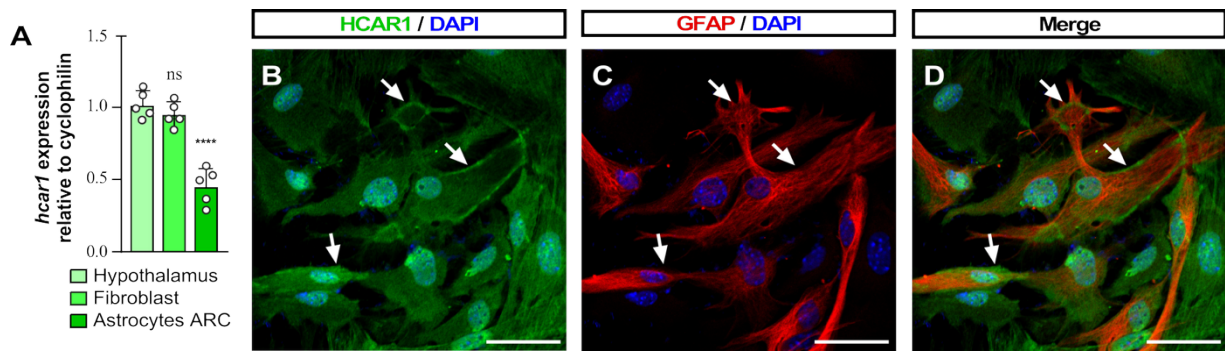


Figura 11. Expresión y localización de HCAR1 en astrocitos del núcleo arqueado.

(A) Expresión relativa de HCAR1 determinada por qRT-PCR en hipotálamo total, fibroblastos de meninges y cultivo primario de astrocitos del ARC. (C–F) Inmunofluorescencia en cultivos primarios del ARC que muestra la señal de HCAR1 (rojo), junto con vimentina (verde), GFAP (blanco) y DAPI (azul). Barra de escala: 50 μ m (C-F). Los datos se presentan como media \pm SD. **** $p < 0,001$. N=5.

Tras validar la expresión y localización de HCAR1 en cultivos de astrocitos hipotalámicos, utilizamos estos cultivos primarios para estudiar su funcionalidad. En una primera aproximación, realizamos mediciones de calcio intracelular ($[[Ca^{2+}]_i]$), como indicador de activación celular usando su ligando endógeno L-Lactato (Fig. 12). Los cultivos primarios fueron cargados con la sonda fluorescente Fluo-4 AM para registrar variaciones en la señal de calcio en respuesta a los agonistas endógeno y farmacológico de HCAR1, L-lactato y ácido 3-cloro-hidroxibenzoico (3CI-HBA), respectivamente (Fig. 12A-C). La aplicación de L-lactato indujo un aumento en la señal de $[[Ca^{2+}]_i]$ en el 85 % de los astrocitos analizados (17/20 células; Fig. 12A). En presencia del inhibidor general de transportadores de lactato 4-cinamato (4-CIN), el

79,16 % de las células mantuvo una respuesta positiva (19/24; Fig. 12B), mientras que la estimulación con 3CI-HBA activó al 83,33 % de los astrocitos (15/18; Fig. 12C). En todos los casos, la aplicación posterior del ionóforo A23187 se realizó como control positivo del incremento de $[(Ca^{2+})_i]$.

El análisis comparativo de la amplitud máxima de fluorescencia, expresada como $\Delta F/F_0$, no mostró diferencias significativas entre las condiciones (L-lactato: $0,34 \pm 0,03$; L-lactato + 4-CIN: $0,30 \pm 0,03$; 3CI-HBA: $0,35 \pm 0,03$; Fig. 12D). En contraste, el tiempo para alcanzar el máximo de activación varió entre tratamientos: los astrocitos estimulados con L-lactato se activaron a $148,10 \pm 5,64$ s, un valor significativamente mayor que en presencia de 4-CIN ($87,42 \pm 6,72$ s) o 3CI-HBA ($109,50 \pm 8,76$ s; Fig. 12E). Para integrar la magnitud total de la respuesta de calcio, se calculó el área bajo la curva (AUC) durante 5 min posteriores a la estimulación (Fig. 12F). El AUC no presentó diferencias significativas entre L-lactato ($1,48 \pm 0,02$ u.a.) y L-lactato + 4-CIN ($1,63 \pm 0,03$ u.a.), pero aumentó significativamente tras la adición de 3CI-HBA ($2,98 \pm 0,11$ u.a.). Estos resultados sugieren que la activación de HCAR1 induce un incremento de $[(Ca^{2+})_i]$ más rápido y sostenido en el tiempo, independiente del transporte de lactato.

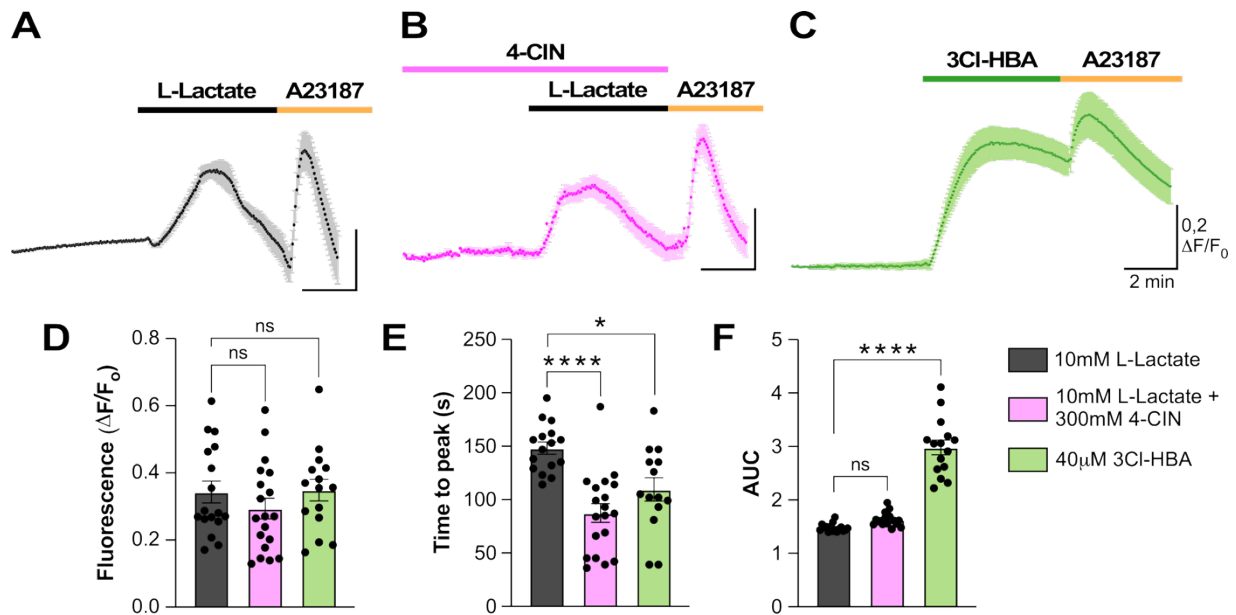


Figura 12. Activación funcional de HCAR1 en astrocitos hipotalámicos.

(A–C) Trazos representativos de cambios en $\Delta F/F_0$ de astrocitos en cultivo primario tras la aplicación de L-lactato (negro), L-lactato + 4-cinamato (4-CIN, rosa) y 3CI-HBA (verde). La adición de A23187 se utilizó como control positivo para el incremento de calcio (barra naranja). (D) Amplitud máxima de la señal ($\Delta F/F_0$) para cada condición. (E) Tiempo hasta el máximo $\Delta F/F_0$. (F) Área bajo la curva (AUC) posterior al estímulo. Los datos se presentan como media \pm SEM. *p < 0,05; ****p < 0,0001.

4. Modulación de la producción y liberación de lactato en cultivos de tancitos.

Se ha demostrado que los tancitos liberan lactato y este puede actuar sobre las neuronas POMC activándolas, sin embargo, HCAR1 no está expresado en neuronas, pero sí en astrocitos (Órdenes et al., 2021). Por tal razón, utilizamos cultivos de tancitos que reprogramamos metabólicamente para obtener los medios de cultivo y

evaluar los efectos de estos medios sobre los astrocitos. Con el propósito de modificar la expresión de proteínas involucradas en el metabolismo de glucosa y en la liberación de lactato desde tanicitos, se emplearon adenovirus previamente estandarizados en el laboratorio: AdshGKRP, para inhibir la expresión de la proteína reguladora de glucoquinasa (GKRP, blanco); AdshMCT4, para inhibir el transportador de monocarboxilatos tipo 4 (MCT4, morado); y AdshBGal como control (Fig. 13, negro). Los cultivos primarios de tanicitos fueron transducidos con las partículas adenovirales durante 72 h, posteriormente fueron suplementados con glucosa 10 mM por 1 h y, finalmente, fueron recolectados los medios condicionados de tanicitos (T^{CM}) para cada condición (Fig. 13A).

Para corroborar que los adenovirus cumplían la función para la que fueron diseñados, los niveles de mRNA de interés se evaluaron mediante RT-qPCR en tres cultivos independientes, confirmando una disminución significativa de GKRP y MCT4 en los tanicitos transducidos con AdshGKRP y AdshMCT4; con reducciones del 47 % y 42 %, respectivamente, en comparación con el control. La expresión de GFP, fue utilizada como control de transducción y no presentó diferencias significativas entre tratamientos (Fig. 13B). Con el fin de comprobar los efectos esperados en relación con la modulación de la producción y liberación de lactato, medimos la concentración de lactato en los T^{CM} mediante ensayo colorimétrico y esta fue normalizada por millón de células. Como muestra la Fig. 11C, los T^{CM} transducidos con el AdshBGal contienen $2,13 \pm 0,08$ nmol mientras que los T^{CM} transducidos con AdshGKRP contienen significativamente más lactato ($3,63 \pm 0,13$ nmol). Finalmente, los T^{CM} transducidos con AdshMCT4 presentaron una reducción significativa en la concentración de lactato

liberado ($1,22 \pm 0,08$ nmol). Estos medios condicionados fueron almacenados para su uso en experimentos funcionales posteriores.

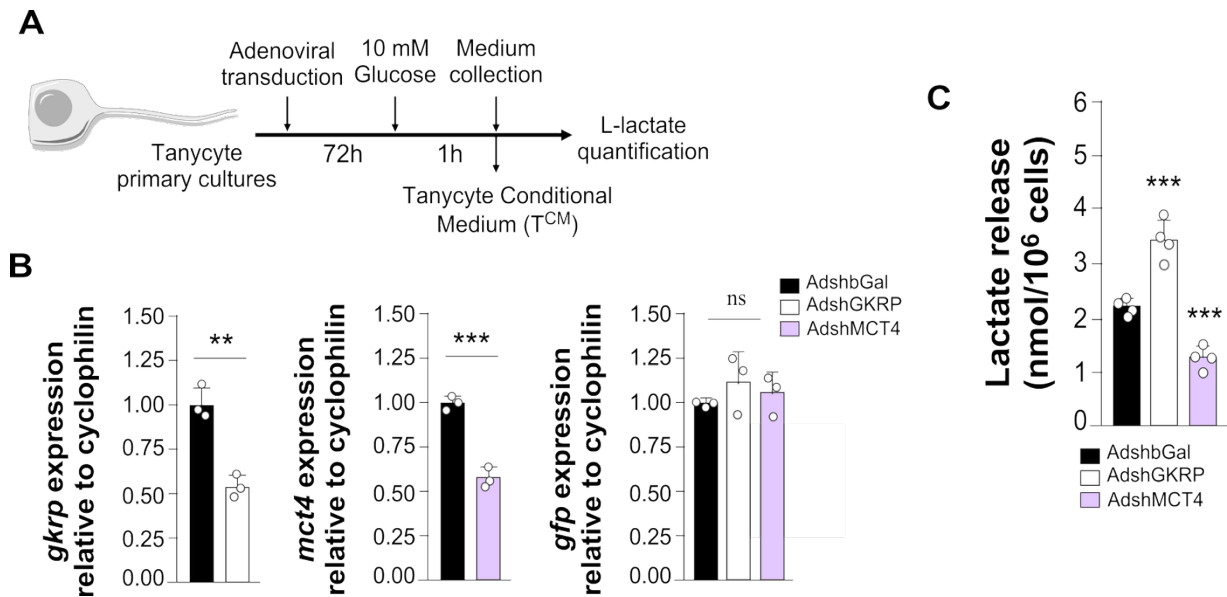


Figura 13. Inhibición selectiva de proteínas relacionadas con el metabolismo glucolítico en cultivos primarios de tanicitos.

(A) Esquema experimental del protocolo de transducción de cultivos primarios de tanicitos con adenovirus AdshBGal, AdshGKRP y AdshMCT4 (negro, blanco y morado, respectivamente). Tras 72 h de transducción y 1 h de exposición a glucosa 10 mM, se recolectaron los medios condicionados (TCM). (B) Expresión relativa de GKRP, MCT4 y GFP en tanicitos transducidos, normalizada a ciclofilina. N= 3. (C) Cuantificación del lactato liberado en los TCM, normalizado al número de células. Los datos se presentan como media \pm SD. N=4. **p < 0,01; ***p < 0,001.

5. La modulación del lactato derivado de tanicitos altera la activación de calcio en astrocitos hipotalámicos dependiente de HCAR1

Con el fin de analizar si el lactato presente en los T^{CM} modula la actividad funcional de los astrocitos hipotalámicos a través de HCAR1, se evaluaron los cambios en la $[(Ca^{2+})_i]$ inducidos por los medios condicionados (Fig. 14). Para comprobar que el efecto de estos T^{CM} es sobre el receptor se emplearon cultivos de astrocitos transfectados con siRNA específico contra HCAR1 (siHCAR1) o control negativo (-Ctrl). 48 h post-transfección, la población siHCAR1 presentó una reducción del 65 % en la expresión de HCAR1 respecto al control (n = 3 por condición; Fig. 14B).

Los T^{CM} fueron aplicados a cultivos de astrocitos -Ctrl (trazos negros) y siHCAR1 (trazos rojos), previamente cargados con el indicador fluorescente de calcio Fluo-4 AM, registrando las variaciones de fluorescencia como $\Delta F/F_0$ durante la estimulación. Adicionalmente, para cada condición se aplicó KCl 80 mM como control positivo del incremento de $[(Ca^{2+})_i]$. Tras la incubación del T^{CM} AdshBGal en astrocitos -Ctrl y siHCAR1 (Fig. 14C n = 15 células por grupo), no se evidenciaron diferencias significativas en la amplitud máxima del $\Delta F/F_0$ entre ambos grupos (Fig. 14D; $0,189 \pm 0,015$ y $0,177 \pm 0,031$, respectivamente). Sin embargo, el tiempo requerido para alcanzar la amplitud máxima fue significativamente mayor en astrocitos siHCAR1 ($260,4 \pm 12,20$ s) que en los atrocitos -Ctrl ($199,8 \pm 6,35$ s) (Fig. 14E). El análisis del área bajo la curva (AUC) no mostró diferencia significativa entre condiciones, con valores arbitrarios de $3,08 \pm 0,26$ para astrocitos -Ctrl y de $2,39 \pm 0,25$ para astrocitos shHCAR1 (Fig. 14F).

Luego de la incubación en astrocitos -Ctrl y shHCAR1 del T^{CM} AdshGKRP (Fig. 14G), que como se evidenció en la figura 13C, contiene una mayor concentración de lactato, se encontró una disminución significativa en la amplitud del $\Delta F/F_0$ en astrocitos shHCAR1 (Fig. 13H; $0,289 \pm 0,009$; n = 15), comparada con astrocitos -Ctrl (Fig. 14H; $0,165 \pm 0,016$; n = 21). Por otra parte, no existió diferencia significativa en el tiempo transcurrido para alcanzar la amplitud máxima; $180,7 \pm 15,46$ s para los astrocitos -Ctrl y $171,8 \pm 13,20$ s para los astrocitos shHCAR1 (Fig. 14I). Al analizar el AUC de astrocitos shHCAR1 ($1,31 \pm 0,096$), se identificó una disminución significativa respecto a los astrocitos -Ctrl ($1,76 \pm 0,044$), sugiriendo una reducción tanto en la magnitud como en la duración de la activación astrogliar (Fig. 14J). Concordante con un efecto mediado por el receptor.

Finalmente, tras la incubación con una menor concentración de lactato del T^{CM} AdshMCT4 en astrocitos -Ctrl y shHCAR1 (Fig. 14K), no se encontraron diferencias significativas en la amplitud del $\Delta F/F_0$ en astrocitos shHCAR1 ($0,289 \pm 0,009$; n = 18), comparada con astrocitos -Ctrl ($0,165 \pm 0,016$; n = 12) (Fig. 14L). Por otra parte, se observó una disminución significativa del tiempo transcurrido para alcanzar la amplitud máxima en astrocitos shHCAR1 ($105,4 \pm 12,90$ s) en comparación con los astrocitos Ctrl ($205,5 \pm 11,86$ s) (Fig. 14M). Sin embargo, al analizar el AUC no se encontraron diferencias significativas entre astrocitos -Ctrl y shHCAR1 ($1,52 \pm 0,097$ y $1,40 \pm 0,068$) (Fig. 14N).

En conjunto, estos resultados indican que el lactato liberado por tunicitos, especialmente en una concentración mayor obtenida mediante la inhibición de GKRP,

incrementa la $[(Ca^{2+})_i]$ dependiente de HCAR1 en astrocitos hipotalámicos. Asimismo, la reducción del lactato liberado tras la inhibición de MCT4 en tanicitos, disminuye la activación de astrocitos, lo que sugiere que la disponibilidad de lactato extracelular es determinante para la activación astrogliar mediada por HCAR1.

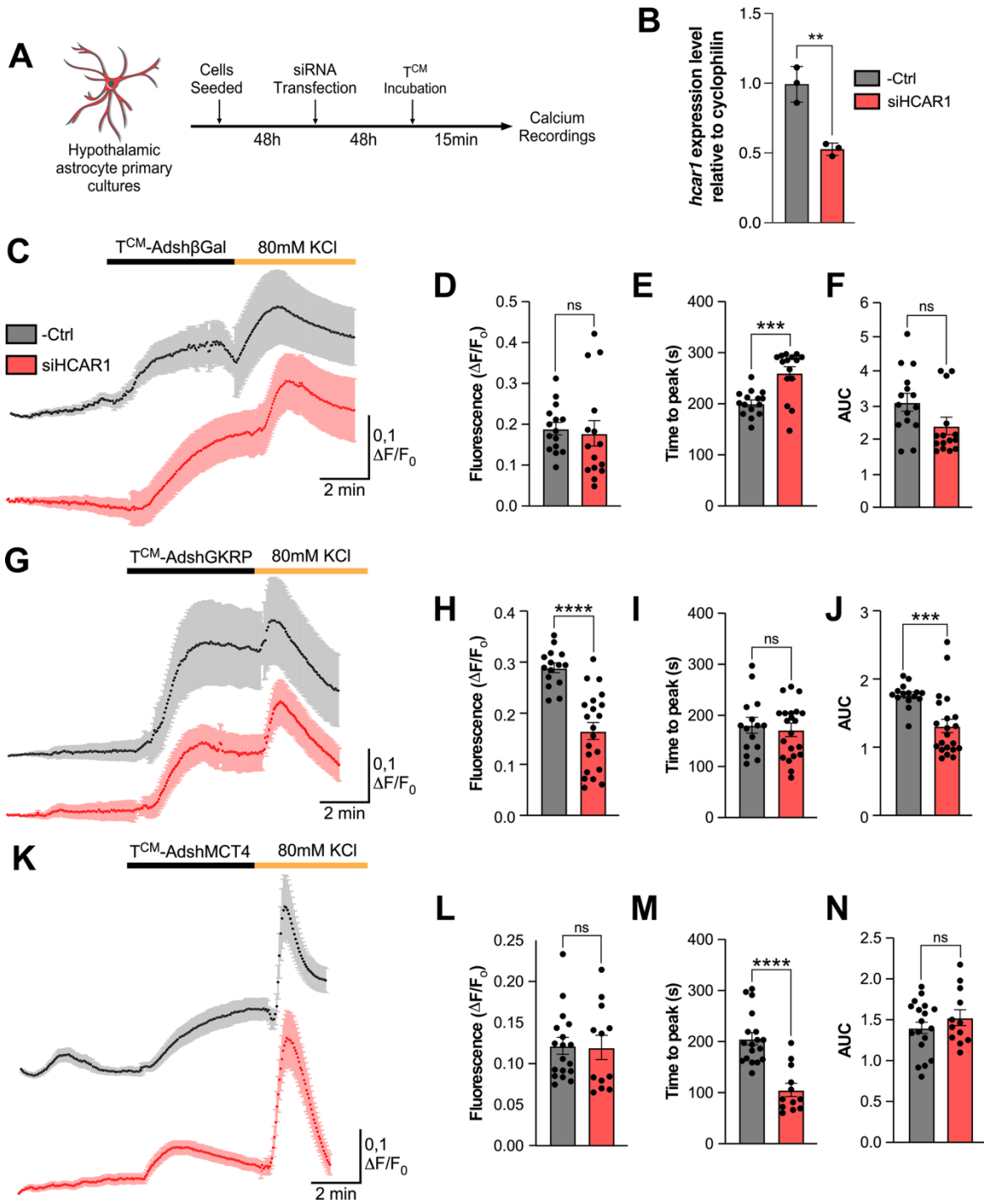


Figura 14. Activación de astrocitos hipotalámicos inducida por medios condicionados de tanicitos (T^{CM}).

(A) Esquema experimental del protocolo de transfección de cultivos primarios de astrocitos con siRNA control (-Ctrl en gris) o contra HCAR1 (siHCAR1 en rojo), seguido de la estimulación con medios condicionados de tanicitos (T^{CM}). (B) Expresión relativa de HCAR1 en ambas poblaciones celulares tras 48 h de transfección (n = 3 por condición). (C) Trazos promedio de $\Delta F/F_0$ obtenidos en astrocitos control y siHCAR1 tras la aplicación de T^{CM} de tanicitos transducidos con Adsh β Gal, AdshGKRP (G) o AdshMCT4 (K) (barra negra). La adición de KCl se utilizó como control positivo del incremento de calcio (barra naranja). (D-F) Análisis cuantitativo de la amplitud máxima ($\Delta F/F_0$), tiempo al máximo $\Delta F/F_0$ y área bajo la curva (AUC) de las respuestas de calcio para los T^{CM} ; Adsh β Gal, AdshGKRP (H-J) y AdshMCT4 (L-N). Los datos se presentan como media \pm SEM. ***p < 0,001; ****p < 0,0001.

6. Liberación de glutamato inducida por la activación de HCAR1 en cultivos de astrocitos hipotalámicos.

Para evaluar si la activación de HCAR1 en astrocitos hipotalámicos induce la liberación de glutamato, se emplearon cultivos primarios transfectados con siRNA control (-Ctrl) o específico contra HCAR1 (siHCAR1) y se compararon las concentraciones de glutamato en el medio extracelular, tras la estimulación con agonistas del receptor o con los medios condicionados de tanicitos obtenidos previamente (T^{CM}) (Fig. 15A). Se ha postulado a los hemicanales formados por

conexinas (Cx), como el principal medio de liberación de gliotransmisores; por lo cual evaluamos mediante RT-qPCR la expresión relativa de Cx30 y 43, normalizada a la expresión de Cx26, en cultivos primarios de astrocitos del ARC (Fig. 15B). Comparado con los niveles de ARNm de Cx26, la Cx30 presentó una abundancia 60 % menor ($0,39 \pm 0,12$), mientras que la Cx43 fue 12 veces más abundante ($12,57 \pm 1,58$).

La cuantificación del glutamato liberado tras la estimulación con L-lactato y 3CI-HBA mostró valores de $595,50 \pm 19,43$ pmol y $654,71 \pm 36,99$ pmol en astrocitos -Ctrl, respectivamente ($n = 3$). En las células siHCAR1, la liberación de glutamato tras la aplicación de L-lactato y 3CI-HBA, disminuyó significativamente a $178,73 \pm 15,86$ pmol y $74,44 \pm 12,71$ pmol, respectivamente. El glutamato basal no difirió entre -Ctrl y siHCAR1 ($13,54 \pm 1,86$ pmol frente a $15,66 \pm 2,29$ pmol) (Fig. 15C). Utilizando el péptido mimético D4 como inhibidor de hemicanales (barras azules), también se identificó una disminución significativa en la liberación de glutamato tras la estimulación con L-Lactato y 3CI-HBA ($66,81 \pm 3,95$ pmol y $57,38 \pm 7,42$ pmol, respectivamente); mientras que en la condición basal no hubo diferencias significativas frente a los demás cultivos ($28,68 \pm 1,97$ pmol).

Antes de emplear los T^{CM}, verificamos la concentración inicial de glutamato en dichos medios, sin encontrar diferencias significativas entre AdshBGal ($1,67 \pm 0,11$ pmol, en negro), AdshGKRP ($1,75 \pm 0,15$ pmol, en blanco) y AdshMCT4 ($1,21 \pm 0,11$ pmol, en morado) ($n = 4$ por condición; Fig. 15D). Posteriormente, la incubación con T^{CM} mostró una reducción significativa en el glutamato liberado por astrocitos siHCAR1 comparado con astrocitos -Ctrl incubados con los medios AdshBGal ($13,31 \pm 1,43$ pmol

vs. $31,41 \pm 6,41$ pmol) y AdshGKRP ($15,35 \pm 1,34$ pmol vs. $71,98 \pm 5,03$ pmol) ($n = 4$ cultivos por condición). En cambio, los T^{CM} procedentes de tanicitos AdshMCT4 no produjeron diferencias significativas entre las dos poblaciones celulares (Fig. 15E; $15,11 \pm 1,89$ pmol en -Ctrl y $11,96 \pm 1,13$ pmol en siHCAR1) ($n = 4$ cultivos por condición).

Como ensayo funcional para evaluar cambios en la apertura de hemicanales, relacionados con la liberación de gliotransmisores, se realizaron experimentos de captación de DAPI en cultivos primarios de astrocitos -Ctrl (trazos negros) y siHCAR1 (trazos rojos; Fig. 15F-H) ($n = 3$). Los registros consistieron en la incubación de ambas poblaciones de astrocitos con L-Lactato 10 mM (línea negra, Fig. 15F) o 3CI-HBA 40 μ M (Fig. 15G, línea verde), durante 10 min, donde se incubó D4 en los últimos 5 min (línea azul). Se calcularon variaciones en las pendientes en cada periodo de tiempo y se normalizaron a la pendiente calculada en la condición basal de cada condición, expresadas como porcentaje (línea discontinua, Fig. 15H). Los astrocitos -Ctrl incubados con lactato, mostraron un incremento significativo en la captura de DAPI hasta un $189 \pm 17,6$ %, el cual fue reducido tras la aplicación de D4 hasta un $19,51 \pm 2,13$ %. En contraste, en astrocitos siHCAR1, la incubación con lactato en ausencia o presencia de D4, no mostró diferencias significativas en la captura de DAPI ($92,37 \pm 6,63$ % y $65,68 \pm 3,82$ %, respectivamente). De manera similar, la incubación de astrocitos -Ctrl con 3CI-HBA, evidenció un incremento significativo en la captación de DAPI de hasta un $205,3 \pm 26,63$ %, reducido por D4 hasta un $26,58 \pm 6,76$ %. La incubación de 3CI-HBA en ausencia o presencia de D4 en astrocitos siHCAR1, no

mostró cambios significativos en la captación de DAPI ($80,71 \pm 4,22$ % y $41,03 \pm 2,85$ %, respectivamente).

En conjunto, estos resultados demuestran que la activación de HCAR1 en astrocitos hipotalámicos promueve la liberación de glutamato principalmente a través de hemicanales de Cx, un proceso dependiente de la inhibición de la expresión del receptor de lactato. La reducción significativa en la liberación de glutamato en astrocitos siHCAR1 confirma la participación directa de HCAR1 en este mecanismo. Además, la estimulación con medios condicionados provenientes de tanicitos con expresión modulada de proteínas metabólicas, sugiere que las variaciones en la liberación de lactato pueden modular la señalización glia-glia a través de HCAR1, reforzando su papel en la comunicación metabólica dentro del hipotálamo.

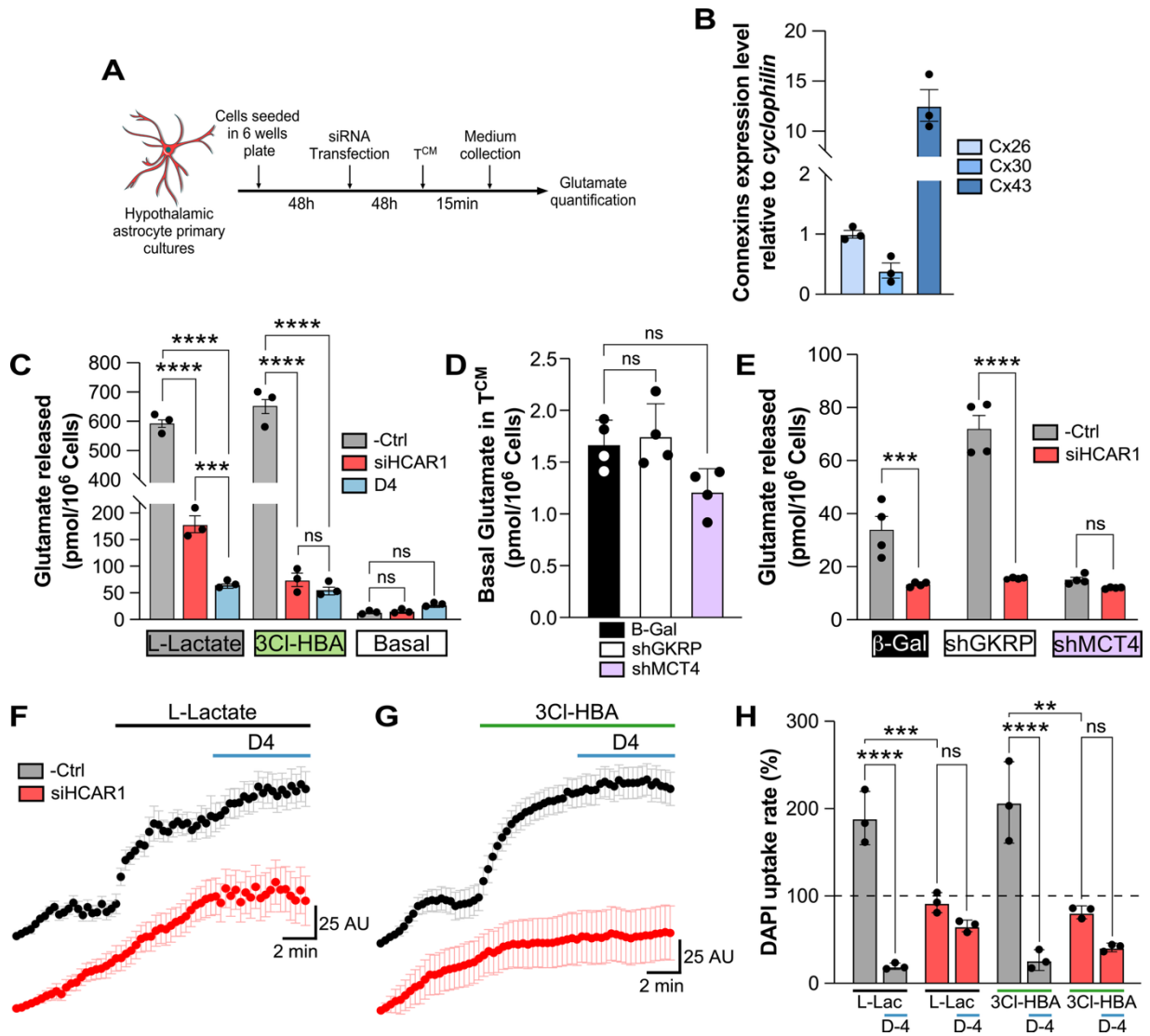


Figura 15. Efecto de la activación de HCAR1 sobre la liberación de glutamato en astrocitos hipotalámicos mediado por hemicanales de Cx43.

(A) Esquema experimental del protocolo de transfección de cultivos primarios de astrocitos con siRNA control (-Ctrl en gris) o contra HCAR1 (siHCAR1 en rojo), seguido de la estimulación con agonistas de HCAR1 o con medios condicionados de tanicitos (T^{CM}). (B) Expresión relativa de diferentes conexas (Cx) en cultivos primarios de astrocitos. (C) Cuantificación del glutamato liberado tras la estimulación con L-lactato,

3CI-HBA o en condiciones basales (n = 3 por condición). **(D)** Concentración basal de glutamato en los T^{CM} transducidos con AdshBGal (negro), AdshGKRP (blanco) o AdshMCT4 (morado). **(E)** Glutamato liberado por astrocitos -Ctrl y siHCAR1 tras la incubación con los distintos T^{CM} (n = 4 por condición). **(F-G)** Trazos representativos de captación de DAPI mostrando apertura de hemicanales tras la estimulación con L-Lactato (F) o 3CI-HBA (G) sobre cultivos de astrocitos -Ctrl, la cual fue inhibida por siHCAR1 y D4. **(H)** Cuantificación de la captación de DAPI mostrada en F y G. Los datos se presentan como media \pm SD. **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001.

7. Identificación de células en ARC sensibles a la activación de HCAR1

Con el fin de evaluar la interacción metabólica entre células gliales y neuronales *in situ*, analizamos la localización y respuesta de células en el ARC a la presencia de diferentes agonistas de HCAR1 (Fig. 16). Para ello, se obtuvieron rebanadas hipotalámicas de ratones C57BL/6 (WT) y se incubaron con el indicador fluorescente de calcio, Fluo-4 AM, registrando las variaciones de fluorescencia como $\Delta F/F_0$ durante la estimulación (Fig. 16A).

Las rebanadas hipotalámicas fueron incubadas con diferentes agonistas de HCAR1, como L-Lactato 10 mM (trazo negro), L-Lactato en presencia del inhibidor de MCTs, 4-CIN 300 μ M (trazo rosa), D-Lactato 10 mM (trazo morado) y 3CI-HBA 40 μ M (trazo verde) y se presentó el gráfico de una única célula representativa para cada condición (Fig. 16B-E). Se evaluaron entre 5 y 10 células por rebanada, en un total de 4 rebanadas independientes por condición. La incubación con L-Lactato incrementó la $[[Ca^{2+}]_i]$ en el 85 % de las células analizadas (17/20), mientras que la presencia de 4-

CIN redujo la proporción de células activadas al 37,5 % (9/24). La exposición a D-Lactato o 3CI-HBA produjo una activación del 39 % (9/23) y 40 % (10/25) de las células, respectivamente. Las células que no mostraron incremento en la fluorescencia permanecieron dentro del rango basal de actividad.

Para el análisis de la amplitud máxima y el tiempo de máximo $\Delta F/F_0$, se normalizaron los valores de los demás tratamientos respecto al $\Delta F/F_0$ de L-Lactato. La activación de HCAR1 con D-Lactato produjo un cambio en la $[(Ca^{2+})_i]$ significativamente menor que L-Lactato ($79,70 \pm 4,36$ %), mientras que la activación en presencia de 4-CIN no produjo cambios significativos ($96,12 \pm 6,99$ %). En contraste, la incubación con 3CI-HBA incrementó significativamente la amplitud de señal hasta un $155,2 \pm 4,94$ % (Fig. 16F). En cuanto al tiempo necesario para alcanzar la amplitud máxima luego de la estimulación con agonistas de HCAR1, no se encontraron diferencias significativas entre los enantiómeros L-Lactato y D-Lactato; $268 \pm 3,65$ s y $274 \pm 4,58$ s, respectivamente. De forma contraria, L-Lactato en presencia de 4-CIN, así como 3CI-HBA, activaron las células del ARC en un menor tiempo; $201 \pm 6,60$ s y $196 \pm 4,32$ s, respectivamente (Fig. 16G).

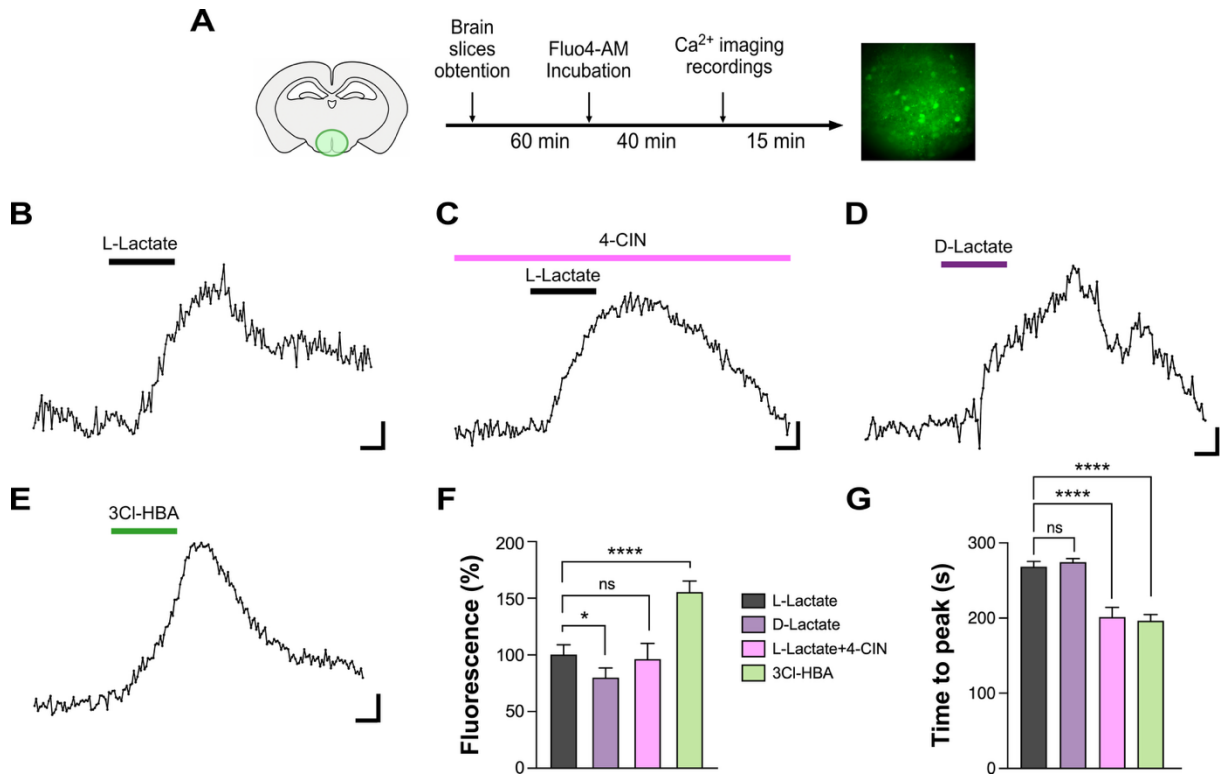


Figura 16. La activación de HCAR1 incrementa la dinámica de calcio en células del ARC, en rebanadas hipotalámicas.

(A) Representación esquemática de la determinación del calcio intracelular en rebanadas hipotalámicas cargadas con Fluo-4 AM. (B-E) Trazos representativos de $\Delta F/F_0$ en respuesta a L-Lactate (negro), L-Lactate + 4-CIN (rosa), D-Lactate (morado) and 3CI-HBA (verde). Barra de escala: 60 s y 0,1 $\Delta F/F_0$. (F) Amplitud de señal normalizada a L-Lactato. (G) Tiempo para alcanzar el máximo $\Delta F/F_0$. Datos representados como media \pm SEM. * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$.

Se ha descrito que algunos receptores acoplados a proteína G pueden desensibilizarse tras exposiciones repetidas o sostenidas de su ligando, lo que disminuye la actividad celular y evita una activación excesiva (Chen & Tesmer, 2022). Para evaluar posibles cambios en la sensibilidad de HCAR1 tras la activación consecutiva con diferentes agonistas, analizamos la dinámica de calcio en células del ARC sometidas a dos estímulos secuenciales en una misma región y en las mismas células (Fig. 17A). Para ello, las rebanadas hipotalámicas previamente cargadas con Fluo-4 AM fueron estimuladas con dos agonistas distintos, separados de un lavado de 10 min, empleando las concentraciones descritas en la figura anterior. En la primera condición, se aplicó L-Lactato en presencia de 4-CIN, seguido de una segunda estimulación con 3CI-HBA (Fig. 17B). En la segunda condición, las rebanadas fueron incubadas inicialmente con D-Lactato y posteriormente con 3CI-HBA (Fig. 17C).

La amplitud máxima de respuesta del $\Delta F/F_0$, se analizó de la misma forma descrita anteriormente, expresada como % de fluorescencia, normalizando la señal de 3CI-HBA respecto al agonista aplicado en primera instancia (Fig. 17D). En ambas condiciones, la segunda estimulación con 3CI-HBA produjo un aumento significativo en la amplitud de respuesta, alcanzando $137,4 \pm 7,54$ % con L-Lactato + 4-CIN y $152,1 \pm 4,27$ % con D-Lactato. Respecto al tiempo necesario para alcanzar la amplitud máxima, fue significativamente mayor en la incubación con D-Lactato que en la con 3CI-HBA ($269 \pm 6,60$ s y $203 \pm 5,00$ s, respectivamente), mientras que no hubo diferencias significativas cuando se incubó L-Lactato + 4-CIN con respecto a 3CI-HBA ($208 \pm 4,32$ s y $194 \pm 4,76$ s, respectivamente) (Fig. 17E).

En conjunto, estos resultados sugieren que HCAR1 modula de manera selectiva la actividad de un grupo de células del ARC, mostrando diferencias significativas en amplitud y cinética de acuerdo con el agonista empleado. Mientras que L-Lactato activa la mayoría de las células analizadas, 3CI-HBA induce respuestas de mayor magnitud y más rápidas, sugiriendo una activación directa del receptor. Adicionalmente, HCAR1 no se desensibiliza ante la adición consecutiva de diferentes agonistas, generando incrementos de Ca^{2+} en la misma magnitud que los agonistas por separado.

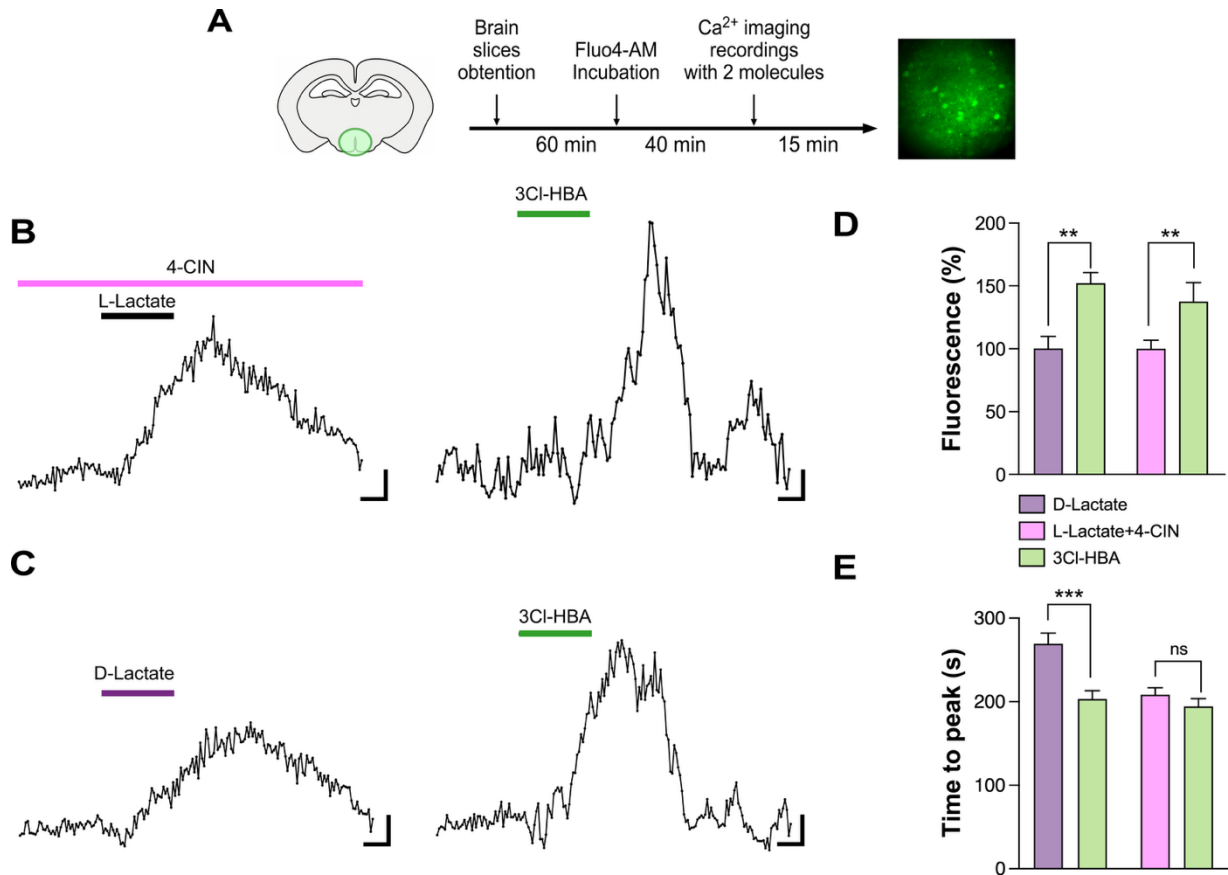


Figura 17. Activación secuencial de HCAR1 revela ausencia de desensibilización en células del ARC.

(A) Diseño experimental mostrando dos estimulaciones consecutivas. (B-C) Trazos representativos del $\Delta F/F_0$ de células estimuladas con L-Lactato + 4-CIN o D-Lactato, seguido de 3CI-HBA. Barra de escala: 60 s y 0,1 $\Delta F/F_0$. (D) Máxima amplitud normalizada a la primera estimulación. (E) Tiempo necesario para alcanzar la máxima amplitud de $\Delta F/F_0$ para cada agonista. Datos representados como media \pm SEM. **p < 0,01; ***p < 0,001.

8. Modulación de la dinámica intracelular de $[(Ca^{2+})_i]$ mediada por la activación de HCAR1 en astrocitos del ARC

A continuación, evaluamos los cambios en la $[(Ca^{2+})_i]$ específicamente en astrocitos de rebanadas hipotalámicas, obtenidas de ratones inyectados con dos AAV diferentes diseñados para favorecer la transducción de astrocitos (Fig. 18). Para ello, el sensor fluorescente de calcio GcaMP6f fue coinyectado mediante cirugía estereotáxica en ARC, junto con un AAV control (AAV-Scramble) o un AAV que contenía un *short hairpin* ARN dirigido contra HCAR1 y un reportero rojo (AAV-shHCAR1-). Posteriormente, se registraron los cambios en la dinámica de calcio en astrocitos del ARC incubados con agonistas de HCAR1, expresados como $\Delta F/F_0$ durante un periodo total de 16 min (Fig. 18A).

Con el fin de verificar la transducción de astrocitos, realizamos inmunofluorescencia en rebanadas de ratones inyectados con AAV-GcaMP6f (verde) o AAV-shHCAR1 (rojo), empleando GFAP como marcador astrogial (blanco). En ambas condiciones se identificaron astrocitos transducidos tras la colocalización con GFAP (flechas en Fig. 18B-C). En las rebanadas obtenidas de ratones coinyectados con las mezclas de AAVs, el análisis se restringió a los astrocitos que expresaban GcaMP6f y mCherry, observados en color amarillo (flechas en imagen de epifluorescencia, Fig. 18D). Finalmente, evaluamos la eficiencia del silenciamiento mediado por la inyección del AAV-shHCAR1 mediante RT-qPCR, identificando una disminución significativa del 65 % en la expresión de HCAR1, respecto al AAV-Scramble (rojo y negro, respectivamente, Fig. 18E).

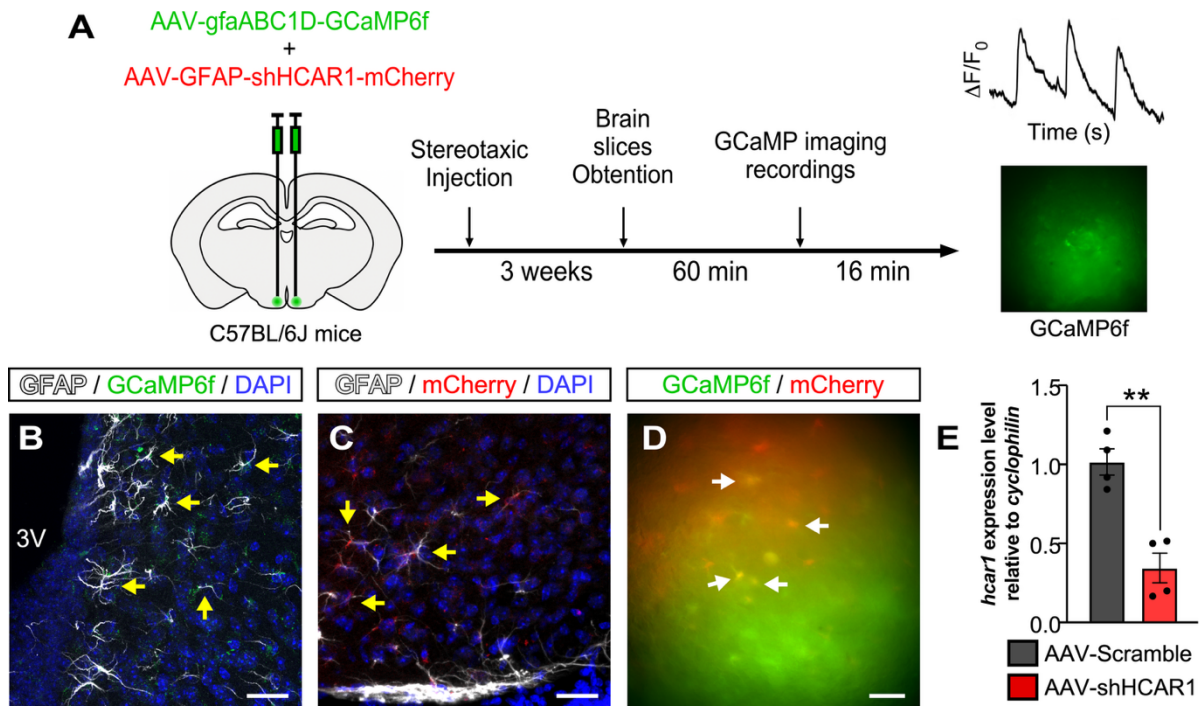


Figura 18. Evaluación de la expresión de GcaMP6f y el silenciamiento de HCAR1 en astrocitos del ARC mediado por AAVs.

(A) Esquema experimental de la coinyección de AAVs para transducir astrocitos del ARC y evaluación de su actividad tras la aplicación de agonistas de HCAR1. (B-C) Inmunofluorescencia de rebanadas hipotalámicas mostrando la transducción de astrocitos con AAV-GCaMP6f (verde) o AAV-shHCAR1 (rojo), identificados mediante colocalización con GFAP (blanco; flechas). (D) Astrocitos doblemente transducidos en ratones coinyectados con ambos AAVs, identificados por la señal combinada de GCaMP6f y mCherry (amarillo). (E) RT-qPCR mostrando una reducción significativa del 65 % en la expresión de HCAR1 en ratones inyectados con AAV-shHCAR1, frente al AAV-Scramble. Datos expresados como media \pm SEM; n = 4 ratones. **p < 0,01.

Una vez validada la coinyección de AAVs, analizamos los cambios en el $\Delta F/F_0$ de las dos poblaciones de astrocitos generadas: AAV-Scramble (Fig. 19A-D) y AAV-shHCAR1 (Fig. 19E-H). El registro tuvo una duración total de 16 min, dividido en 4 periodos iguales de 4 min (separados por líneas discontinuas en Fig. 19A y E), con el fin de identificar una activación temprana o tardía a lo largo del tiempo. Durante el primer periodo se registró la actividad basal; posteriormente, se incubó L-Lactato 10 mM durante el siguiente periodo (barra negra), seguido de dos periodos de lavado de igual duración. Para cada condición se analizaron al menos cuatro rebanadas hipotalámicas y un mínimo de diez células por rebanada.

Debido a la alta variabilidad de respuestas tras la adición de L-Lactato, los $\Delta F/F_0$ fueron representadas en mapas de calor, seleccionando las diez células con mayor variabilidad respecto a la actividad basal (según los criterios detallados en la sección de materiales y métodos). Para evaluar la dinámica temporal de la actividad, se normalizó la desviación estándar de cada periodo, con respecto al periodo basal; expresándola como veces de cambio (*fold change*) y se graficó en un mapa de calor independiente para cada condición (Fig. 19B y F).

En los astrocitos AAV-Scramble se observó una mayor amplitud de activación inducida por L-Lactato, junto con una distribución más homogénea tanto en la activación como en los periodos de lavado. En contraste, los astrocitos AAV-shHCAR1 exhibieron activaciones con menor amplitud y homogeneidad. Las flechas rojas en los mapas de calor indican un astrocito representativo de AAV-Scramble y AAV-shHCAR1 (Fig. 19C y G, respectivamente). En conjunto, fueron analizados un total de 41 astrocitos en la condición AAV-Scramble, de los cuales 13 mostraron incremento en

su actividad (31,70 %, Fig. 19D). En la condición AAV-shHCAR1 se analizaron 92 células y únicamente 12 incrementaron su actividad (13,04 %, Fig. 19H); lo que representa una disminución del 58,86 % en la proporción de astrocitos activados por L-Lactato, cuando HCAR1 es silenciado.

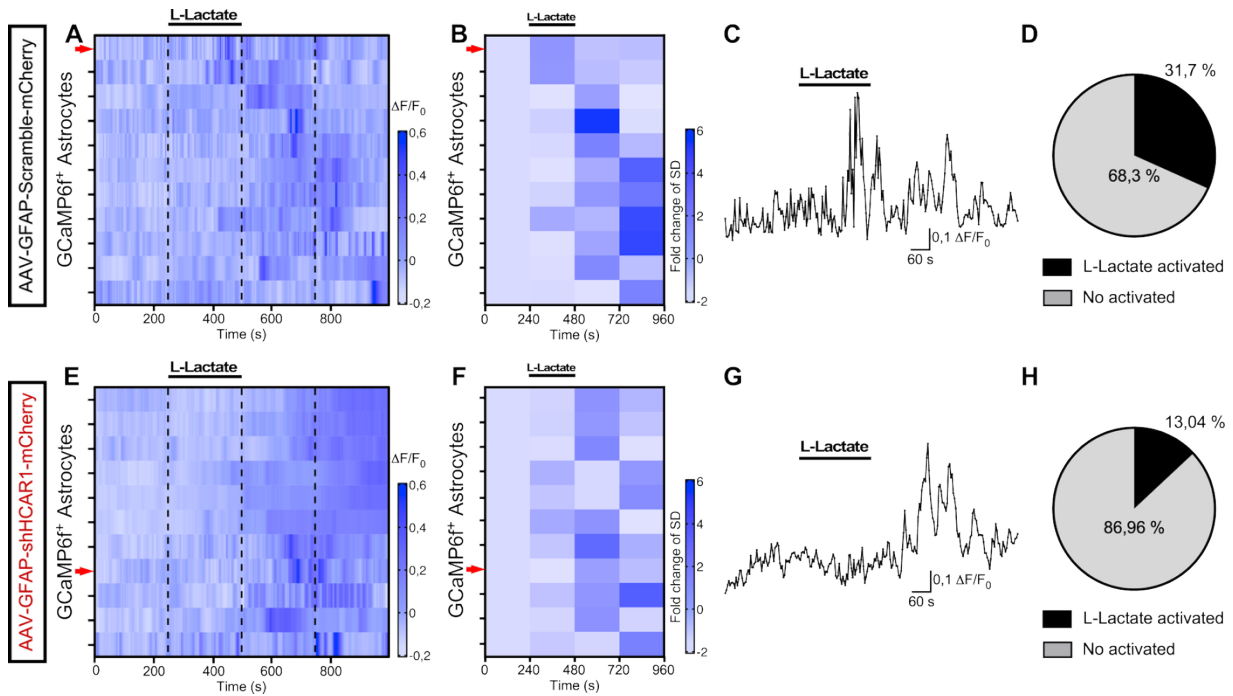


Figura 19. El silenciamiento de HCAR1 en astrocitos del ARC reduce la proporción y magnitud de activación por L-Lactato.

(A, E) Mapa de calor del $\Delta F/F_0$ durante 16 min en astrocitos AAV-Scramble y AAV-shHCAR1, respectivamente, dividido en cuatro periodos de 4 min (líneas discontinuas); el segundo periodo corresponde a la aplicación de L-Lactato 10 mM (barra negra). (B, F) Mapas de calor del *fold change* de la desviación estándar respecto al periodo basal para cada periodo experimental, mostrando las diez células con mayor variabilidad en cada condición. (C, G) Trazos representativos de un astrocito señalado con flecha roja en los mapas de calor. (D, H) Proporción de células activadas y no activadas por lactato en cada grupo de astrocitos.

Posteriormente, evaluamos la respuesta de las dos poblaciones de astrocitos generadas mediante AAV-Scramble y AAV-shHCAR1 frente al agonista farmacológico de HCAR1, 3CI-HBA 40 μ M (Fig. 20). Al igual que en el análisis anterior, se registraron cambios en el $\Delta F/F_0$ durante un periodo total de 16 min, dividido en cuatro intervalos consecutivos de 4 min (líneas discontinuas en Fig. 20A y E). El primer periodo correspondió a la actividad basal; el segundo, a la aplicación de 3CI-HBA; y los dos periodos restantes, al lavado. Para cada condición se analizaron al menos cuatro rebanadas hipotalámicas y un mínimo de diez células por rebanada.

Debido a la variabilidad observada entre células, los trazos de $\Delta F/F_0$ se representaron como mapas de calor, seleccionando las diez células con mayor variabilidad respecto al periodo basal. Para evaluar los cambios temporales en la actividad de calcio, se normalizó la desviación estándar de cada periodo con respecto al basal, expresándola como *fold change*, y se graficó para cada condición (Fig. 20B y F).

En los astrocitos AAV-Scramble, la aplicación de 3CI-HBA indujo un patrón de activación más rápido, principalmente durante el periodo de aplicación del agonista y en el segundo lavado. Por el contrario, los astrocitos AAV-shHCAR1 mostraron respuestas más lentas y heterogéneas, restringidas a los periodos de lavado y con una mínima activación ante la aplicación del agonista farmacológico. Los trazos representativos de un astrocito, por condición, se indican con flechas rojas en los mapas de calor (Fig. 20C y G). En conjunto, en la condición AAV-Scramble se analizaron un total de 56 células, de las cuales 13 mostraron un incremento en la

actividad inducida por 3CI-HBA (23,21 %, Fig. 20D). En contraste, en la condición AAV-shHCAR1 se analizaron 84 células y únicamente 12 mostraron un aumento en la actividad (14,28 %, Fig. 20H). Esto representa una disminución del 38,47 % en la proporción de astrocitos activados al reducirse la expresión de HCAR1, aun frente a un agonista farmacológico de alta afinidad.

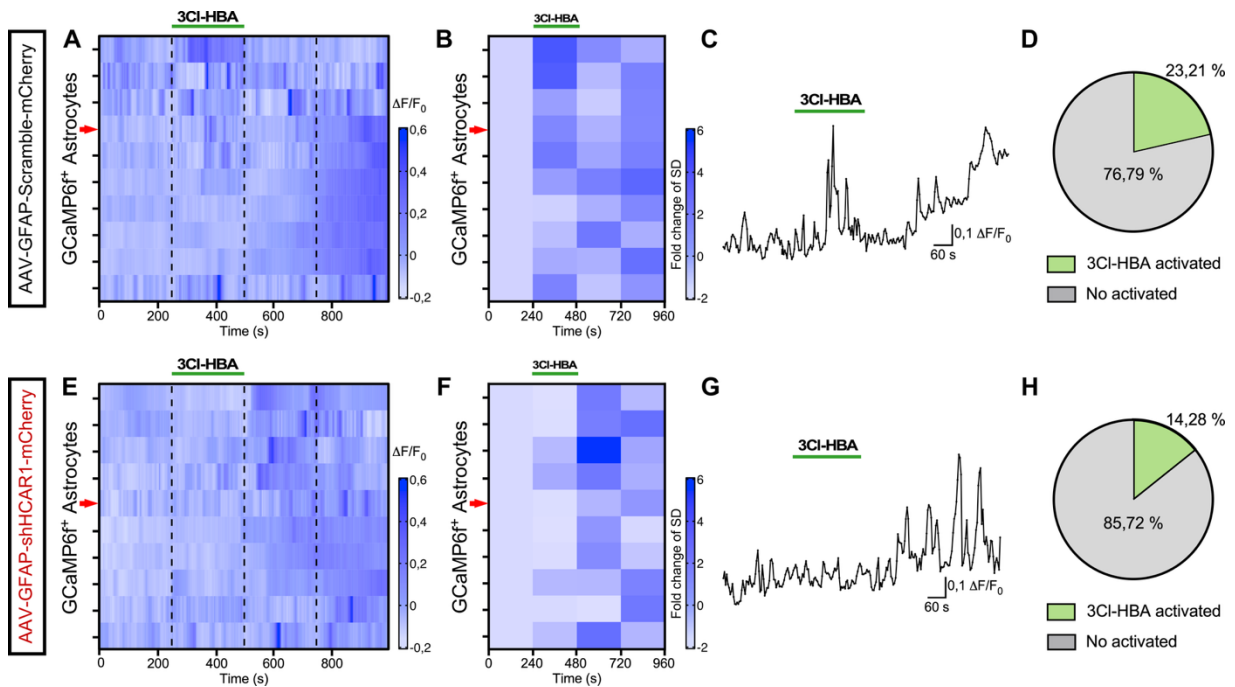


Figura 20. El silenciamiento de HCAR1 disminuye la proporción de astrocitos activados por 3CI-HBA en el ARC.

(A, E) Registros de $\Delta F/F_0$ durante 16 min en astrocitos AAV-Scramble y AAV-shHCAR1, respectivamente, divididos en cuatro periodos de 4 min (líneas discontinuas); el segundo periodo corresponde a la aplicación de 3CI-HBA (barra verde). (B, F) Mapas de calor del *fold change* de la desviación estándar en cada periodo, respecto al periodo basal, mostrando las diez células con mayor variabilidad por condición. (C, G) Trazos representativos de astrocitos señalados con flechas rojas en los mapas de calor. (D, H) Porcentaje de células activadas y no activadas por 3CI-HBA en cada condición.

Finalmente, evaluamos la respuesta de los astrocitos del ARC frente al enantiómero D-Lactato, el cual presenta una menor afinidad por HCAR1 que L-Lactato, permitiendo analizar la especificidad y sensibilidad del receptor en las dos poblaciones estudiadas (AAV-Scramble y AAV-shHCAR1) (Fig. 21). Al igual que en los experimentos previos, los registros de $\Delta F/F_0$ se realizaron durante un periodo total de 16 min, dividido en cuatro intervalos de 4 min (indicados por líneas discontinuas en Fig. 21A y E), correspondientes al periodo basal, la aplicación de D-Lactato y dos periodos consecutivos de lavado.

Para cada condición se analizaron al menos cuatro rebanadas hipotalámicas y un mínimo de diez células por rebanada. Dado que la aplicación de D-Lactato generó una respuesta heterogénea entre células, se representaron los cambios en $\Delta F/F_0$ como mapas de calor, seleccionando las diez células con mayor variabilidad respecto a la actividad basal (Fig. 21A y E). La evaluación temporal de la activación se realizó normalizando la desviación estándar de cada periodo con respecto al periodo basal, graficando el *fold change* para ambas condiciones (Fig. 21B y F).

En los astrocitos AAV-Scramble, D-Lactato indujo incrementos moderados pero consistentes en la actividad de calcio durante el periodo de estimulación (comparados con la activación de los agonistas anteriores), seguidos de un incremento progresivo durante el lavado. En contraste, en los astrocitos AAV-shHCAR1, la respuesta fue de menor intensidad y menos homogénea, observándose una menor amplitud de activación, restringida al periodo final de lavado. Las flechas en los mapas de calor indican un astrocito representativo de cada condición (Fig. 21C y G).

En total, se analizaron 31 astrocitos en la condición AAV-Scramble, de las cuales 8 mostraron un incremento en su actividad en respuesta a D-Lactato (25,80 %, Fig. 21D), mientras que en AAV-shHCAR1, se analizaron 80 astrocitos y solamente 12 se activaron con D-Lactato (15 %, Fig. 21H). Esto muestra un descenso del 41,9 % en la proporción de células activadas por D-Lactato tras el silenciamiento de HCAR1. Lo anterior sugiere una importante participación de HCAR1 en la señalización de calcio astroglial, aun cuando se trata de la activación por un ligando de menor afinidad.

En conjunto, estos resultados sugieren que la activación de HCAR1 por lactato y otros agonistas, modula la dinámica intracelular de calcio en astrocitos del ARC *in situ*. (Figuras 18-21).

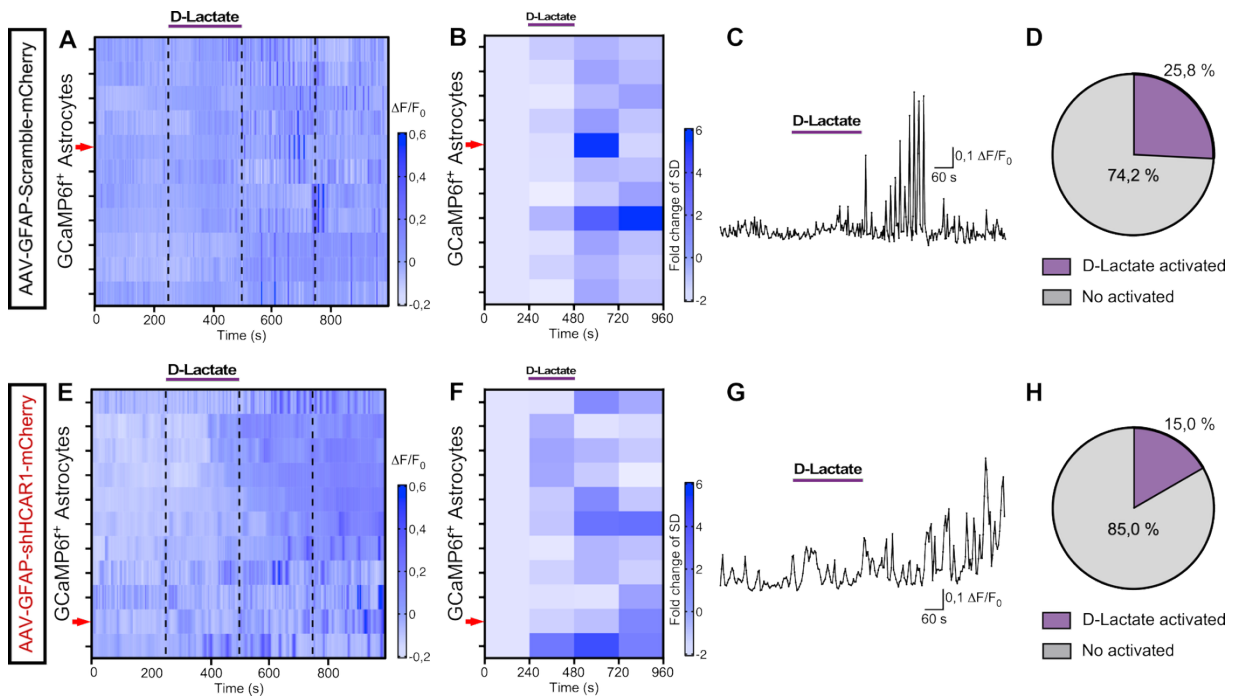


Figura 21. El silenciamiento de HCAR1 disminuye la activación astrogliol inducida por D-Lactato en el ARC.

(A, E) Registros de $\Delta F/F_0$ durante 16 min en astrocitos AAV-Scramble y AAV-shHCAR1, respectivamente, divididos en cuatro períodos de 4 min (líneas discontinuas). El segundo periodo corresponde a la aplicación de D-Lactato (barra morada). (B, F) Mapas de calor del *fold change* respecto al periodo basal, que muestran las diez células con mayor variabilidad por condición. (C, G) Trazos representativos de un astrocito, por condición, señalados con flechas rojas en los mapas de calor. (D, H) Porcentaje de células activadas y no activadas por D-Lactato en cada condición.

9. Activación astrogliar dependiente de HCAR1 tras metabolismo glucolítico en tanicitos.

Nuestro grupo de investigación y otros han demostrado que los tanicitos son células altamente glicolíticas, que *sensan* glucosa y liberan L-Lactato (Elizondo-Vega et al., 2016; R. Elizondo-Vega et al., 2020; Garcia et al., 2003; Lhomme et al., 2021; Orellana et al., 2012). Por tanto, para este trabajo de tesis fue relevante estudiar la participación de HCAR1 en la comunicación metabólica tanicito-astrocito en el ARC (Fig. 22).

Para lo anterior, realizamos la coinyección de AAVs, según se muestra en el esquema experimental de la figura 22A. Inicialmente, mediante inmunofluorescencia, identificamos la distribución de astrocitos del ARC (GFAP, verde) en estrecha cercanía a los procesos de tanicitos que se extienden desde las paredes del 3V (Fig. 22B; vimentina en rojo).

Con el fin de evaluar cambios en la $[(Ca^{2+})_i]$ exclusivamente en astrocitos que puedan estar recibiendo señales metabólicas de tanicitos, realizamos una inyección intracelular de glucosa (10 mM) en un tanicito único mediante una pipeta de *patch clamp*, manteniéndolo a un potencial de -80 mV en configuración de célula completa (*whole cell*). Inicialmente, para verificar la perfusión de glucosa hacia el tanicito, mezclamos la solución interna contenida en la pipeta con el marcador fluorescente Alexa Fluor 594 y luego de 10 min identificamos la dirección y proyección del proceso, así como su eventual difusión hacia otros tanicitos acoplados (Imagen de epifluorescencia, Fig. 22C). Una vez estandarizado este procedimiento, obtuvimos rebanadas hipotalámicas de ratones AAV-Scramble o AAV-shHCAR1, coinyectados

con AAV-GCaMP6f y, perfundimos glucosa 10 mM en un tanicito único, en combinación con Alexa Fluor 594 durante 10 min (Fig. 22D). Para verificar la estabilidad del sello del registro y la identidad electrofisiológica del tanicito, se realizaron rampas de voltajes hiperpolarizantes desde -100 mV hasta +100 mV, con aumentos de 10 mV, antes y después de cada experimento; observándose corrientes características que confirmaron la integridad del registro (Fig 22E).

Los cambios en el $\Delta F/F_0$ de los astrocitos que expresaban GcaMP6f, cercanos al proceso del tanicito perfundido (generalmente 2 o 3 astrocitos por rebanada), fueron registrados durante 10 min. Los astrocitos seleccionados para el análisis se identificaron con círculos de colores (Fig. 22D), mientras que su actividad de calcio se comparó con la de un astrocito lejano al proceso del tanicito (Fig. 22D señalado con un círculo negro). Los trazos representativos de astrocitos AAV-Scramble y AAV-shHCAR1 se muestran en las figuras 22F y G, respectivamente. Se analizaron un total de 16 astrocitos AAV-Scramble, mientras que en la condición AAV-shHCAR1 se analizaron 26. Puesto que en este experimento no se consideró un periodo basal, se calculó el AUC de cada astrocito analizado en ambas condiciones y se normalizó respecto del AUC del astrocito Ctrl de cada rebanada (Fig. 22H). El AUC de astrocitos AAV-Scramble fue $4,72 \pm 0,52$ veces mayor que la de astrocitos Ctrl, mientras que en astrocitos AAV-shHCAR1, fue $2,74 \pm 0,25$ veces mayor que los astrocitos Ctrl. De manera interesante, la actividad de astrocitos AAV-Scramble fue significativamente mayor a la de los AAV-shHCAR1, en un 72 %; sugiriendo que el incremento de calcio intracelular en el astrocito, después de estimular con glucosa el tanicito, es mediado por HCAR1.

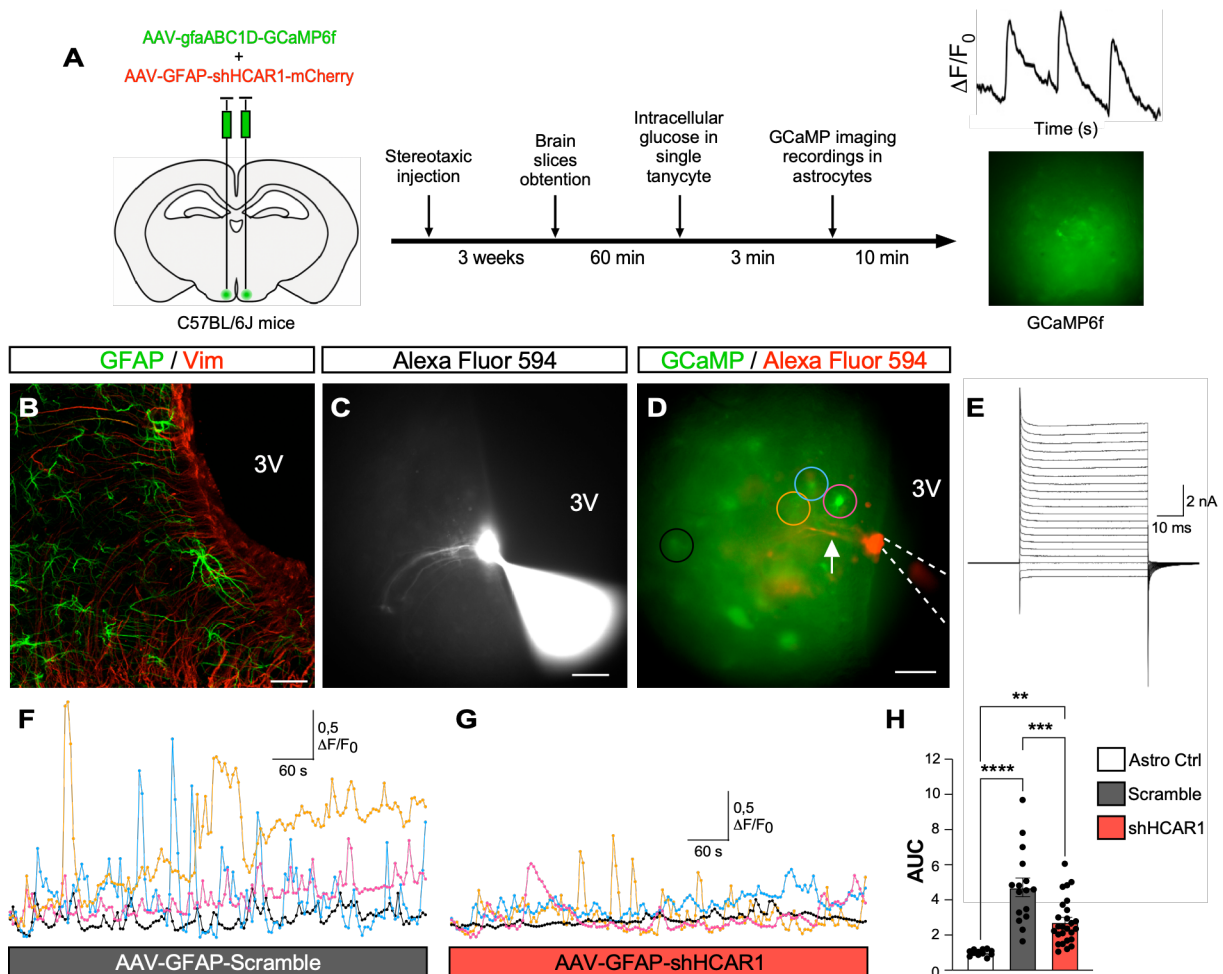


Figura 22. La activación de astrocitos del ARC inducida por la perfusión de glucosa en tancito único depende de la expresión de HCAR1.

(A) Esquema experimental del protocolo de coinyección de AAV-gfaABC1D-GCaMP6f y AAV-shHCAR1-mCherry en ratones C57BL/6J, para registros simultáneos de *patch clamp* y calcio. (B) Inmunofluorescencia mostrando astrocitos del ARC (GFAP, verde) en estrecha proximidad a procesos de tancitos que delimitan el tercer ventrículo (3V; vimentina en rojo). (C) Verificación de la perfusión intracelular mediante *patch clamp* utilizando Alexa Fluor 594 (D) Imagen representativa en rebanadas de ratones coinyectados con AAV-GCaMP6f y AAV-Scramble o AAV-shHCAR1, donde se

marcaron los astrocitos adyacentes al proceso del tanicito perfundido (círculos de colores y flecha) y un astrocito distal utilizado como control (círculo negro). **(E)** Rampas de voltaje (−100 a +100 mV, pasos de 10 mV) obtenidas antes y después del experimento, confirmando la estabilidad del sello en tanicito. **(F-G)** Trazos representativos de $\Delta F/F_0$ de astrocitos GCaMP6f⁺ durante la perfusión de glucosa (10 mM, 10 min) en un tanicito, en condiciones AAV-Scramble (E, negro) o AAV-shHCAR1 (F, rojo). **(H)** Cuantificación del área bajo la curva (AUC) normalizada al astrocito control de cada rebanada. Barras de escala: 20 μ m (A-C). Datos representados como media \pm SEM. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

10. Estimulación de HCAR1 en astrocitos incrementa la excitabilidad de neuronas POMC en rebanadas hipotalámicas

Previamente, nuestro grupo de investigación demostró mediante registros electrofisiológicos en rebanadas que una subpoblación de neuronas POMC incrementa su excitabilidad tras ser estimulada con diferentes agonistas de HCAR1, aun cuando estas no expresan el receptor (Órdenes et al., 2021). Esto es compatible con el hecho de que las señales provenientes de células gliales pueden modular la actividad neuronal. Por lo anterior, resulta fundamental evaluar el efecto de la estimulación de HCAR1 en astrocitos sobre la activación electrofisiológica de neuronas vecinas.

Hasta la fecha no existen antecedentes de registros simultáneos astrocito-neurona, que permitan identificar cambios en la activación de cada población celular a lo largo del tiempo, en presencia de diferentes estímulos. Esto podría demostrar que

la actividad eléctrica de neuronas POMC podría ser modulada por la activación de HCAR1 en los astrocitos cercanos. Para lo anterior, se realizaron registros de electrofisiología y calcio en rebanadas hipotalámicas de ratones POMC-Cre. En este caso, se coinyectó el AAV-gfaABC1D-GCaMP6f para expresar el sensor de calcio en astrocitos, junto con AAV-Flex-tdTomato, para marcar selectivamente las neuronas POMC (Fig. 23A). De esta manera, realizamos *patch clamp* en neuronas POMC-Tomato en configuración *current clamp* (neuronas rojas), permitiendo identificar potenciales de acción y simultáneamente, se registraron los cambios en la $[[Ca^{2+}]_i]$ de los astrocitos cercanos (células verdes).

Mediante inmunofluorescencia, identificamos la distribución de neuronas POMC-Tomato (rojo) y de astrocitos cercanos a estas (GFAP, verde) en el ARC, destacando una baja localización de neuronas POMC en la cercanía de la pared del 3V (Fig. 23B-C). Posteriormente, en rebanadas vivas se identificaron astrocitos que expresaban GcaMP (verde) y neuronas POMC-Tomato en el mismo campo visual, lo que nos permitió seleccionar una de estas neuronas y los astrocitos que la rodean para realizar registros simultáneos (Fig. 23D). Junto con la solución interna, se cargó Alexa Fluor 488, un marcador fluorescente verde, para verificar que el registro se realizara en una neurona POMC-Tomato (Fig. 23E).

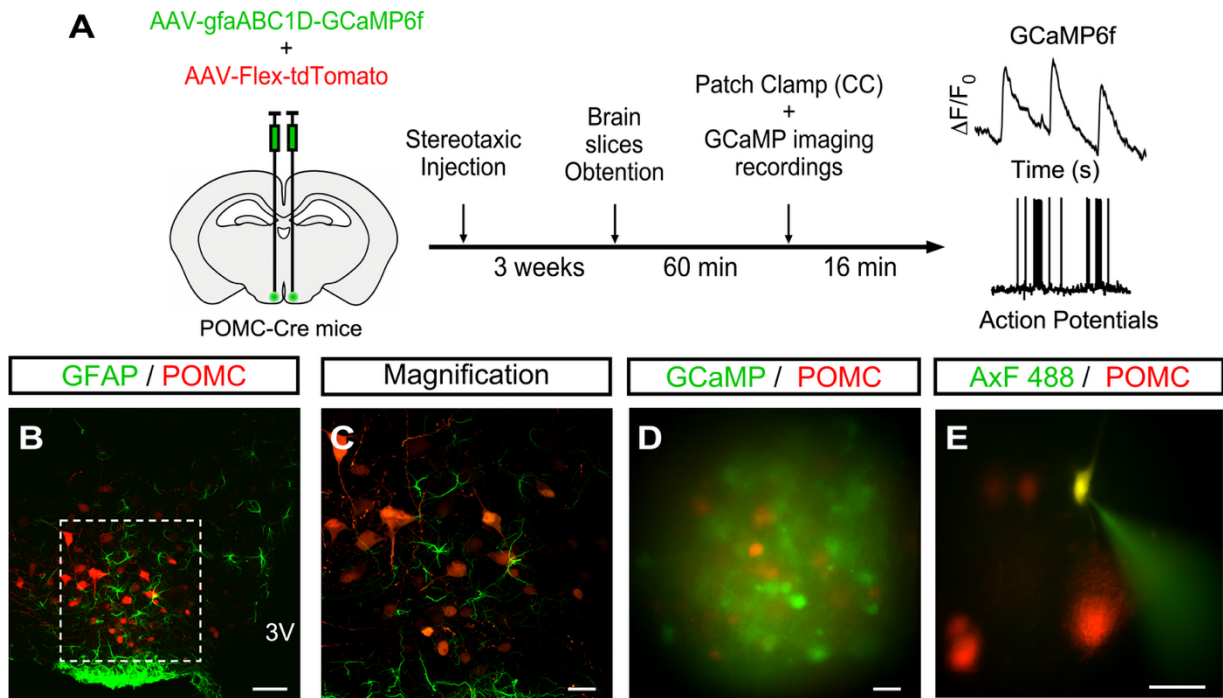


Figura 23. Validación del modelo para realizar registros simultáneos de actividad en astrocitos y neuronas POMC.

(A) Esquema experimental del protocolo de coinyección de AAV-gfaABC1D-GCaMP6f y AAV-Flex-tdTomato en ratones POMC-Cre, para registros simultáneos de *patch clamp* y calcio. (B-C) Inmunofluorescencia en el ARC que muestra astrocitos GFAP⁺ (verde) y neuronas POMC-tdTomato (rojo). (D) Imagen de epifluorescencia que muestra astrocitos GCaMP⁺ (verde) y neuronas POMC-tdTomato utilizadas para registros simultáneos. (E) Confirmación de la célula registrada, mediante difusión intracelular de Alexa Fluor 488 (verde) en una neurona POMC-tdTomato. Barras de escala: 50 μm (B); 20 μm (C-E).

Con el objetivo de identificar cambios simultáneos en la actividad de calcio en astrocitos y excitabilidad de membrana en neuronas POMC-Tomato, incubamos las rebanadas hipotalámicas con diferentes agonistas de HCAR1 y graficamos los cambios en el $\Delta F/F_0$ y el potencial de membrana (Vm), respectivamente (Fig. 24). Se siguió el mismo diseño experimental descrito anteriormente, que consistió en registros continuos de 16 min, subdivididos en 4 periodos. Puesto que previamente se han caracterizado en extenso los cambios en $\Delta F/F_0$ de astrocitos que expresan GcaMP6f en el ARC, en el presente experimento se muestra un trazo representativo de la actividad de un astrocito, mientras que el análisis cuantitativo se enfocó en las variaciones del Vm de neuronas POMC en cada periodo del experimento.

Inicialmente, para evaluar si las neuronas POMC responden a un agonista selectivo de HCAR1, que no es transportado ni metabolizado, incubamos las rebanadas con 3CI-HBA 40 μ M (Fig. 24A-C n = 5 células;). Durante la aplicación de este agonista farmacológico (barra verde), se identificó un incremento del $\Delta F/F_0$, junto con un desplazamiento del Vm hacia valores depolarizantes y la evocación de potenciales de acción, lo que evidencia una respuesta de activación ante la estimulación de HCAR1 (Fig. 24A-B). En el análisis por periodos mostró un Vm basal de $-55,29 \pm 0,13$ mV y una despolarización significativa durante la aplicación de 3CI-HBA con valor de $-46,64 \pm 1,08$ mV. Posteriormente, en el primer periodo de lavado el Vm retornó parcialmente hacia el valor basal ($-50,75 \pm 1,52$ mV), mientras que en el segundo lavado presentó un nuevo incremento significativo, alcanzando $-46,53 \pm 0,86$ mV (Fig. 24C).

Del mismo modo, las rebanadas hipotalámicas fueron incubadas con L-Lactato 10 mM (n = 6 células; Fig. 24D-F). Durante la incubación del metabolito (barra negra) se identificó un patrón de activación similar al descrito para 3CI-HBA, caracterizado por un aumento en el $\Delta F/F_0$, despolarización del Vm y generación de potenciales de acción (Fig. 24D-E). El Vm basal mostró un valor de $-56,01 \pm 0,21$ mV, seguido de una depolarización significativa tras la adición de L-Lactato, con $-46,96 \pm 0,94$ mV. En el primer lavado, el Vm retornó parcialmente hacia valores cercanos al basal con $-52,08 \pm 1,46$ mV, mientras que en el segundo lavado se observó una nueva depolarización significativa hasta $-45,99 \pm 0,86$ mV (Fig. 24F; n = 6 células;).

Finalmente, las rebanadas hipotalámicas fueron incubadas con D-Lactato 10 mM (Fig. 24G-I, n = 6 células;). Durante la incubación de este agonista parcial (barra morada) se identificó nuevamente un patrón de activación caracterizado por incrementos en el $\Delta F/F_0$, despolarización del Vm y evocación de potenciales de acción (Fig. 24G-H). El Vm basal fue de $-55,53 \pm 0,29$ mV, seguido de un incremento significativo tras la adición de D-Lactato, con $-47,17 \pm 1,08$ mV. A diferencia de lo observado con L-Lactato y 3CI-HBA, durante ambos periodos de lavado no se observó una hiperpolarización de membrana; el Vm permaneció depolarizado en $-49,47 \pm 1,17$ mV y $-45,46 \pm 0,98$ mV, respectivamente (n = 6 células; Fig. 24I).

En conjunto, nuestros resultados sugieren que la estimulación de HCAR1 en astrocitos modula de manera consistente la actividad eléctrica de neuronas POMC.

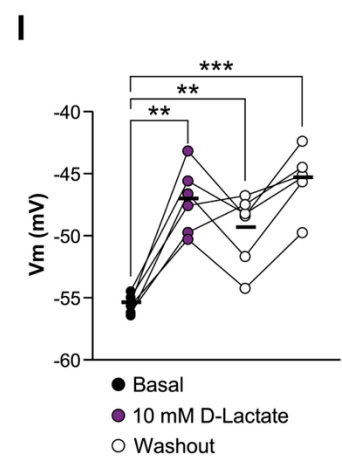
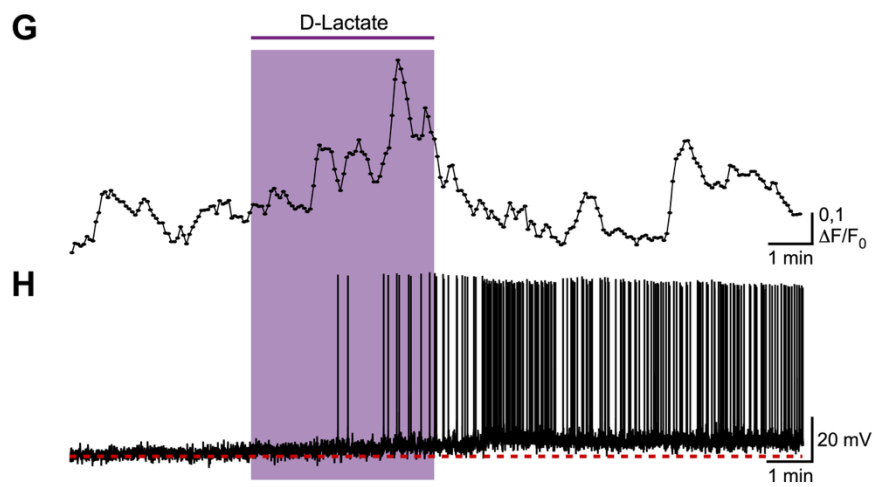
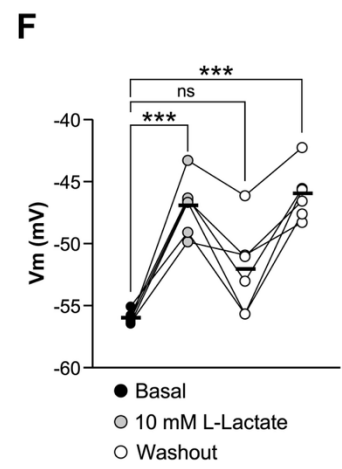
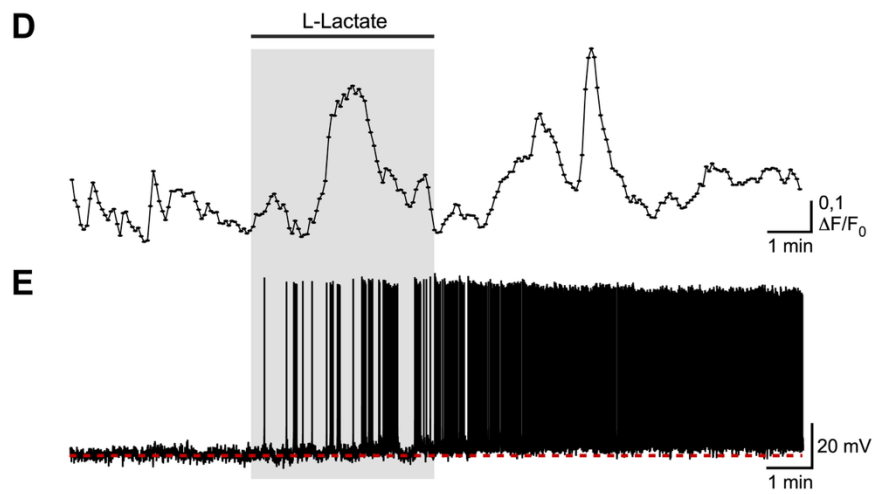
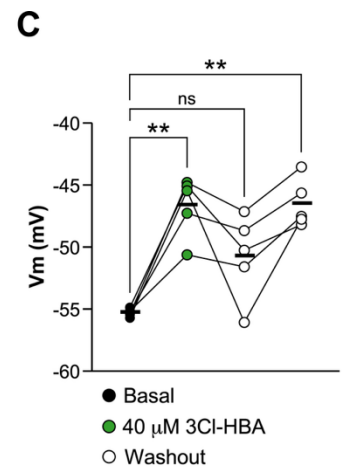
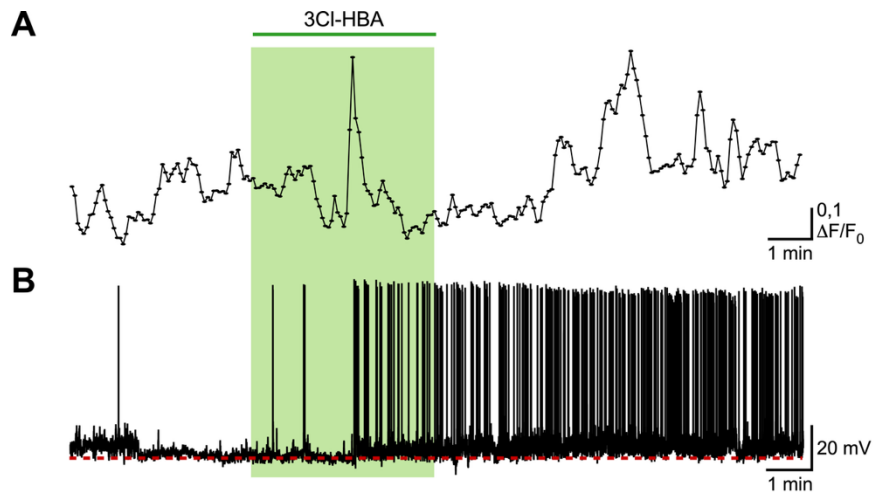


Figura 24. Efecto de la activación de HCAR1 astroglial sobre la excitabilidad de neuronas POMC.

(**A-C**) Respuesta simultánea de $\Delta F/F_0$, en astrocitos que expresaban GcaMP6f, y potencial de membrana (V_m) en neuronas POMC-Tomato durante la aplicación de 3Cl-HBA 40 μ M (barra verde). (**D-F**) Efectos de L-lactato 10 mM (barra negra), y (**G-I**) D-lactato 10 mM (barra morada). (**C, F, I**) Cada panel cuantitativo muestra los valores promedio de V_m para los cuatro periodos del protocolo experimental. Datos representados como media \pm SEM. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

11. Identificación y caracterización de corrientes lentas de entrada o *slow inward currents* (SICs) en neuronas POMC

En diferentes estudios electrofisiológicos en neuronas, se ha caracterizado un tipo particular de corrientes asociadas al proceso de gliotransmisión, denominadas SICs (del inglés *slow inward currents*), las cuales son evocadas por el glutamato derivado de astrocitos (Goenaga et al., 2023; Pál, 2024). Estas corrientes describen amplitudes, tiempos de activación (*rise time*) y de desactivación (*decay Tau*; τ), significativamente mayores en comparación con corrientes excitatorias postsinápticas convencionales (EPSCs, del inglés *excitatory postsynaptic currents*), las cuales también son significativamente más frecuentes que las SICs (Csemer et al., 2023; Durkee & Araque, 2019; Kovács & Pál, 2017).

Con el fin de identificar este tipo de señalización derivada de la glía, empleamos ratones POMC-Cre inyectados con AAV-Flex-tdTomato, para identificar y caracterizar

la presencia espontánea de SICs, diferenciándolas de las EPSCs según sus características electrofisiológicas (Fig. 25). Se realizaron registros de *patch clamp* en configuración *voltage-clamp*, para aislar las corrientes iónicas, manteniendo las neuronas POMC en un potencial de membrana de -70 mV y registrando su actividad sináptica espontánea durante 10 min (n = 5 células). En una caracterización cualitativa inicial, fue posible reconocer gráficamente la diferencia en amplitud y tiempo de decaimiento de SICs (flechas azules), comparadas con las EPSCs (flechas naranjas), así como una aparente menor frecuencia de SICs (Fig. 25A).

En total, se analizaron 70 eventos de cada tipo de corriente, desde registros obtenidos de 5 neuronas POMC-Tomato para comparar cuantitativamente las principales diferencias en sus propiedades electrofisiológicas (Fig. 25B-E). Confirmamos que la frecuencia de SICs es significativamente menor a la de las EPSCs (Fig. 24B, $0,17 \pm 0,02$ Hz y $0,62 \pm 0,11$ Hz, respectivamente). En contraste, la amplitud de las SICs fue significativamente mayor a la de las EPSCs (Fig. 24C, $23,05 \pm 1,06$ pA y $9,00 \pm 0,35$ pA, respectivamente; , así como el tiempo de activación (Fig. 25D $41,18 \pm 3,36$ ms y $1,70 \pm 0,09$ ms, respectivamente) y el tiempo de decaimiento (Fig. 25E, $136,10 \pm 11,05$ ms y $9,17 \pm 0,87$ ms, respectivamente)

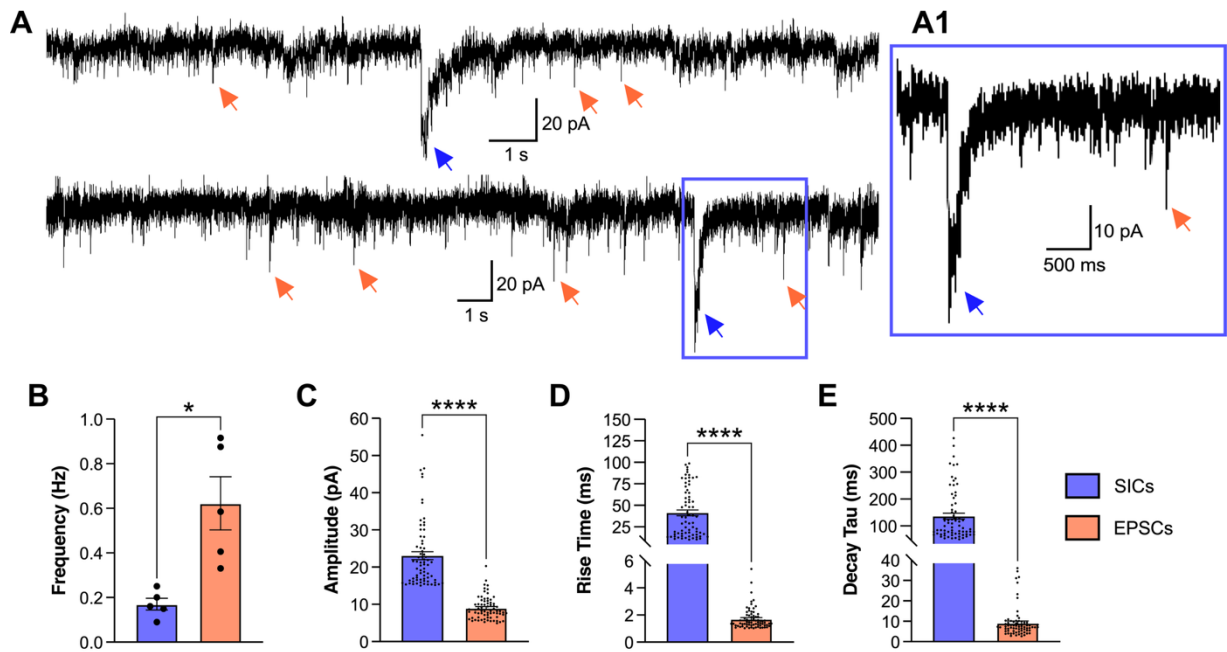


Figura 25. Caracterización de SICs y comparación con EPSCs en neuronas POMC.

(A) Registro representativo en configuración *voltage clamp* (-70 mV) mostrando SICs (flechas azules) y EPSCs (flechas naranjas). (B-E) Análisis cuantitativo de 70 eventos de cada tipo de corriente, evaluando diferencias en: frecuencia (B), amplitud (C), tiempo de activación (D) y tiempo de decaimiento (E). N = 70 eventos de 5 neuronas POMC. Los datos se representan como media \pm SEM. * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$.

A continuación, determinamos cambios en la frecuencia de SICs en neuronas POMC-Tomato, durante la incubación de las rebanadas hipotalámicas con el agonista de HCAR1, L-Lactato 10 mM (Fig. 26). Puesto que se ha demostrado que las SICs son eventos relacionados a la activación de los receptores de glutamato tipo NMDA (N-metil-D-aspartato); adicionalmente incubamos rebanadas con el antagonista de NMDA, D-AP5 30 μ M. En la figura 26A-C se muestran trazos representativos de la identificación de SICs (flechas azules), en condición basal (barra negra), luego un aparente incremento de la frecuencia tras la incubación con L-Lactato (barra gris clara) y, finalmente, una disminución durante la incubación con D-AP5 (barra rosa; Fig. 26A-C).

En el análisis cualitativo, se analizaron registros de 6 neuronas POMC, donde identificamos una frecuencia basal de SICs de $0,12 \pm 0,01$ Hz. Esta frecuencia aumentó significativamente tras la incubación de L-Lactato con $0,19 \pm 0,03$ Hz y se redujo significativamente luego de la incubación de L-Lactato en presencia de D-AP5, con $0,01 \pm 0,005$ Hz (Fig. 26D). Del mismo modo, cuantificamos las EPSCs, encontrando una frecuencia basal de $0,48 \pm 0,08$ Hz, la cual no se modificó tras la incubación de L-Lactato en presencia o ausencia de D-AP5 ($0,70 \pm 0,12$ Hz y $0,60 \pm 0,08$ Hz, respectivamente). Estos resultados sugieren que las SICs registradas en neuronas POMC aumentan su frecuencia en respuesta a L-Lactato y dependen de la activación de receptores NMDA, mientras que la frecuencia de las EPSC permanece estable en ambas condiciones.

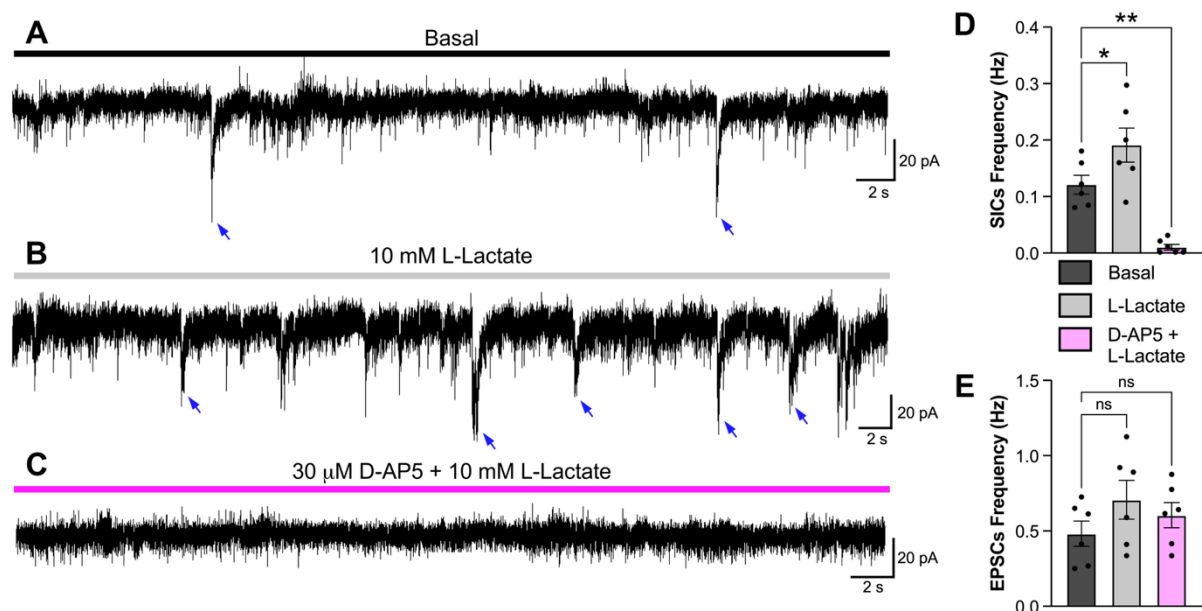


Figura 26. L-Lactato incrementa la frecuencia de SICs en neuronas POMC dependiente de activación de los receptores NMDA.

(A-C) Trazos representativos en configuración *voltage clamp* mostrando SICs (flechas azules) en condición basal (barra negra, A), durante la incubación con L-lactato 10 mM (barra gris clara, B) y en presencia del antagonista de NMDA, D-AP5 30 μ M (barra rosa, C), donde los eventos fueron abolidos. (D-E) Análisis cuantitativo de la frecuencia de SICs y EPSCs en neuronas POMC. Datos representados como media \pm SEM. N = 6 células. *p < 0,05; **p < 0,01.

12. La activación astrogliar de HCAR1 modula la generación de SICs en neuronas POMC

Con el objetivo de determinar el rol de la activación de HCAR1 astrogliar en la generación de SICs en neuronas POMC, realizamos registros en configuración *voltage clamp* en rebanadas de ratones POMC-Cre. Estos fueron coinyectados con AAV-Flex-GFP (para registrar las neuronas POMC verdes) y el AAV-GFAP-shHCAR1-mCherry o AAV-GFAP-Scramble-mCherry (para identificar los astrocitos en rojo) (Fig. 27A). Los registros electrofisiológicos para identificar y caracterizar SICs se realizaron en neuronas POMC-GFP durante 16 min de la misma forma que se ha descrito anteriormente, incluyendo 4 min de aplicación de agonistas de HCAR1 (Fig. 27A).

Se registraron neuronas POMC-GFP en rebanadas de ratones AAV-Scramble (Fig. 27B-E, trazos negros) y AAV-shHCAR1 (Fig. 27F-I, trazos rojos). Se muestran trazos representativos con SICs registradas en condición basal y tras la incubación de L-Lactato, en ambos tipos de rebanadas. En la Fig. 27D-E y 26H-I, se muestra la magnificación de trazos promedio de SICs y EPSCs utilizados en el análisis para las condiciones AAV-Scramble y AAV-shHCAR1, respectivamente. Cuantificamos la frecuencia y la amplitud de SICs y EPSCs para cada condición durante la incubación con diferentes agonistas de HCAR1: L-Lactato 10 mM (líneas grises claras), 3CI-HBA 40 μ M (líneas verdes) y D-Lactato 10 mM (líneas moradas) (Fig. 27J-M).

Tras la estimulación con L-Lactato, la frecuencia de SICs en la condición AAV-Scramble fue $0,133 \pm 0,027$ Hz ($n = 17$ células), mientras que para la condición AAV-shHCAR1 fue significativamente menor con $0,051 \pm 0,011$ Hz ($n = 14$ células). Luego de la estimulación con 3CI-HBA, la frecuencia de SICs en la condición AAV-Scramble

fue $0,126 \pm 0,023$ Hz ($n = 20$ células), mientras que para la condición AAV-shHCAR1 fue significativamente menor con $0,056 \pm 0,009$ Hz ($n = 16$ células). Por otra parte, la incubación con D-Lactato no mostró diferencias significativas en la frecuencia de SICs, con valores de $0,169 \pm 0,033$ Hz en la condición AAV-Scramble y $0,078 \pm 0,017$ Hz en AAV-shHCAR1 ($n = 7$ y 6 células, respectivamente; Fig. 27J).

En congruencia con nuestros resultados anteriores, la frecuencia de EPSCs analizada en los mismos registros, se mantuvo estable entre condiciones y tras las estimulación con los diferentes agonistas. La frecuencia de EPSCs durante la estimulación con L-Lactato fue de $0,677 \pm 0,073$ Hz en la condición AAV-Scramble y $0,516 \pm 0,077$ Hz en AAV-shHCAR1, frente a 3CI-HBA fue de $0,469 \pm 0,060$ Hz en la condición AAV-Scramble y $0,438 \pm 0,058$ Hz en AAV-shHCAR1 y frente a D-Lactato fue de $0,619 \pm 0,155$ Hz en la condición AAV-Scramble y $0,636 \pm 0,165$ Hz en AAV-shHCAR (Fig. 27K).

Con el fin de identificar cambios en la amplitud, evaluamos este parámetro para SICs y EPSCs (Fig. 27L-M). No se encontraron diferencias significativas en la amplitud de SICs entre condiciones ni bajo la estimulación con diferentes agonistas de HCAR1. La amplitud de SICs durante la estimulación con L-Lactato fue de $26,160 \pm 0,705$ pA en la condición AAV-Scramble y $27,335 \pm 0,963$ pA en AAV-shHCAR1, frente a 3CI-HBA fue de $26,007 \pm 0,565$ pA en la condición AAV-Scramble y $25,568 \pm 0,664$ pA en AAV-shHCAR1 y frente a D-Lactato fue de $26,850 \pm 0,853$ pA en la condición AAV-Scramble y $26,520 \pm 0,789$ pA en AAV-shHCAR (Fig. 27L).

Siguiendo estos resultados, tampoco se encontraron diferencias significativas en la amplitud de EPSCs entre condiciones ni bajo la estimulación de HCAR1 con diferentes agonistas. La amplitud de EPSCs durante la estimulación con L-Lactato fue de $9,326 \pm 0,498$ pA en la condición AAV-Scramble y $9,230 \pm 0,801$ pA en AAV-shHCAR1, frente a 3CI-HBA fue de $9,145 \pm 0,446$ pA en la condición AAV-Scramble y $7,993 \pm 0,437$ pA en AAV-shHCAR1 y frente a D-Lactato fue de $9,545 \pm 0,882$ pA en la condición AAV-Scramble y $8,152 \pm 0,880$ pA en AAV-shHCAR (Fig. 27M).

Estos resultados sugieren que la activación de HCAR1 en astrocitos contribuye al incremento en la frecuencia de SICs en neuronas POMC, durante la estimulación con diferentes agonistas del receptor de lactato.

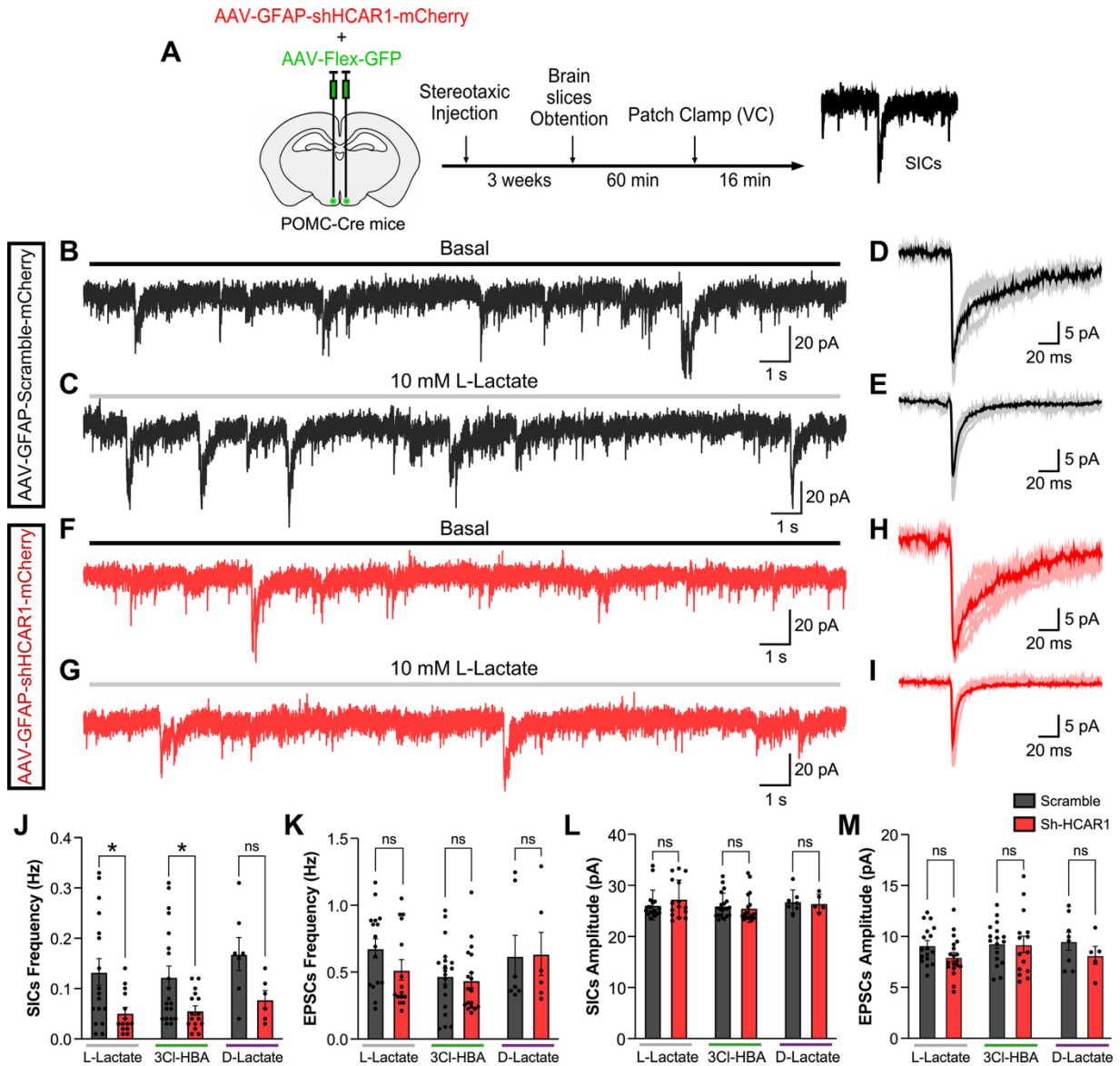


Figura 27. HCAR1 en astrocitos modula la frecuencia de SICs inducidas por agonistas en neuronas POMC.

(A) Esquema experimental que muestra la generación de ratones POMC-Cre coinyectados con AAV-Flex-GFP y con AAV-GFAP-Scramble o AAV-GFAP-shHCAR1, para obtener registros de *voltage clamp* (VC). (B–C, F–G) Trazos representativos de SICs registradas en neuronas POMC-GFP en condición basal y durante la aplicación

de L-lactato 10 mM, comparando rebanadas AAV-Scramble (negro) y AAV-shHCAR1 (rojo). **(D–E, H–I)** Magnificaciones promedio de trazos de SICs y EPSCs utilizados para el análisis cuantitativo. **(J–M)** Cuantificación de la frecuencia y amplitud de SICs y EPSCs durante la estimulación con distintos agonistas de HCAR1: L-lactato (gris claro), 3CI-HBA (verde) y D-lactato (morado). Datos mostrados como media \pm SEM. *p < 0,05.

13. Modulación dependiente del tiempo de las SICs por HCAR1 astroglial sobre neuronas POMC

Con el fin de evaluar la dinámica temporal de las SICs en neuronas POMC y determinar si su generación depende principalmente de la activación de HCAR1 en astrocitos, realizamos registros en configuración *voltage clamp* durante 16 minutos, divididos en cuatro periodos consecutivos de 4 minutos como se ha descrito previamente: basal, aplicación del agonista, lavado 1 (washout 1) y lavado 2 (washout 2). Utilizamos rebanadas hipotalámicas de ratones POMC-Cre coinyectados con AAV-Flex-GFP para identificar las neuronas POMC y con AAV-GFAP-Scramble-mCherry o AAV-GFAP-shHCAR1-mCherry para distinguir astrocitos control y astrocitos silenciados para HCAR1, respectivamente (Figura 28).

Los trazos representativos muestran que, en la condición AAV-GFAP-Scramble (Fig. 28A-D, trazos negros), las neuronas POMC presentan SICs espontáneas en el periodo basal (barra negra), seguidas de un aumento aparente en la frecuencia durante la aplicación de L-lactato 10 mM (barra gris clara). En los periodos de lavado,

la frecuencia aparentemente disminuyó, aunque sin retornar completamente a los valores basales (paneles izquierdos). En contraste, en rebanadas AAV-GFAP-shHCAR1 (Fig. 28E-H, trazos rojos), las SICs se observaron con menor frecuencia en el periodo basal y mostraron un aumento atenuado durante la aplicación de L-Lactato, seguido de valores bajos y estables en ambos periodos de lavado.

El análisis cuantitativo de la frecuencia de SICs, no mostró cambios significativos entre los diferentes periodos analizados para la condición AAV-Scramble cuando se estimuló con L-Lactato 10 mM (17 neuronas POMC), con valores en Hz de $0,12 \pm 0,02$; $0,17 \pm 0,03$; $0,14 \pm 0,02$ y $0,12 \pm 0,02$ (Fig. 28I). Por otra parte, el análisis en la condición AAV-shHCAR1 (15 neuronas POMC) no mostró diferencias significativas en la frecuencia de SICs entre el periodo basal y la aplicación del agonista ($0,04 \pm 0,01$ Hz y $0,05 \pm 0,01$ Hz, respectivamente). Sin embargo, existió una disminución significativa de la frecuencia, comparando el lavado 1 y 2 ($0,05 \pm 0,01$ Hz y $0,03 \pm 0,009$ Hz, respectivamente) (Fig. 28J). Notablemente, los valores de frecuencia de SICs en la condición AAV-Scramble fueron significativamente mayores en cada uno de los periodos analizados, en comparación con la condición AAV-shHCAR1 (Fig. 28K).

La frecuencia de SICs en neuronas POMC en la condición AAV-Scramble, tras la incubación con 3CI-HBA 40 μ M (Fig. 27, barra verde, n = 20 células), no mostró cambios significativos entre el periodo basal y la aplicación del agonista ($0,088 \pm 0,01$ Hz y $0,098 \pm 0,02$ Hz, respectivamente), no obstante, la frecuencia incrementó significativamente durante los lavados 1 y 2, comparados con el periodo basal, así

como con el periodo de estimulación (Fig. 27L $0,136 \pm 0,02$ Hz y $0,128 \pm 0,02$ Hz). En contraste, el análisis en la condición AAV-shHCAR1 (19 neuronas POMC) no mostró diferencias significativas en la frecuencia de SICs entre los distintos periodos, con valores en Hz de $0,036 \pm 0,01$; $0,055 \pm 0,01$; $0,065 \pm 0,01$ y $0,066 \pm 0,01$, respectivamente (Fig. 28M). Al comparar los valores de frecuencia de SICs en la condición AAV-Scramble con la condición AAV-shHCAR1, no se identificaron diferencias significativas, excepto durante el lavado 1 (Fig. 28N).

La frecuencia de SICs en neuronas POMC tras la incubación con D-Lactato 10 mM (barra morada, n = 7 células), no mostró cambios significativos entre los cuatro periodos, con valores en Hz de $0,13 \pm 0,02$; $0,18 \pm 0,03$; $0,22 \pm 0,07$ y $0,19 \pm 0,06$, respectivamente (Fig. 28O). De forma similar, tampoco se identificaron cambios significativos en la frecuencia de SICs en la condición AAV-shHCAR1, con valores en Hz de $0,09 \pm 0,02$; $0,10 \pm 0,03$; $0,06 \pm 0,02$ y $0,03 \pm 0,01$ (Fig. 28P). A diferencia de los agonistas de HCAR1 evaluados anteriormente, la incubación con D-Lactato no mostró diferencias significativas al comparar la frecuencia de SICs entre las condiciones AAV-Scramble y AAV-shHCAR1, probablemente relacionado con el bajo número de muestras analizadas; sin embargo, se puede identificar una tendencia muy similar a la descrita por los demás agonistas (Fig. 28Q).

En conjunto, estos resultados demuestran que la activación de HCAR1 en astrocitos modula la generación de SICs en neuronas POMC de manera dinámica y diferencial en el tiempo. La marcada reducción de estos eventos en la condición AAV-shHCAR1 confirma que la presencia funcional de este receptor en astrocitos es

esencial para la aparición y la potenciación de estas corrientes lentas durante la estimulación con agonistas de HCAR1.

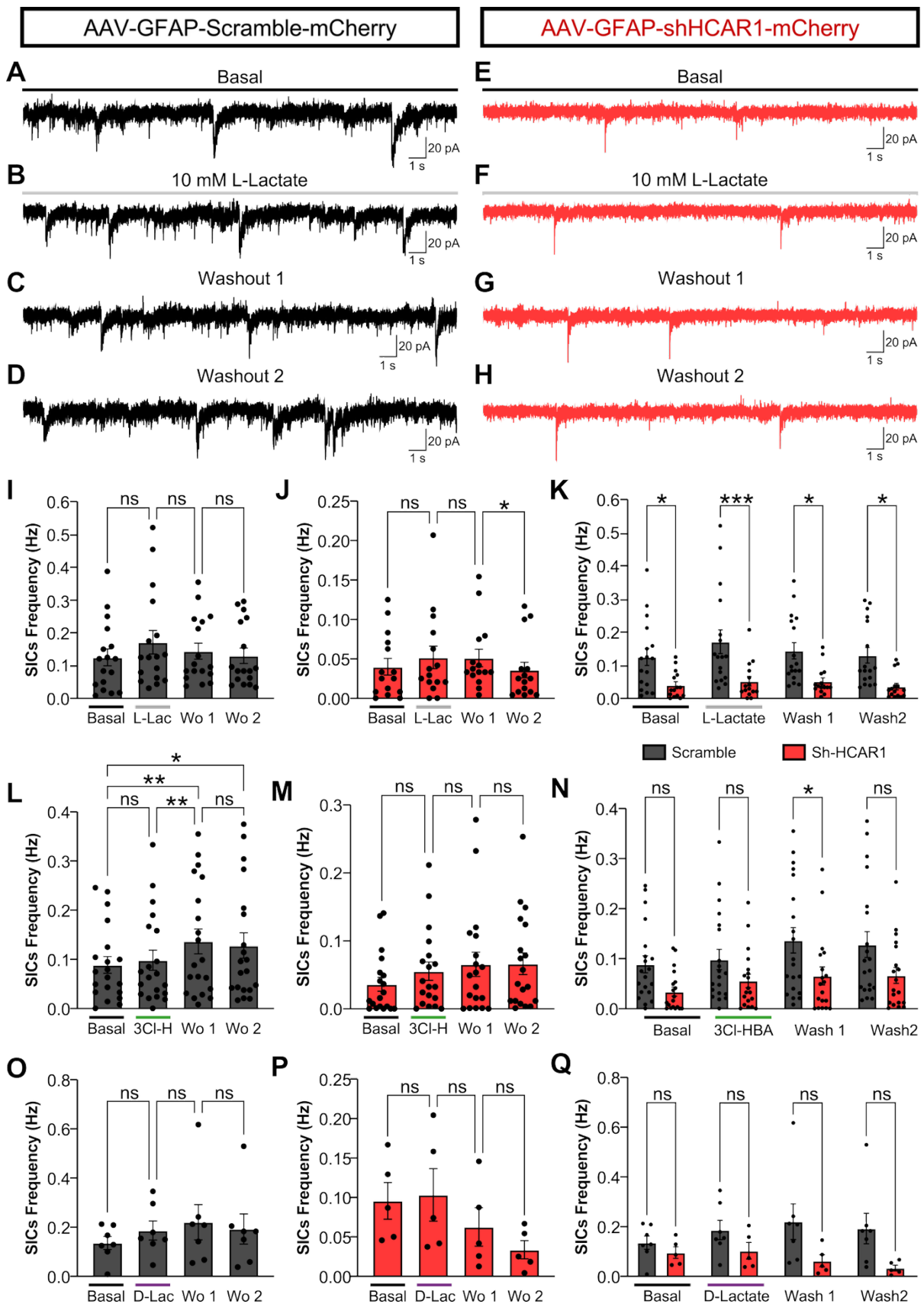


Figura 28. HCAR1 en astrocitos controla la progresión temporal de las SICs en neuronas POMC.

(**A-H**) Trazos representativos de registros de *voltage clamp* en neuronas POMC en rebanadas AAV-GFAP-Scramble (negro, A-D) y AAV-GFAP-shHCAR1 (rojo, F-H) durante los cuatro periodos experimentales, incluyendo la aplicación de L-lactato 10 mM. (**I-K**) Análisis temporal de la frecuencia de SICs para las condiciones AAV-Scramble (I) y AAV-shHCAR1 (J) por separado, y comparación entre condiciones (K) antes, durante y después de la aplicación de L-Lactato (gris claro). (**L-N**) Análisis temporal de frecuencia de SICs para las condiciones AAV-Scramble (L) y AAV-shHCAR1 (M) por separado y comparando entre condiciones (N), antes, durante y después de la aplicación de 3CI-HBA 40 μ M (verde). (**O-Q**) Análisis temporal de frecuencia de SICs para las condiciones AAV-Scramble (O) y AAV-shHCAR1 (P) por separado y comparando entre condiciones (Q), antes, durante y después de la aplicación de D-Lactato 10 mM (morado). Datos representados como media \pm SEM.

*p < 0,05; **p < 0,01.

VII. DISCUSIÓN

Los resultados presentados en esta tesis muestran de forma consistente que el L-Lactato liberado por tanicitos hacia el núcleo arqueado (ARC) puede actuar como una señal metabólica detectada principalmente por astrocitos, activando su receptor HCAR1 y provocando un incremento de la concentración de calcio intracelular ($[[Ca^{2+}]_i]$). Esta activación astrogliar desencadenó la liberación de glutamato, reflejada en un aumento de la excitabilidad y la frecuencia de corrientes lentas atribuibles a la gliotransmisión (SICs), dependientes de la expresión de HCAR1 en astrocitos, evaluados en neuronas POMC. Estos resultados se apoyaron en una amplia variedad de aproximaciones experimentales, como análisis de expresión y localización de HCAR1, análisis funcional de la liberación de moléculas al medio extracelular, detección de cambios en la $[[Ca^{2+}]_i]$ en astrocitos *in vitro* e *in situ*, y, finalmente, registros electrofisiológicos de *voltage* y *current clamp* de neuronas POMC en rebanadas hipotalámicas.

1. La distribución del receptor de lactato HCAR1 en el hipocampo y el hipotálamo es principalmente glial.

El receptor de lactato fue identificado originalmente mediante RT-qPCR en tejidos adiposos blancos y pardos, donde se encontraron altos niveles del ARNm en comparación con otros tejidos periféricos humanos y de ratón (Ge et al., 2008; Wise et al., 2003). Posteriormente, se generó el ratón transgénico HCAR1-RFP con el objetivo

de evaluar por inmunofluorescencia, su distribución en tejidos periféricos (Ahmed et al., 2010), puesto que los anticuerpos existentes tenían reacción positiva en ratones *knockout* para este receptor. Nuestros resultados muestran novedosamente, la implementación de un anticuerpo comercial para HCAR1 y su codistribución con vimentina en tejido adiposo, como marcador de la red estromal que rodea los adipocitos. Si bien, vimentina no es un marcador propio de adipocitos, su expresión en elementos estromales (endotelio y progenitores adiposos) permite delimitar la arquitectura del tejido adiposo (Rowan et al., 2014) y corroborar la señal del anticuerpo en un tejido control.

La localización de HCAR1 en hipocampo de ratón, un área donde ha sido previamente reportada su expresión, con el fin de validar la señal del anticuerpo en nuestro tejido de interés. De manera interesante, identificamos marcaje positivo en astrocitos y vasos sanguíneos. Esto fue reportado previamente por Lauritzen y cols. (2014), quienes, a través de inmunofluorescencia, inmunogold en microscopía electrónica y Western blot, detectaron la expresión heterogénea de HCAR1 en diferentes células y zonas cerebrales, entre las cuales destaca la presencia en hipocampo y cerebelo. Los autores destacaron principalmente su localización en neuronas, aunque también en astrocitos y células endoteliales. Mediante microscopía electrónica confirmaron la localización de HCAR1 en astrocitos perivasculares, así como en astrocitos que participaban de sinapsis excitatorias en hipocampo (Lauritzen et al., 2014). Es importante mencionar, que la expresión global de HCAR1 en cerebro, es al menos un orden de magnitud menor a la identificada en tejido adiposo (Wise et al., 2003).

Para precisar la expresión de HCAR1 en hipocampo y cerebelo, Briquet y cols., realizaron hibridación *in situ* RNAscope para amplificar la señal del ARNm y presentar un análisis cualitativo del área de expresión. En hipocampo se identificó una expresión abundante de transcritos principalmente en el hilus del giro dentado, pero también en las neuronas piramidales de la región CA3 y la capa de células granulares, mientras que en cerebelo se identificó predominantemente en células de Purkinje y la capa granular (Briquet et al., 2022). De la misma forma, realizamos hibridación *in situ* en rebanadas hipotalámicas e identificamos una señal positiva de hibridación concentrada en el núcleo ARC y en la eminencia media (ME). Este resultado complementa el único estudio que, a la fecha, demuestra la expresión de HCAR1 en ARC, evaluada mediante inmunohistoquímica y RT-qPCR en rebanadas de ratones POMC-GFP (Órdenes et al., 2021).

Nuestros análisis cuantitativos permitieron describir una subpoblación de astrocitos que localizan HCAR1 en hipocampo e hipotálamo y validar la selectividad del anticuerpo empleado. En hipocampo utilizamos el modelo POMC-GFP, para corroborar la ausencia de codistribución de HCAR1 en estas neuronas, como fue demostrado en las neuronas POMC hipotalámicas (Órdenes et al., 2021). Las células GFP positivas en el giro dentado del hipocampo, corresponden a nuevas neuronas de cerebro adulto, en una fase temprana de maduración, que expresan POMC de manera transitoria (Hentges et al., 2009). De esta forma, el modelo transgénico POMC-GFP se ha utilizado para investigación relacionada con neurogénesis y plasticidad estructural asociada a estas nuevas neuronas; sin embargo, no corresponde a neuronas que

expresen POMC de forma nativa, estable y funcional (Römer et al., 2011; Shen et al., 2016; Villasana et al., 2015).

Paralelamente, el análisis cualitativo en hipotálamo confirmó la ausencia de HCAR1 neuronas POMC y su presencia en una subpoblación de astrocitos, distribuidos en el ARC y ME. Adicionalmente, identificamos un intenso marcaje de HCAR1, lo que estructuralmente podría corresponder a vasos sanguíneos en ARC y el área ventral de la ME. Empleamos inmunomarcaje con CD31 para sugerir codistribución endotelial de HCAR1, consistente con estudios que identificaron señal en células perivasculares y periventriculares, evaluando la codistribución de diversos marcadores en el modelo transgénico HCAR1-RFP (Hadzic et al., 2020; Lauritzen et al., 2014; Morland et al., 2017). Estos estudios demostraron la presencia de HCAR1 en las terminaciones de astrocitos perisinápticos y perivasculares mediante marcaje con glutamina sintetasa, y su localización en las membranas luminal y abluminal del endotelio, mediante análisis de microscopía electrónica e inmunogold en hipocampo (Bergersen, 2015; Lauritzen et al., 2014). De manera similar, HCAR1 se ha identificado en vasos piales y fibroblastos, mediante comarcaje con vimentina, en pericitos identificados con el marcador PDGFR- β , así como en plexos coroideos mediante inmunoperoxidasa (Hadzic et al., 2020; Ma et al., 2020; Morland et al., 2017). Dada la densidad capilar fenestrada de la ME, sería pertinente en futuros estudios emplear marcadores como MECA-32, para diferenciar tipos vasculares y precisar la distribución endotelial de HCAR1 (Nakakura et al., 2021; Turner et al., 2000).

En conjunto, estos resultados han sugerido un posicionamiento estratégico de HCAR1 en la interfaz sangre-cerebro, para sensar fluctuaciones en la concentración de lactato, como ocurre durante el ejercicio (Bergersen, 2015). La activación de HCAR1 en células endoteliales promueve la liberación del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFA), favoreciendo la angiogénesis cerebral *in vivo* (Morland et al., 2017). De acuerdo con esta perspectiva, la activación de HCAR1 en astrocitos que forman parte de la barrera hematoencefálica (BHE) en ARC o que reciban señales metabólicas derivadas del 3V podría desencadenar la liberación de factores moduladores de la actividad neuronal, apoyando la hipótesis de que lactato actúa como molécula señalizadora intercelular en ARC.

De manera complementaria, al aislar por FACS neuronas NPY-GFP, detectamos niveles de ARNm de HCAR1 en estas células, aproximadamente treinta veces mayores a los del extracto total hipotalámico. Este hallazgo, que reproduce la estrategia utilizada por Órdenes y Cols. para neuronas POMC, sugiere una expresión diferencial de HCAR1 entre subpoblaciones neuronales del ARC, lo que podría estar relacionado con la existencia de múltiples mecanismos por los cuales el lactato puede actuar tanto como sustrato metabólico como señal extracelular en poblaciones neuronales y gliales (Órdenes et al., 2021).

HCAR1 es un receptor acoplado a proteína G de tipo inhibitorio (G_i -GPCR) que en neuronas genera una clásica respuesta inhibitoria, interpretada como un mecanismo de retroalimentación negativa (Bozzo et al., 2013; de Castro Abrantes et al., 2019; Herrera-López & Galván, 2018). Estudios de electrofisiología en neuronas

corticales han demostrado que la activación de HCAR1 con L-Lactato o 3CI-HBA reduce hasta en un 33 % la actividad espontánea de calcio (Bozzo et al., 2013) y hasta en 45 % la frecuencia en potenciales de acción y corrientes postsinápticas excitatorias miniatura (mEPSC) (de Castro Abrantes et al., 2019). Este efecto inhibitorio no se identificó en neuronas de ratones *knock out* de HCAR1 (HCAR1-KO), en las que la actividad espontánea de calcio y la evocada por L-Lactato se duplicaron con respecto a las neuronas *wild type* (WT) (de Castro Abrantes et al., 2019). Estos resultados apoyan la existencia de una vía canónica de un Gi-GPCR en neuronas: inhibición de adenilato ciclasa, disminución de AMPc e inhibición de PKA, mecanismo también descrito en tejido adiposo (Ahmed et al., 2010; Cai et al., 2008; Liu et al., 2009).

Este efecto inhibitorio producido por la activación de HCAR1 en neuronas, ha sido estudiado principalmente en neuronas excitatorias de corteza e hipocampo y se ha asociado con mecanismos de neuroprotección y control de la excitabilidad; como en contextos de acumulación de lactato en pacientes con epilepsia, tras la aceleración de glucólisis (Skwarzynska et al., 2023). Esta modulación inhibitoria de HCAR1 sugiere una acción presináptica sobre la neurotransmisión glutamatérgica (Herrera-López & Galván, 2018). Sin embargo, la modulación de HCAR1 sobre neuronas inhibitorias permanece poco estudiada (por ejemplo, NPY), por lo que nuestros resultados de una expresión elevada de HCAR1 en neuronas NPY plantean interrogantes sobre la heterogeneidad funcional de la señalización por lactato en ARC.

Por otra parte, el análisis de localización subcelular mediante inmunocitoquímica, mostró a HCAR1 tanto en la membrana plasmática como en el

núcleo de los astrocitos en cultivo; una observación no descrita previamente en tejido cerebral. Estudios recientes de progresión de cáncer en múltiples tumores sólidos y líneas celulares derivadas, han descrito la localización nuclear y citoplasmática de HCAR1, empleando Western blot en extractos nucleares e inmunodetección (Nezhady et al., 2025; Yang et al., 2025). Los autores proponen una translocación de HCAR1 hacia el núcleo, dependiente de lactato en el contexto tumoral, donde esta molécula se produce abundantemente, asociada con el efecto Warburg. Yang y cols. sugieren la existencia de una potencial señal de localización nuclear en la secuencia de HCAR1; además de la formación de un complejo proteico con importina beta, lo que facilitaría su transporte hacia el interior del núcleo (Yang et al., 2025). Una vez allí, HCAR1 favorecería el inicio de señalizaciones y funciones no canónicas que favorecen la proliferación, supervivencia y motilidad de las células tumorales, incluyendo la activación de ERK y AKT, así como la interacción con complejos remodeladores de cromatina (Nezhady et al., 2025). Estos hallazgos nos invitan a considerar la posibilidad de funciones nucleares no convencionales de HCAR1 activado por lactato en células gliales, lo que merece investigación adicional en el contexto metabólico cerebral.

En línea con estos resultados, estimulamos cultivos primarios de astrocitos hipotalámicos con L-Lactato y analizamos los cambios en la concentración de calcio intracelular $[(Ca^{2+})_i]$. La estimulación con L-Lactato generó aumentos en la $[(Ca^{2+})_i]$ de los astrocitos analizados, inclusive cuando el transporte de monocarboxilatos fue inhibido con 4-CIN. El uso de 4-CIN como inhibidor selectivo de MCTs está ampliamente establecido para impedir la entrada o salida de lactato de células

neuronales y gliales (Lhomme et al., 2021; Órdenes et al., 2021). Por lo tanto, la persistencia de la respuesta a lactato en presencia de 4-CIN, junto con la activación robusta por 3CI-HBA (agonista no transportable ni metabolizable), indica que el aumento en la $[[Ca^{2+}]_i]$ está relacionado con la señalización derivada de un receptor en la membrana como HCAR1 y no a un efecto metabólico (Dvorak et al., 2012; Laroche et al., 2021).

De manera interesante, la estimulación de HCAR1 astroglial por sus diferentes agonistas y el consecuente incremento de la señal relacionada con un aumento en la $[[Ca^{2+}]_i]$, es contrario a lo reportado en neuronas, donde disminuyó la cinética de calcio y frecuencia en potenciales de acción (Bozzo et al., 2013; de Castro Abrantes et al., 2019). No obstante, nuestros resultados están en línea con lo reportado por Durkee y cols., quienes demostraron que la activación de un G_i -GPCR en astrocitos conlleva a una vía no canónica, a diferencia de lo que ocurre con el mismo receptor expresado en neuronas (Durkee et al., 2019). En una aproximación quimiogénica, los autores expresaron receptores G_i -GPCRs artificiales en astrocitos de hipocampo (DREADD hM4Di), y tras su activación específica, evidenciaron un aumento significativo en la $[[Ca^{2+}]_i]$. Este evento está ampliamente relacionado con la liberación de moléculas señalizadoras como glutamato, D-serina, GABA o ATP, que modulan la excitabilidad y plasticidad neuronal; denominado gliotransmisión (Durkee & Araque, 2019; Kofuji & Araque, 2021; Nanclares et al., 2023). En conjunto, estos resultados se alinean con evidencia creciente que describe que la activación de G_i -GPCRs en astrocitos no necesariamente conduce a señales inhibitorias clásicas, sino más bien a incrementos en la $[[Ca^{2+}]_i]$ que se relacionan con la modulación de la comunicación glía-neurona.

2. El lactato derivado de tanicitos activa HCAR1 astroglial estimula la gliotransmisión a través de hemicanales

Previamente, nuestro grupo de investigación ha generado y validado diferentes adenovirus (Ad), con el fin de manipular la expresión de proteínas clave en el proceso glicolítico de tanicitos y demostrar su rol sobre la ingesta de alimentos. En este estudio, utilizamos el AdshGKRP y AdshMCT4, para disminuir la expresión de la proteína reguladora de glucoquinasa (GKRP) y el transportador de monocarboxilatos (MCT4), además de Ad β Gal como control de transducción (R. Elizondo-Vega et al., 2020; Salgado et al., 2022). La cuantificación del lactato liberado luego del metabolismo glucolítico por tanicitos (medios condicionados de tanicitos, T^{CM}), replicó los hallazgos de Salgado y cols., quienes evidenciaron que al inhibir GKRP, los tanicitos incrementaron su eficiencia glicolítica, liberando una mayor cantidad de lactato y contrariamente, al inhibir MCT4, se reduce la liberación de esta molécula. Adicionalmente, los autores demostraron que estos cambios en la concentración de lactato hipotalámico, tienen un impacto directo sobre la ingesta de alimentos evaluada en ratas inyectadas con estos Ad. Las ratas con tanicitos shGKRP mostraron un fenotipo de mayor saciedad, mientras que las ratas con tanicitos shMCT4 describieron un fenotipo asociado a una mayor sensación de hambre (R. Elizondo-Vega et al., 2020; Salgado et al., 2022). Estos resultados sugieren la relevancia de la comunicación metabólica glía-neurona en ARC, mediada por cambios en la concentración de lactato.

Siguiendo estos resultados, demostramos el efecto gliotransmisor de la activación de HCAR1 por sus agonistas en cultivos primarios de astrocitos. La

liberación de glutamato al medio extracelular, resultó ser significativamente menor cuando inhibimos la expresión de HCAR1 mediante un siRNA específico, comparada con el siRNA control. Del mismo modo, la incubación de astrocitos con los T^{CM} que contenían una mayor concentración de lactato (Adsh β Gal y AdshGKRP), favoreció la liberación de glutamato únicamente en astrocitos control, comparados con los astrocitos siHCAR1.

Dada la expresión predominante de Cx43 en los astrocitos hipotalámicos, nuestros resultados son consistentes con una contribución mayoritaria de la apertura de hemicanales de Cx43 en la gliotransmisión inducida por lactato y dependiente de la activación y expresión de HCAR1. Sin embargo, dado que D4 actúa como un amplio inhibidor de hemicanales de conexinas y que los astrocitos también expresan Cx26 y Cx30 *in situ* e *in vivo* (Giaume et al., 2021), serán necesarios estudios futuros para establecer de manera definitiva la contribución específica de las distintas conexinas en el proceso de gliotransmisión hipotalámica. En línea con lo anterior, experimentos en un modelo de depresión inducida por estrés crónico en ratas adultas, han demostrado que la apertura exacerbada de hemicanales astrogiales de Cx43 en hipocampo es esencial para facilitar la gliotransmisión aberrante, caracterizada por la liberación de glutamato y D-serina. Esto provocó una sobreactivación de los receptores de tipo NMDA postsinápticos, contribuyendo al desarrollo de conductas de tipo depresivo, las cuales fueron reducidas significativamente cuando se inhibió la apertura específica de hemicanales de Cx43, con el péptido mimético TAT-Cx43L2 (Duarte et al., 2024)

La aplicación de T^{CM} con distintas concentraciones de lactato moduló diferencialmente la amplitud y la cinética de las respuestas de Ca²⁺ en astrocitos hipotalámicos de manera dependiente de HCAR1. Con niveles basales de lactato, HCAR1 aceleró la dinámica de activación astrogliar, mientras que concentraciones elevadas promovieron respuestas más intensas y sostenidas exclusivamente en condiciones control. En contraste, a bajas concentraciones de lactato, la activación inicial pareció estar dominada por otros factores solubles del T^{CM}, sugiriendo que HCAR1 contribuye principalmente a regular la temporalidad más que la magnitud de la respuesta.

Estos resultados están en línea con la noción funcional de que los tanicitos actúan como fuentes de mensajeros metabólicos (lactato y ATP, entre otros) capaces de comunicar el estado energético a células del ARC (Frayling et al., 2011; Lhomme et al., 2021; Orellana et al., 2012; Salgado et al., 2022), y con la evidencia de que la señalización mediada por HCAR1 en astrocitos puede producir aumentos de [(Ca²⁺)] de tipo no canónico (Durkee et al., 2019; Ma et al., 2020). Mecanísticamente, la mayor amplitud y duración de respuesta inducidas por T^{CM} rico en lactato, podrían explicarse por mayor ocupación de HCAR1 y un subsecuente acoplamiento a vías $\beta\gamma$ -PLC-IP₃ que liberan Ca²⁺ desde depósitos intracelulares, o por reclutamiento de rutas β -arrestina2/ERK que amplifican y prolongan la señal (Durkee et al., 2019; Ma et al., 2020). En contraste, la aceleración del tiempo de máxima respuesta, observada en condiciones de bajo lactato en astrocitos siHCAR1, sugiere que mediadores de acción rápida presentes en el T^{CM}, por ejemplo, ATP actuando sobre receptores P2Y, pueden desencadenar respuestas iniciales más veloces que HCAR1 (Orellana et al., 2012). En

conjunto, estos datos apoyan un modelo en el cual la disponibilidad extracelular de lactato favorece no solo la probabilidad de activación astrogliar sino también la intensidad y duración de la señal de Ca^{2+} ; propiedades relevantes en la gliotransmisión y, por ende, en la modulación temporal de la excitabilidad de neuronas cercanas en el ARC (Pellerin & Magistretti, 1994; Perea & Araque, 2005; Salgado et al., 2022).

3. El silenciamiento astrogliar de HCAR1 reduce la magnitud y sincronía de las respuestas de Ca^{2+} .

La estrategia metodológica empleada de inyección de AAVs con selectividad astrogliar, nos permitió identificar astrocitos GCaMP6f positivos para registro dinámico y análisis por mapas de calor, ofreciendo ventajas para estudiar heterogeneidad celular y propiedades temporales de la señal. Por otra parte, la coinyección con AAVs para generar poblaciones control y HCAR1-KD, bajo la transducción preferente de astrocitos, nos permitió registrar cambios en la actividad de Ca^{2+} de dichas células en ARC. La confirmación de HCAR1-KD del 65 % por qRT-PCR, aporta robustez a la interpretación funcional. No obstante, esto deja una fracción residual de HCAR1 que podría estar contribuyendo a respuestas atenuadas.

La respuesta heterogénea de células del ARC frente a agonistas de HCAR1 sugiere que la señalización lactato-dependiente en tejido hipotalámico, combina respuestas metabólicas y mediadas por receptor, con consecuencias diferenciales en la proporción de células activadas, la magnitud de la señal de Ca^{2+} y su cinética.

Notablemente, L-lactato activó aproximadamente el doble de astrocitos que D-lactato y 3CI-HBA. La mayor amplitud inducida por 3CI-HBA (agonista no transportable y de alta afinidad), apoya la idea de un efecto mediado exclusivamente por receptor, evitando así la contribución metabólica (Dvorak et al., 2012; Laroche et al., 2021). En esta misma línea, la aplicación de L-Lactato en presencia de 4-CIN redujo la fracción de células activadas. Estos resultados sugieren que, aunque el transporte por MCTs contribuye a la respuesta global (posible componente metabólico) (Elizondo-Vega et al., 2016; R. Elizondo-Vega et al., 2020; Lhomme et al., 2021), existe una porción de la señal que es independiente del transporte y es consistente con la activación de HCAR1 (Órdenes et al., 2021).

La menor eficacia de activación del D-lactato frente a L-lactato, concuerda con diferencias de afinidad intrínseca entre enantiómeros sobre HCAR1 (~1,5 mM para L-Lactato y ~4,5 mM para D-Lactato), mientras que la persistencia de señales con 4-CIN indica la activación de vías extracelulares-receptoras además, reduciendo efectos por transporte-metabolismo (Cai et al., 2008; Dvorak et al., 2012). La cinética rápida de activación observada con 3CI-HBA y también con L-lactato en presencia de 4-CIN, sugiere que el bloqueo del transporte favorece una señalización única de HCAR1, que desencadena una liberación de Ca^{2+} significativamente más rápida, similar a lo evidenciado en los experimentos *in vitro*.

Los ensayos secuenciales con diferentes agonistas de HCAR1, aportan información importante sobre la regulación temporal y la posible desensibilización del receptor: la segunda estimulación con 3CI-HBA aumentó la amplitud normalizada

respecto al primer agonista (tanto tras L-lactato+4-CIN como tras D-lactato), lo que descarta una desensibilización rápida e indica que 3CI-HBA puede activar fuertemente esta vía. Esto es coherente con que ciertos agonistas sintéticos actúen como agonistas fuertes o favorezcan estados conformacionales del receptor con mayor acoplamiento efector (Dvorak et al., 2012). Además, el hecho de mantener e incrementar la respuesta, sugiere que los mecanismos de fosforilación interna inducidos por la activación del receptor, así como el reclutamiento de β -arrestinas que median desensibilización en otros sistemas, no producen una inhibición funcional inmediata tras pulsos separados con diferentes moléculas, como se ha reportado para otros GPCRs (Chen & Tesmer, 2022).

Fisiológicamente, la coexistencia de señales mediadas por transporte y/o receptor en el ARC, abre la posibilidad de una doble interpretación del estado energético: un componente rápido, codificado por mediadores solubles (como ATP liberado a través de hemicanales) y capaz de desencadenar respuestas inmediatas; así como otro modulador relacionado con la activación de HCAR1 por lactato, que regula intensidad y duración de la respuesta astrogliar. Esto último se relaciona con la probabilidad de liberación de otros gliotransmisores hacia neuronas reguladoras del balance energético como POMC (Pellerin & Magistretti, 1994; Perea & Araque, 2005).

En rebanadas de ratones KD-HCAR1, la reducción de la población activada por L-lactato, sugiere fuertemente que HCAR1 contribuye de forma importante a que los astrocitos del ARC detecten y transduzcan señales extracelulares de lactato en cambios cuantificables de $[[Ca^{2+}]_i]$. Frente a L-lactato, los astrocitos AAV-Scramble

mostraron una mayor amplitud y una distribución más homogénea de la activación en los mapas de calor, mientras que los astrocitos HCAR1-KD exhibieron respuestas de menor amplitud y mayor heterogeneidad. Este patrón sugiere que HCAR1 no solo incrementa la probabilidad de activación, sino que también contribuye a sincronizar u homogeneizar la respuesta astrogial en el microambiente del ARC.

El impacto en la fracción de células activadas es especialmente relevante porque la probabilidad de activación colectiva de astrocitos condiciona la intensidad y la propagación espacial de la liberación de gliotransmisores y, por ende, el alcance de la modulación sináptica sobre neuronas adyacentes (Pellerin & Magistretti, 1994; Perea & Araque, 2005). Estudios experimentales han demostrado que elevaciones de la $[[Ca^{2+}]_i]$ en astrocitos, controlan la liberación de D-serina y glutamato, modulando la potenciación a largo plazo y la transmisión sináptica local, así como la respuesta de circuitos *in vivo* (Corkrum et al., 2020; Covelo & Araque, 2018; Henneberger et al., 2010).

La implementación de un agonista farmacológico específico, 3CI-HBA, confirmó que la señal observada dependía en gran medida de HCAR1: la proporción de astrocitos activados por 3CI-HBA fue significativamente mayor en ratones control que en ratones KD-HCAR1. La estimulación con 3CI-HBA evocó patrones de activación más rápidos y sostenidos en astrocitos control, y la atenuación de estos patrones tras el silenciamiento, sostiene que la acción de este agonista se realiza esencialmente por activación directa de HCAR1 y no por efectos metabólicos subsecuentes. Esta diferencia farmacológica entre agonistas (mayor amplitud y distribución de señal con

el agonista farmacológico, frente a L-lactato o D-lactato) ya había sido sugerida previamente y queda aquí demostrada en condiciones *in situ* (Dvorak et al., 2012; Laroche et al., 2021).

La inclusión del enantiómero D-lactato, que muestra menor afinidad por HCAR1, añade un componente de especificidad funcional: D-lactato indujo incrementos moderados en la actividad de astrocitos AAV-Scramble, los cuales disminuyeron en AAV-shHCAR1 (25,8 % activados vs 15 %), lo que representa una disminución del 41,9 % en la proporción de células activadas tras el silenciamiento. Este resultado indica que, aun ante un ligando de menor afinidad, HCAR1 participa en la transducción de la señal de Ca^{2+} , apoyando la noción de sensibilidad del receptor a la estereoquímica del ligando y refuerza la interpretación de que la respuesta depende de la activación del receptor y no únicamente del metabolismo de lactato (Cai et al., 2008; Dvorak et al., 2012).

En conjunto, estos resultados apoyan la idea de que la señalización por lactato en el ARC es flexible y dependiente tanto del contexto químico (incremento en la concentración del ligando) como de la activación de HCAR1, lo que tiene implicancias directas para entender cómo cambios metabólicos periféricos (ejercicio, ayuno, ingesta), pueden traducirse en respuestas neuronales adaptativas (Bergersen, 2015; Morland et al., 2017). De esta forma, fue pertinente considerar en secuencia las diferentes posibilidades de interacción metabólica que podrían establecer los astrocitos tanto con tanicitos como con neuronas POMC.

4. La activación de la señalización metabólica local tanicito-astrocito-neurona POMC es dependiente de HCAR1

En el presente trabajo presentamos evidencia sobre la interacción funcional *in situ*, del eje metabólico tanicito-astrocito, mediado por lactato y la activación de HCAR1 en ARC. Al dializar un único tanicito con perfusión intracelular de glucosa y registrar la actividad de Ca^{2+} con GCaMP6f en astrocitos vecinos, observamos un incremento robusto de la señal astrogliar en condición control, la cual se redujo de modo significativo al silenciar HCAR1 en astrocitos. La disminución relativa de ~72 % en la magnitud de la respuesta entre condiciones subraya que, en el contexto de la liberación local de lactato, HCAR1 constituye un elemento crítico de la transducción de la señal lactato-dependiente en astrocitos del ARC. Estos datos enlazan de forma directa la capacidad glicolítica de los tanicitos (Elizondo-Vega et al., 2016; R. Elizondo-Vega et al., 2020; Frayling et al., 2011; Orellana et al., 2012; Salgado et al., 2022), con una respuesta funcional glial que, por su magnitud y localización, tiene la probabilidad de influir en la liberación de gliotransmisores y, en consecuencia, en la posterior excitabilidad de neuronas reguladoras del balance energético.

Previamente, un estudio de nuestro laboratorio demostró el acoplamiento físico y funcional entre tanicitos y astrocitos en rebanadas hipotalámicas de ratón GFAP-GFP, mediado por la conexina glial más abundante, la conexina 43 (Cx43) (Recabal et al., 2018a). La diálisis de biocitina en un tanicito único, mediante una pipeta de patch, permitió identificar la difusión de este trazador hacia los tanicitos aledaños, así como astrocitos cercanos a los procesos de tanicitos; estableciendo una red pangliar que se

extiende en la pared ventricular y hacia el parénquima. Cx43 media el establecimiento de esta red, gracias a la formación de uniones comunicantes, sugiriendo un suministro de glucosa y/o lactato a las células cercanas (Dali et al., 2023; Recabal et al., 2018a). No obstante, nuestros resultados dejan en evidencia la importancia de la señalización de lactato tras la activación de HCAR1 astrogliar, además de la modulación de su actividad mediante la propagación de ondas de Ca^{2+} desde los tanicitos, a través de las uniones comunicantes (Benevento et al., 2024).

El diseño experimental utilizado nos permitió reproducir la estimulación puntual de un único tanicito y la generación local de lactato que tendría lugar *in vivo*, tras la entrada de glucosa en la pared ventricular, evitando las posibles confusiones que genera la estimulación competa de la rebanada tras la aplicación de agonistas. Adicionalmente, la combinación de la expresión astrogliar de GCaMP6f y el silenciamiento selectivo por AAV-shHCAR1, permiten atribuir la diferencia funcional observada al receptor en la población glial, reduciendo la interferencia de efectos neuronales o microgliales. Sin embargo, la persistencia de cierto aumento de Ca^{2+} en astrocitos AAV-shHCAR1, puede indicar la contribución de otros mensajeros liberados por tanicitos como ATP, que también difunde por hemicanales de Cx43 activados por glucosa (Frayling et al., 2011; Orellana et al., 2012).

De manera similar, nuestra propuesta experimental de registros simultáneos de *current-clamp* en neuronas POMC-Tomato y monitorización de $[(\text{Ca}^{2+})_i]$ en astrocitos cercanos, demuestra de forma directa que la estimulación con agonistas de HCAR1 produce un incremento de la excitabilidad en una subpoblación de neuronas POMC, a

pesar de la ausencia de expresión de HCAR1 en estas neuronas (Órdenes et al., 2021). En los trazos representativos y en el análisis por periodos, se observa que la aplicación de 3CI-HBA, L-lactato y D-lactato provoca simultáneamente un incremento en $[(Ca^{2+})_i]$ de astrocitos y una despolarización sostenida del potencial de membrana en POMC. Este patrón de respuesta apoya la hipótesis de que la activación astrogliar mediada por HCAR1 se traduce en un efecto facilitador sobre la excitabilidad neuronal en el microambiente del ARC.

El agonista farmacológico 3CI-HBA produjo la mayor amplitud de señal de $\Delta F/F_0$ y una rápida depolarización de neuronas POMC, lo que sugiere una acción exclusivamente mediada por receptor, sin componente metabólico asociado al transporte de lactato (Dvorak et al., 2012; Laroche et al., 2021). L-lactato produjo un efecto similar en magnitud, pero con una cinética que incluye recuperación parcial en el primer lavado y un nuevo incremento al final del registro, lo que podría reflejar equilibrio entre señalización por receptor y efectos dependientes del transporte o metabolismo. D-lactato, ligando de menor afinidad, también depolarizó neuronas POMC, pero con características distintas en el lavado (depolarización continua), lo que indica diferencias en los tiempos de activación de HCAR1 y la resultante modulación de la excitabilidad eléctrica de neuronas cercanas.

Por otra parte, el aumento en la excitabilidad de neuronas POMC tras la estimulación de HCAR1 con diferentes agonistas, podría explicarse fuera del eje astrocito-neurona, considerando otras poblaciones neuronales que expresan el receptor de lactato. Como demostramos en esta investigación mediante

inmunohistoquímica, FACS y RT-qPCR, las neuronas NPY también expresan HCAR1. Como ha sido ampliamente demostrado, la activación de HCAR1 en neuronas conduce a un efecto hiperpolarizante, disminuyendo su actividad eléctrica (Bozzo et al., 2013; de Castro Abrantes et al., 2019; Skwarzynska et al., 2023). Esto podría estar ocurriendo con las neuronas NPY, que, al inhibirse, favorecerían un aumento en la excitabilidad de neuronas POMC. Esta idea surge de un reciente estudio con una población de neuronas del ARC que expresan *Crabp1* (del inglés, *cellular retinoic acid-binding protein 1*) y fueron caracterizadas como neuronas inhibitorias que liberan GABA hacia las neuronas POMC. Realizando un silenciamiento sináptico específico en las neuronas *Crabp1*, se eliminó la señal inhibitoria de GABA y se registró un incremento en la frecuencia de potenciales de acción de las neuronas POMC cercanas (Wang et al., 2025).

Estos resultados, en conjunto, complementan y sustentan la funcionalidad del circuito celular propuesto, donde los tanicitos metabolizan glucosa y liberan lactato, que activa HCAR1 en astrocitos, induciendo aumentos de $[(Ca^{2+})_i]$, lo que favorece la liberación de gliotransmisores capaces de despolarizar y aumentar la excitabilidad de neuronas POMC. Esto estaría ocurriendo de forma paralela a la interacción metabólica mediada por el transporte y metabolismo de lactato, el cual es liberado por tanicitos y captado por neuronas POMC, a través de MCTs, lo que conlleva a un aumento en la excitabilidad de estas neuronas, favorecido por el aumento en la producción de ATP (Órdenes et al., 2021). De esta forma, articulando el eje tanicito-astrocito-neurona POMC, es posible integrar la información metabólica ventricular en respuestas rápidas

y locales de circuitos hipotalámicos implicados en la regulación del balance energético (Pellerin & Magistretti, 1994; Perea & Araque, 2005; Salgado et al., 2022).

5. El lactato potencia la gliotransmisión hacia neuronas POMC al aumentar la frecuencia de corrientes lentas de origen astrogial

La presencia de SICs (del inglés *slow inward currents*) en neuronas POMC del ARC sitúa a estas neuronas dentro de un marco de regulación que trasciende la transmisión sináptica clásica e incorpora activamente la comunicación glía-neurona. Las propiedades electrofisiológicas de las SICs identificadas: baja frecuencia, gran amplitud y cinéticas prolongadas, concuerdan con la definición funcional de eventos mediados por la liberación astrogial de glutamato y la subsiguiente activación de receptores NMDA extrasinápticos, tal como ha sido descrito en diversas regiones cerebrales (Fellin et al., 2004; Goenaga et al., 2023; Henneberger et al., 2010; Kovács & Pál, 2017; Perea & Araque, 2005). En este contexto, las SICs no representan simplemente una variante lenta de la transmisión excitatoria, sino una forma de señalización capaz de generar influencias sostenidas y espacialmente difusas sobre la excitabilidad neuronal.

En este marco, la observación de que la incubación con L-Lactato incrementa selectivamente la frecuencia de SICs, sin afectar significativamente las EPSCs, refuerza la idea de que el lactato actúa como una señal metabólica que recluta mecanismos de comunicación glía-neurona, más que como un modulador inespecífico

de la excitabilidad presináptica. La abolición completa de las SICs mediante el bloqueo de receptores NMDA con D-AP5 confirma la naturaleza glutamatérgica y receptor-dependiente de estos eventos y apoya su origen extrasináptico. Este patrón es consistente con estudios previos que vinculan aumentos en el Ca^{2+} astroglial con la generación de SICs y la liberación de gliotransmisores (D'Ascenzo et al., 2007; Navarrete et al., 2019; Pirttimaki et al., 2011).

La integración de estos resultados con antecedentes que describen al lactato como ligando de HCAR1 en células gliales (Durkee et al., 2019; Ma et al., 2019; Órdenes et al., 2021), permite proponer un modelo en el que el lactato no solo refleja el estado metabólico local, sino que actúa activamente como señal intercelular capaz de modular la salida gliotransmisora hacia neuronas POMC. En este sentido, la señalización lactato/HCAR1 emerge como un mecanismo mediante el cual la glía puede traducir información metabólica en cambios sostenidos de excitabilidad neuronal, contribuyendo a la estabilidad y ajuste fino del circuito hipotalámico regulador del apetito.

6. La activación de HCAR1 astroglial aumenta la frecuencia y modula la dinámica temporal de SICs en neuronas POMC

La activación de HCAR1 astroglial modula la generación de corrientes lentas SICs en neuronas POMC y lo hace de manera dinámica en el tiempo. Nuestros registros en rebanadas hipotalámicas muestran que la estimulación con los agonistas

de HCAR1 incrementa la frecuencia de SICs en la condición control, mientras que el silenciamiento selectivo de HCAR1 en astrocitos reduce significativamente esta frecuencia bajo los mismos estímulos. Este efecto se observa sin cambios paralelos en la frecuencia o la amplitud de las EPSCs, lo que indica una modulación específica de la señal lenta asociada a la gliotransmisión y no una alteración general de la transmisión glutamatérgica sináptica, como también se discutió previamente. El uso de silenciamiento específico de HCAR1 en astrocitos *in situ* permite atribuir de forma directa este fenómeno a la señalización, disminuyendo las limitaciones interpretativas de aproximaciones farmacológicas. La marcada reducción de la frecuencia de SICs en neuronas POMC tras el silenciamiento de HCAR1, aun en presencia de agonistas como L-lactato o 3CI-HBA, apoya firmemente la idea de que HCAR1 es un componente necesario para la generación de estos eventos bajo estimulación metabólica. Este hallazgo se alinea con estudios previos que muestran que manipulaciones astrogliales afectan preferentemente la frecuencia y la carga total de SICs, más que su amplitud individual (Pirttimaki et al., 2013; Pirttimaki et al., 2017).

Un aspecto particularmente relevante de estos resultados es la dimensión temporal de la modulación observada. El análisis segmentado revela que la señalización dependiente de HCAR1 no es estática, sino que evoluciona en el tiempo, con efectos que persisten o incluso se amplifican durante los periodos de lavado, especialmente en el caso de 3CI-HBA. Este comportamiento sugiere la participación de rutas intracelulares de señalización prolongada en los astrocitos hipotalámicos, como la vía IP3-Ca²⁺ o cascadas asociadas a β -arrestina y ERK, que podrían mantener

la probabilidad de liberación gliotransmisora aun tras la retirada del agonista (Chen & Tesmer, 2022; Ma et al., 2020).

Finalmente, el hecho de que la amplitud y cinética de las SICs permanezcan constantes entre condiciones experimentales, mientras que la frecuencia se modifica de manera significativa, indica que HCAR1 regula principalmente la probabilidad de eventos colectivos de gliotransmisión, más que la cantidad de glutamato liberado por evento individual. Este tipo de control tiene implicancias conceptuales importantes, ya que sugiere que la glía puede modular la excitabilidad de las neuronas POMC, ajustando las señales de entrada extrasinápticas de larga duración, sin interferir con la fuerza de la transmisión sináptica clásica. En conjunto, estos hallazgos posicionan a HCAR1 astrogliar como un integrador metabólico capaz de traducir señales energéticas locales en modulaciones temporales de la comunicación glía-neurona, contribuyendo al control fino de circuitos hipotalámicos involucrados en la regulación de la ingesta.

Los resultados integrados en esta tesis sustentan el modelo propuesto en la Figura 29A, donde el L-lactato generado por tanicitos actúa como una señal metabólica que es transmitida al parénquima del ARC y detectada por astrocitos mediante la activación de HCAR1. La activación de este receptor desencadena un aumento en la concentración intracelular de Ca^{2+} en astrogliar, lo que promueve la liberación de gliotransmisores (principalmente glutamato), que, a través de la activación de receptores NMDA extrasinápticos, incrementan la excitabilidad de neuronas POMC. Este modelo se sustenta en múltiples aproximaciones experimentales, incluyendo la

caracterización de la expresión de HCAR1 en tejido hipotalámico, manipulaciones genéticas específicas en astrocitos, análisis de dinámicas de Ca^{2+} *in vitro* e *in situ*, y registros electrofisiológicos en rebanadas hipotalámicas.

De acuerdo con este modelo, el lactato extracelular activaría HCAR1 en astrocitos del ARC, desencadenando una señalización no canónica asociada a incrementos de Ca^{2+} intracelular que favorecen la apertura de hemicanales (principalmente Cx43) y la subsecuente liberación de glutamato al espacio perisináptico (Fig. 29B). Consistentemente, el silenciamiento astroglial de HCAR1 redujo significativamente la proporción de astrocitos que respondieron a lactato y atenuó el incremento en la frecuencia de SICs inducidas por agonistas de HCAR1 (L-lactato y 3CI-HBA), sin modificar la amplitud individual de estos eventos. Estos resultados sugieren que HCAR1 regula principalmente la probabilidad de ocurrencia y sincronización de eventos de gliotransmisión, más que la cantidad de glutamato liberada en cada evento individual.

En este contexto, el glutamato liberado por astrocitos en la sinapsis tripartita modularía la excitabilidad de neuronas POMC mediante la activación de receptores NMDA extrasinápticos, como lo demuestra la sensibilidad de las SICs al antagonista D-AP5 (Fig. 29B). Sin embargo, no puede descartarse que el glutamato astroglial también module la actividad de neuronas presinápticas que proyectan hacia neuronas POMC, lo que podría contribuir indirectamente a la regulación de su excitabilidad. Explorar esta posible interacción representa una línea relevante de investigación

futura, para comprender con mayor profundidad cómo las señales metabólicas son integradas por circuitos neuronales hipotalámicos.

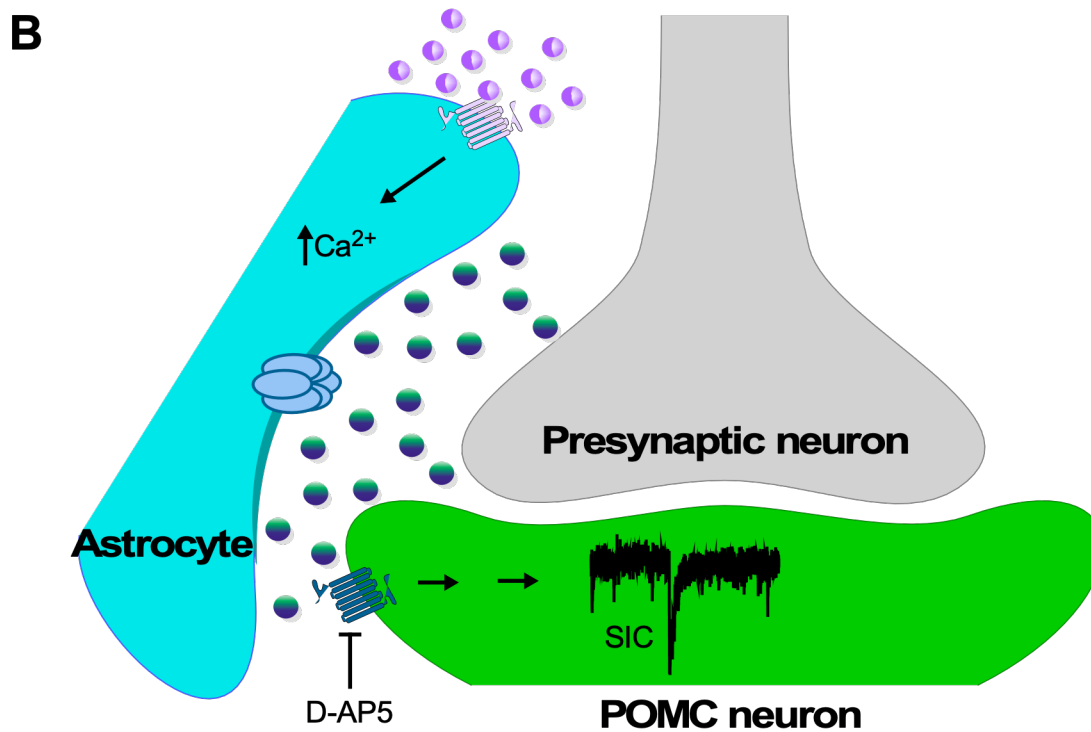
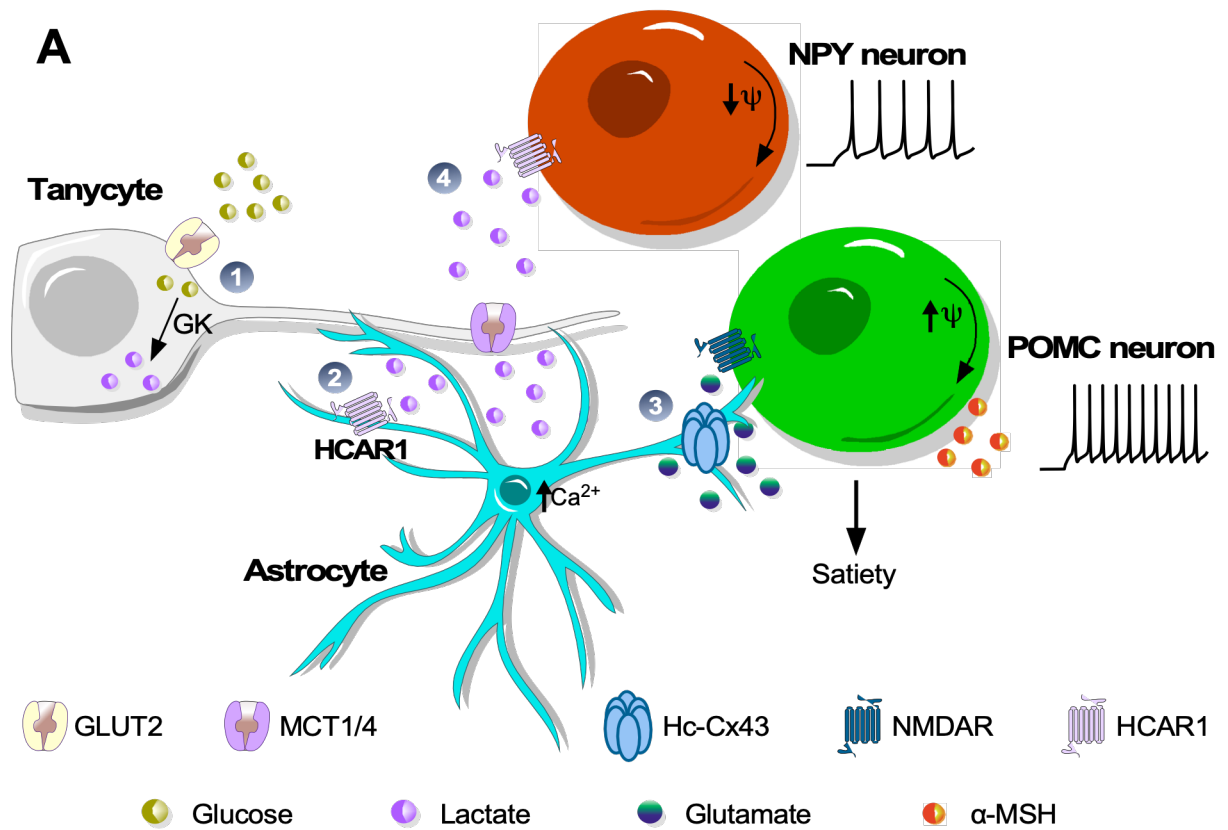


Figura 29. Modelo propuesto de interacción metabólica tanicito-astrocito-neurona POMC involucrando la activación de HCAR1 astroglial por lactato.

(A) Modelo conceptual del circuito metabólico glía–neurona en el ARC. (1) Los tanicitos captan glucosa desde el 3V y liberan L-lactato hacia el parénquima hipotalámico. (2) El lactato activa el receptor HCAR1 en astrocitos, induciendo aumentos en la concentración intracelular de Ca^{2+} . (3) Esta señalización favorece la liberación de gliotransmisores, principalmente glutamato, a través de hemicanales de conexina-43 (Hc-Cx43), lo que incrementa la excitabilidad de neuronas POMC. (4) En paralelo, la expresión de HCAR1 en neuronas inhibitorias del tipo NPY, sugiere un mecanismo adicional en el cual la activación de este receptor podría reducir la inhibición ejercida sobre neuronas POMC, potenciando su activación. Este doble mecanismo permitiría integrar señales metabólicas rápidas con modulaciones más sostenidas del circuito anorexigénico.

(B) Modulación glutamatérgica perisináptica en neuronas POMC. El glutamato liberado por astrocitos al espacio perisináptico activa receptores NMDA extrasinápticos en neuronas POMC, incrementando la frecuencia de *slow inward currents* (SICs). Estos eventos son inhibidos por el antagonista de NMDA, D-AP5, indicando su dependencia de la señalización glutamatérgica. No se descarta que el glutamato astroglial también pueda modular la actividad de neuronas presinápticas que proyectan hacia neuronas POMC.

VIII. CONCLUSIONES

1. El receptor de lactato HCAR1 presenta una localización celular diferencial en el ARC, localizándose funcionalmente en astrocitos y neuronas NPY, pero estando ausente en la población de neuronas POMC. Este hallazgo posiciona al astrocito como un importante transductor de la señal metabólica (lactato) hacia las neuronas POMC.
2. La activación de HCAR1 en astrocitos hipotalámicos induce un incremento robusto y sostenido de la concentración de calcio intracelular a través de una vía de señalización no canónica para receptores G_i . Esta movilización de calcio es necesaria para desencadenar la gliotransmisión glutamatérgica, regulando así la actividad eléctrica de neuronas POMC adyacentes.
3. La gliotransmisión dependiente de la activación de HCAR1 por lactato, está mediada por la apertura de Hc-Cx43, y la consecuente liberación de glutamato al espacio perisináptico. La disminución en la concentración de lactato, el bloqueo de hemicanales o el silenciamiento selectivo de HCAR1 astroglial, disminuyen la concentración del glutamato liberado.
4. El lactato incrementa la actividad eléctrica de neuronas POMC mediante la generación de corrientes lentas (SICs) dependientes de la activación de receptores NMDA extrasinápticos. La frecuencia de estos eventos está directamente modulada por la actividad del receptor HCAR1 astroglial, lo que otorga a los astrocitos la propiedad de regular la actividad de las neuronas de la saciedad, actuando en la sinapsis tripartita.

5. Lactato actúa como coordinador del acoplamiento metabólico tanicito-astrocito-neurona POMC en el núcleo arqueado. Esto favorece la transducción de respuestas sinérgicas, que promueven incrementos en la excitabilidad de neuronas POMC vía gliotransmisión.

IX. REFERENCIAS

- Abraham, M. B., Jones, T. W., Naranjo, D., Karges, B., Oduwole, A., Tauschmann, M., & Maahs, D. M. (2018). ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2018: Assessment and management of hypoglycemia in children and adolescents with diabetes. *Pediatric diabetes*, *19*, 178-192.
- Ahmed, K., Tunaru, S., Tang, C., Müller, M., Gille, A., Sassmann, A.,...Offermanns, S. (2010). An autocrine lactate loop mediates insulin-dependent inhibition of lipolysis through GPR81. *Cell metabolism*, *11*(4), 311-319.
- Akmayev, I., Fidelina, O., Kabolova, Z., Popov, A., & Schitkova, T. (1973). Morphological aspects of the hypothalamic-hypophyseal system. IV. Medial basal hypothalamus. An experimental morphological study. *Zeitschrift fur Zellforschung und Mikroskopische Anatomie (Vienna, Austria: 1948)*, *137*(4), 493-512.
- Aponte, Y., Atasoy, D., & Sternson, S. M. (2011). AGRP neurons are sufficient to orchestrate feeding behavior rapidly and without training. *Nature neuroscience*, *14*(3), 351-355.
- Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R. P., & Haydon, P. G. (1999). Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends in neurosciences*, *22*(5), 208-215.
- Atasoy, D., Betley, J. N., Su, H. H., & Sternson, S. M. (2012). Deconstruction of a neural circuit for hunger. *Nature*, *488*(7410), 172-177.
- Balland, E., Chen, W., Tiganis, T., & Cowley, M. A. (2019). Persistent leptin signaling in the arcuate nucleus impairs hypothalamic insulin signaling and glucose homeostasis in obese mice. *Neuroendocrinology*, *109*(4), 374-390.
- Barahona, M. J., Llanos, P., Recabal, A., Escobar-Acuna, K., Elizondo-Vega, R., Salgado, M.,...Garcia-Robles, M. A. (2018). Glial hypothalamic inhibition of GLUT2 expression alters satiety, impacting eating behavior. *Glia*, *66*(3), 592-605. <https://doi.org/10.1002/glia.23267>
- Belgardt, B. F., Okamura, T., & Brüning, J. C. (2009). Hormone and glucose signalling in POMC and AgRP neurons. *The Journal of physiology*, *587*(22), 5305-5314.

- Benevento, M., Alpár, A., Gundacker, A., Afjehi, L., Balueva, K., Hevesi, Z.,...Lubec, G. (2024). A brainstem–hypothalamus neuronal circuit reduces feeding upon heat exposure. *Nature*, 628(8009), 826-834.
- Bergersen, L. H. (2015). Lactate transport and signaling in the brain: potential therapeutic targets and roles in body—Brain interaction. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 35(2), 176-185.
- Bittar, P. G., Charnay, Y., Pellerin, L., Bouras, C., & Magistretti, P. J. (1996). Selective distribution of lactate dehydrogenase isoenzymes in neurons and astrocytes of human brain. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 16(6), 1079-1089.
- Bolborea, M., Pollatzek, E., Benford, H., Sotelo-Hitschfeld, T., & Dale, N. (2020). Hypothalamic tanycytes generate acute hyperphagia through activation of the arcuate neuronal network. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(25), 14473-14481.
- Bozzo, L., Puyal, J., & Chatton, J.-Y. (2013). Lactate modulates the activity of primary cortical neurons through a receptor-mediated pathway. *PLoS One*, 8(8), e71721.
- Briquet, M., Rocher, A.-B., Alessandri, M., Rosenberg, N., de Castro Abrantes, H., Wellbourne-Wood, J.,...Pralong, E. (2022). Activation of lactate receptor HCAR1 down-modulates neuronal activity in rodent and human brain tissue. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 42(9), 1650-1665.
- BRÖER, S., BRÖER, A., SCHNEIDER, H.-P., STEGEN, C., HALESTRAP, A. P., & DEITMER, J. W. (1999). Characterization of the high-affinity monocarboxylate transporter MCT2 in *Xenopus laevis* oocytes. *Biochemical Journal*, 341(3), 529-535.
- Brüning, J. C., & Fenselau, H. (2023). Integrative neurocircuits that control metabolism and food intake. *Science*, 381(6665), eabl7398.
- Burdakov, D., Luckman, S. M., & Verkhratsky, A. (2005). Glucose-sensing neurons of the hypothalamus. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1464), 2227-2235.
- Bélanger, M., Allaman, I., & Magistretti, P. J. (2011). Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell metabolism*, 14(6), 724-738.

- Cai, T.-Q., Ren, N., Jin, L., Cheng, K., Kash, S., Chen, R.,...Waters, M. G. (2008). Role of GPR81 in lactate-mediated reduction of adipose lipolysis. *Biochemical and biophysical research communications*, 377(3), 987-991.
- Campbell, J. N., Macosko, E. Z., Fenselau, H., Pers, T. H., Lyubetskaya, A., Tenen, D.,...Tsai, L. T. (2017). A molecular census of arcuate hypothalamus and median eminence cell types. *Nat Neurosci*, 20(3), 484-496. <https://doi.org/10.1038/nn.4495>
- Cardenas, M. L., Cornish-Bowden, A., & Ureta, T. (1998). Evolution and regulatory role of the hexokinases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1401(3), 242-264.
- Castro, D. C., Cole, S. L., & Berridge, K. C. (2015). Lateral hypothalamus, nucleus accumbens, and ventral pallidum roles in eating and hunger: interactions between homeostatic and reward circuitry. *Frontiers in systems neuroscience*, 9, 90.
- Chen, Q., & Tesmer, J. J. (2022). G protein–coupled receptor interactions with arrestins and GPCR kinases: The unresolved issue of signal bias. *Journal of Biological Chemistry*, 298(9).
- Cifuentes, L., & Acosta, A. (2022). Homeostatic regulation of food intake. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, 46(2), 101794.
- Coca, A., Lopez, S., Ordenes, P., Sepulveda, V., Cuevas, D., Villarroel, A.,...Garcia-Robles, M. A. (2025). Knocking down the neuronal lactate transporter MCT2 in the arcuate nucleus of female rats increases food intake and body weight. *Sci Rep*, 15(1), 7497. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-90513-2>
- Collaborators, G. O. (2017). Health effects of overweight and obesity in 195 countries over 25 years. *New England journal of medicine*, 377(1), 13-27.
- Corkrum, M., Covelo, A., Lines, J., Bellocchio, L., Pisansky, M., Loke, K.,...Marsicano, G. (2020). Dopamine-evoked synaptic regulation in the nucleus accumbens requires astrocyte activity. *Neuron*, 105(6), 1036-1047. e1035.
- Cornejo, M. P., Hentges, S. T., Maliqueo, M., Coirini, H., Becu-Villalobos, D., & Elias, C. F. (2016). Neuroendocrine regulation of metabolism. *Journal of neuroendocrinology*, 28(7).

- Cortes-Campos, C., Elizondo, R., Carril, C., Martinez, F., Boric, K., Nualart, F., & Garcia-Robles, M. A. (2013). MCT2 expression and lactate influx in anorexigenic and orexigenic neurons of the arcuate nucleus. *PLoS One*, 8(4), e62532. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062532>
- Cortés-Campos, C., Elizondo, R., Llanos, P., Uranga, R. M., Nualart, F., & García, M. A. (2011). MCT expression and lactate influx/efflux in tanycytes involved in glia-neuron metabolic interaction. *PLoS One*, 6(1), e16411.
- Cota, D., Proulx, K., Smith, K. A. B., Kozma, S. C., Thomas, G., Woods, S. C., & Seeley, R. J. (2006). Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. *science*, 312(5775), 927-930.
- Covelo, A., & Araque, A. (2018). Neuronal activity determines distinct gliotransmitter release from a single astrocyte. *elife*, 7, e32237.
- Cowley, M. A., Smart, J. L., Rubinstein, M., Cerdán, M. G., Diano, S., Horvath, T. L.,...Low, M. J. (2001). Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature*, 411(6836), 480-484.
- Csemer, A., Kovács, A., Maamrah, B., Pocsai, K., Korpás, K., Klekner, Á.,...Pál, B. (2023). Astrocyte-and NMDA receptor-dependent slow inward currents differently contribute to synaptic plasticity in an age-dependent manner in mouse and human neocortex. *Aging Cell*, 22(9), e13939.
- Cunnane, S., Nugent, S., Roy, M., Courchesne-Loyer, A., Croteau, E., Tremblay, S.,...Paquet, N. (2011). Brain fuel metabolism, aging, and Alzheimer's disease. *Nutrition*, 27(1), 3-20.
- D'Ascenzo, M., Fellin, T., Terunuma, M., Revilla-Sanchez, R., Meaney, D. F., Auberson, Y. P.,...Haydon, P. G. (2007). mGluR5 stimulates gliotransmission in the nucleus accumbens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(6), 1995-2000.
- Dali, R., Estrada-Meza, J., & Langlet, F. (2023). Tanycyte, the neuron whisperer. *Physiology & behavior*, 263, 114108.
- de Castro Abrantes, H., Briquet, M., Schmuziger, C., Restivo, L., Puyal, J., Rosenberg, N.,...Chatton, J.-Y. (2019). The lactate receptor HCAR1 modulates neuronal

network activity through the activation of G α and G $\beta\gamma$ subunits. *Journal of neuroscience*, 39(23), 4422-4433.

De Ceglia, R., Ledonne, A., Litvin, D. G., Lind, B. L., Carriero, G., Latagliata, E. C.,...Vitali, I. (2023). Specialized astrocytes mediate glutamatergic gliotransmission in the CNS. *Nature*, 622(7981), 120-129.

Deitmer, J. W., Theparambil, S. M., Ruminot, I., Noor, S. I., & Becker, H. M. (2019). Energy dynamics in the brain: contributions of astrocytes to metabolism and pH homeostasis. *Frontiers in neuroscience*, 13, 1301.

Demidowich, A. P., Jun, J. Y., & Yanovski, J. A. (2017). Polymorphisms and mutations in the melanocortin-3 receptor and their relation to human obesity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1863(10), 2468-2476.

Diéguez, C., Vazquez, M. J., Romero, A., Lopez, M., & Nogueiras, R. (2011). Hypothalamic control of lipid metabolism: focus on leptin, ghrelin and melanocortins. *Neuroendocrinology*, 94(1), 1-11.

Duarte, Y., Quintana-Donoso, D., Moraga-Amaro, R., Dinamarca, I., Lemunao, Y., Cárdenas, K.,...Navas, C. (2024). The role of astrocytes in depression, its prevention, and treatment by targeting astroglial gliotransmitter release. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 121(46), e2307953121.

Durkee, C. A., & Araque, A. (2019). Diversity and Specificity of Astrocyte–neuron Communication. *Neuroscience*, 396, 73-78.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.11.010>

Durkee, C. A., Covelo, A., Lines, J., Kofuji, P., Aguilar, J., & Araque, A. (2019). Gi/o protein-coupled receptors inhibit neurons but activate astrocytes and stimulate gliotransmission. *Glia*, 67(6), 1076-1093.

Dvorak, C. A., Liu, C., Shelton, J., Kuei, C., Sutton, S. W., Lovenberg, T. W., & Carruthers, N. I. (2012). Identification of hydroxybenzoic acids as selective lactate receptor (GPR81) agonists with antilipolytic effects. *ACS medicinal chemistry letters*, 3(8), 637-639.

Elizondo-Vega, R., Cortes-Campos, C., Barahona, M. J., Carril, C., Ordenes, P., Salgado, M.,...Garcia-Robles, M. L. (2016). Inhibition of hypothalamic MCT1

expression increases food intake and alters orexigenic and anorexigenic neuropeptide expression. *Sci Rep*, 6, 33606. <https://doi.org/10.1038/srep33606>

Elizondo-Vega, R., Cortes-Campos, C., Barahona, M. J., Oyarce, K. A., Carril, C. A., & Garcia-Robles, M. A. (2015). The role of tanycytes in hypothalamic glucosensing. *J Cell Mol Med*, 19(7), 1471-1482. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12590>

Elizondo-Vega, R., Oyarce, K., Salgado, M., Barahona, M. J., Recabal, A., Ordenes, P.,...Garcia-Robles, M. A. (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. <https://doi.org/10.1007/s12035-019-01776-6>

Federation., W. O. (2025). *World Obesity Atlas 2025*. <https://data.worldobesity.org/publications/?cat=23>

Fellin, T., Pascual, O., Gobbo, S., Pozzan, T., Haydon, P. G., & Carmignoto, G. (2004). Neuronal synchrony mediated by astrocytic glutamate through activation of extrasynaptic NMDA receptors. *Neuron*, 43(5), 729-743.

Fioramonti, X., Contié, S., Song, Z., Routh, V. H., Lorsignol, A., & Pénicaud, L. (2007). Characterization of glucosensing neuron subpopulations in the arcuate nucleus: integration in neuropeptide Y and pro-opio melanocortin networks? *Diabetes*, 56(5), 1219-1227.

Frayling, C., Britton, R., & Dale, N. (2011). ATP-mediated glucosensing by hypothalamic tanycytes. *The Journal of physiology*, 589(9), 2275-2286.

Fuster, M., Burrowes, S., Cuadrado, C., Velasco Bernal, A., Lewis, S., McCarthy, B., & Shen, G. C. (2021). Understanding policy change for obesity prevention: learning from sugar-sweetened beverages taxes in Mexico and Chile. *Health promotion international*, 36(1), 155-164.

Garcia, M., Millan, C., Balmaceda-Aguilera, C., Castro, T., Pastor, P., Montecinos, H.,...Nualart, F. (2003). Hypothalamic ependymal-glial cells express the glucose transporter GLUT2, a protein involved in glucose sensing. *J Neurochem*, 86(3), 709-724. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01892.x>

- Ge, H., Weiszmann, J., Reagan, J. D., Gupte, J., Baribault, H., Gyuris, T., ... Li, Y. (2008). Elucidation of signaling and functional activities of an orphan GPCR, GPR81. *Journal of lipid research*, 49(4), 797-803.
- Geller, S., Arribat, Y., Netzahualcoyotzi, C., Lagarrigue, S., Carneiro, L., Zhang, L., ... & Pellerin, L. (2019). Tanycytes regulate lipid homeostasis by sensing free fatty acids and signaling to key hypothalamic neuronal populations via FGF21 secretion. *Cell Metabolism*, 30(4), 833-844.
- Giaume, C., Naus, C. C., Sáez, J. C., & Leybaert, L. (2021). Glial connexins and pannexins in the healthy and diseased brain. *Physiological reviews*, 101(1), 93-145.
- Goenaga, J., Araque, A., Kofuji, P., & Herrera Moro Chao, D. (2023). Calcium signaling in astrocytes and gliotransmitter release. *Frontiers in synaptic neuroscience*, 15, 1138577.
- Guh, D. P., Zhang, W., Bansback, N., Amarsi, Z., Birmingham, C. L., & Anis, A. H. (2009). The incidence of co-morbidities related to obesity and overweight: a systematic review and meta-analysis. *BMC public health*, 9(1), 1-20.
- Hadzic, A., Nguyen, T. D., Hosoyamada, M., Tomioka, N. H., Bergersen, L. H., Storm-Mathisen, J., & Morland, C. (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. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18), 6457.
- Halestrap, A. P., & Wilson, M. C. (2012). The monocarboxylate transporter family—role and regulation. *IUBMB life*, 64(2), 109-119.
- Henneberger, C., Papouin, T., Oliet, S. H., & Rusakov, D. A. (2010). Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes. *Nature*, 463(7278), 232-236.
- Hentges, S. T., Otero-Corchon, V., Pennock, R. L., King, C. M., & Low, M. J. (2009). Proopiomelanocortin expression in both GABA and glutamate neurons. *Journal of Neuroscience*, 29(43), 13684-13690.
- Herrera-López, G., & Galván, E. J. (2018). Modulation of hippocampal excitability via the hydroxycarboxylic acid receptor 1. *Hippocampus*, 28(8), 557-567.

- Hill, J. O., Wyatt, H. R., & Peters, J. C. (2012). Energy balance and obesity. *Circulation*, 126(1), 126-132. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.087213>
- Hu, J., Jiang, L., Low, M. J., & Rui, L. (2014). Glucose rapidly induces different forms of excitatory synaptic plasticity in hypothalamic POMC neurons. *PLoS One*, 9(8), e105080.
- Ibrahim, N., Bosch, M. A., Smart, J. L., Qiu, J., Rubinstein, M., Rønnekleiv, O. K.,...Kelly, M. J. (2003). Hypothalamic proopiomelanocortin neurons are glucose responsive and express KATP channels. *Endocrinology*, 144(4), 1331-1340.
- Itoh, Y., Esaki, T., Shimoji, K., Cook, M., Law, M. J., Kaufman, E., & Sokoloff, L. (2003). Dichloroacetate effects on glucose and lactate oxidation by neurons and astroglia in vitro and on glucose utilization by brain in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(8), 4879-4884.
- Jackson, R. S., Amdur, R. L., White, J. C., & Macsata, R. A. (2012). Hyperglycemia is associated with increased risk of morbidity and mortality after colectomy for cancer. *Journal of the American College of Surgeons*, 214(1), 68-80.
- Jürgens, H., Haass, W., Castaneda, T. R., Schürmann, A., Koebnick, C., Dombrowski, F.,...Spranger, J. (2005). Consuming fructose-sweetened beverages increases body adiposity in mice. *Obesity research*, 13(7), 1146-1156.
- Kofuji, P., & Araque, A. (2021). G-protein-coupled receptors in astrocyte–neuron communication. *Neuroscience*, 456, 71-84.
- Kovács, A., & Pál, B. (2017). Astrocyte-dependent slow inward currents (SICs) participate in neuromodulatory mechanisms in the pedunclopontine nucleus (PPN). *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11, 16.
- Lam, C. K., Chari, M., Wang, P. Y., & Lam, T. K. (2008). Central lactate metabolism regulates food intake. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 295(2), E491-E496.
- Langlet, F., Mullier, A., Bouret, S. G., Prevot, V., & Dehouck, B. (2013). Tanycyte-like cells form a blood–cerebrospinal fluid barrier in the circumventricular organs of the mouse brain. *Journal of Comparative Neurology*, 521(15), 3389-3405.

- Laroche, S., Stil, A., Germain, P., Cherif, H., Chemtob, S., & Bouchard, J.-F. (2021). Participation of L-lactate and its receptor HCAR1/GPR81 in neurovisual development. *Cells*, *10*(7), 1640.
- Laughton, J. D., Bittar, P., Charnay, Y., Pellerin, L., Kovari, E., Magistretti, P. J., & Bouras, C. (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 neuroscience*, *8*(1), 35.
- Lauritzen, K. H., Morland, C., Puchades, M., Holm-Hansen, S., Hagelin, E. M., Lauritzen, F.,...Bergersen, L. H. (2014). Lactate receptor sites link neurotransmission, neurovascular coupling, and brain energy metabolism. *Cerebral cortex*, *24*(10), 2784-2795.
- Lenard, N. R., & Berthoud, H. R. (2008). Central and peripheral regulation of food intake and physical activity: pathways and genes. *Obesity*, *16*(S3), S11-S22.
- Levin, B. E., Routh, V. H., Kang, L., Sanders, N. M., & Dunn-Meynell, A. A. (2004). Neuronal glucosensing: what do we know after 50 years? *Diabetes*, *53*(10), 2521-2528.
- Lhomme, T., Clasadonte, J., Imbernon, M., Fernandois, D., Sauve, F., Caron, E.,...Mueller-Fielitz, H. (2021). Tanycytic networks mediate energy balance by feeding lactate to glucose-insensitive POMC neurons. *The Journal of Clinical Investigation*, *131*(18).
- Li, V. L., He, Y., Contrepois, K., Liu, H., Kim, J. T., Wiggernhorn, A. L.,...Zushin, P.-J. H. (2022). An exercise-inducible metabolite that suppresses feeding and obesity. *Nature*, *606*(7915), 785-790.
- Liu, C., Wu, J., Zhu, J., Kuei, C., Yu, J., Shelton, J.,...Mirzadegan, T. (2009). Lactate inhibits lipolysis in fat cells through activation of an orphan G-protein-coupled receptor, GPR81. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(5), 2811-2822.
- Ma, D., Fan, J., Tian, Y., Jiang, P., Wang, J., Zhu, H., & Bai, J. (2019). Selection of reference genes for quantitative real-time PCR normalisation in largemouth bass *Micropterus salmoides* fed on alternative diets. *Journal of fish biology*, *95*(2), 393-400.

- Ma, K., Ding, X., Song, Q., Han, Z., Yao, H., Ding, J., & Hu, G. (2020). Lactate enhances Arc/arg3.1 expression through hydroxycarboxylic acid receptor 1- β -arrestin2 pathway in astrocytes. *Neuropharmacology*, *171*, 108084.
- Magni, P., Dozio, E., Ruscica, M., Celotti, F., Masini, M. A., Prato, P.,...Stollo, F. (2009). Feeding behavior in mammals including humans. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1163*(1), 221-232.
- Marty, N., Dallaporta, M., & Thorens, B. (2007). Brain glucose sensing, counterregulation, and energy homeostasis. *Physiology*, *22*(4), 241-251.
- Martín, R., Bajo-Grañeras, R., Moratalla, R., Perea, G., & Araque, A. (2015). Circuit-specific signaling in astrocyte-neuron networks in basal ganglia pathways. *science*, *349*(6249), 730-734.
- Mason, B., Wang, Q., & Zigman, J. (2014). The central nervous system sites mediating the orexigenic actions of ghrelin. *Annual review of physiology*, *76*, 519-533.
- Mayer, J. (1955). Regulation of energy intake and the body weight: the glucostatic theory and the lipostatic hypothesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *63*(1), 15-43.
- Mercer, A. J., Hentges, S. T., Meshul, C. K., & Low, M. J. (2013). Unraveling the central proopiomelanocortin neural circuits. *Frontiers in neuroscience*, *7*, 19.
- Mergenthaler, P., Lindauer, U., Dienel, G. A., & Meisel, A. (2013). Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function. *Trends in neurosciences*, *36*(10), 587-597.
- Millan, C., Martinez, F., Cortes-Campos, C., Lizama, I., Yanez, M. J., Llanos, P.,...Garcia, M. A. (2010). Glial glucokinase expression in adult and post-natal development of the hypothalamic region. *ASN Neuro*, *2*(3), e00035. <https://doi.org/10.1042/AN20090059>
- Millhouse, O. E. (1973). The organization of the ventromedial hypothalamic nucleus. *Brain research*, *55*(1), 71-87.
- Mobbs, C. V., Moreno, C. L., & Poplawski, M. (2013). Metabolic mystery: aging, obesity, diabetes, and the ventromedial hypothalamus. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, *24*(10), 488-494.

- Mohammad Nezhady, M. A., Modaresinejad, M., Zia, A., & Chemtob, S. (2023). Versatile lactate signaling via HCAR1: a multifaceted GPCR involved in many biological processes. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 325(6), C1502-C1515.
- Morland, C., Andersson, K. A., Haugen, Ø. P., Hadzic, A., Kleppa, L., Gille, A.,...Kennedy, L. H. (2017). Exercise induces cerebral VEGF and angiogenesis via the lactate receptor HCAR1. *Nature communications*, 8(1), 1-9.
- Morton, G. J., Meek, T. H., & Schwartz, M. W. (2014). Neurobiology of food intake in health and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(6), 367-378.
- Murat, C. D. B., & García-Cáceres, C. (2021). Astrocyte gliotransmission in the regulation of systemic metabolism. *Metabolites*, 11(11), 732.
- Nakakura, T., Suzuki, T., Tanaka, H., Arisawa, K., Miyashita, T., Nekooki-Machida, Y.,...Hagiwara, H. (2021). Fibronectin is essential for formation of fenestrae in endothelial cells of the fenestrated capillary. *Cell and Tissue Research*, 383(2), 823-833.
- Nakamura, R., Mirelman, A. J., Cuadrado, C., Silva-Illanes, N., Dunstan, J., & Suhrcke, M. (2018). Evaluating the 2014 sugar-sweetened beverage tax in Chile: an observational study in urban areas. *PLoS medicine*, 15(7), e1002596.
- Nanclares, C., Poynter, J., Martell-Martinez, H. A., Vermilyea, S., Araque, A., Kofuji, P.,...Covelo, A. (2023). Dysregulation of astrocytic Ca²⁺ signaling and gliotransmitter release in mouse models of α -synucleinopathies. *Acta neuropathologica*, 145(5), 597-610.
- Navarrete, M., Cuartero, M. I., Palenzuela, R., Draffin, J. E., Konomi, A., Serra, I.,...Nebreda, Á. R. (2019). Astrocytic p38 α MAPK drives NMDA receptor-dependent long-term depression and modulates long-term memory. *Nature communications*, 10(1), 2968.
- Nezhady, M. A. M., Cagnone, G., Bajon, E., Chaudhari, P., Modaresinejad, M., Hardy, P.,...Beauséjour, C. (2025). Unconventional receptor functions and location-biased signaling of the lactate GPCR in the nucleus. *Life Science Alliance*, 8(4).

- Offermanns, S. (2017). Hydroxy-carboxylic acid receptor actions in metabolism. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 28(3), 227-236.
- Órdenes, P., Villar, P., Tarifeño-Saldivia, E., Salgado, M., Elizondo-Vega, R., Araneda, R. C., & García-Robles, M. A. (2021). Lactate activates hypothalamic POMC neurons by intercellular signaling. *Scientific reports*, 11(1), 1-12.
- Orellana, J. A., Saez, P. J., Cortes-Campos, C., Elizondo, R. J., Shoji, K. F., Contreras-Duarte, S.,...García, M. A. (2012). Glucose increases intracellular free Ca²⁺ in tanycytes via ATP released through connexin 43 hemichannels. *Glia*, 60(1), 53-68. <https://doi.org/10.1002/glia.21246>
- Parton, L. E., Ye, C. P., Coppari, R., Enriori, P. J., Choi, B., Zhang, C.-Y.,...Lee, C. E. (2007). Glucose sensing by POMC neurons regulates glucose homeostasis and is impaired in obesity. *Nature*, 449(7159), 228-232.
- Pellerin, L., & Magistretti, P. J. (1994). Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(22), 10625-10629.
- Perea, G., & Araque, A. (2005). Properties of synaptically evoked astrocyte calcium signal reveal synaptic information processing by astrocytes. *Journal of Neuroscience*, 25(9), 2192-2203.
- Pirttimäki, T. M., Codadu, N. K., Awni, A., Pratik, P., Nagel, D. A., Hill, E. J.,...Parri, H. R. (2013). $\alpha 7$ Nicotinic receptor-mediated astrocytic gliotransmitter release: A β effects in a preclinical Alzheimer's mouse model. *PloS one*, 8(11), e81828.
- Pirttimäki, T. M., Hall, S. D., & Parri, H. R. (2011). Sustained neuronal activity generated by glial plasticity. *Journal of Neuroscience*, 31(21), 7637-7647.
- Pirttimäki, T. M., Sims, R. E., Saunders, G., Antonio, S. A., Codadu, N. K., & Parri, H. R. (2017). Astrocyte-mediated neuronal synchronization properties revealed by false gliotransmitter release. *Journal of Neuroscience*, 37(41), 9859-9870.
- Pál, B. (2024). On the functions of astrocyte-mediated neuronal slow inward currents. *Neural Regeneration Research*, 19(12), 2602-2612.

- Recabal, A., Elizondo-Vega, R., Philippot, C., Salgado, M., López, S., Palma, A.,...Caprile, T. (2018a). Connexin-43 gap junctions are responsible for the hypothalamic tanycyte-coupled network. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 406.
- Robins, S., Stewart, I., McNay, D., Taylor, V., Giachino, C., Goetz, M.,...Flier, J. (2013). α -Tanycytes of the adult hypothalamic third ventricle include distinct populations of FGF-responsive neural progenitors. *Nature communications*, 4(1), 1-13.
- Rodríguez, E. M., Blázquez, J. L., & 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), 757-776.
- Rodríguez, E. M., Blázquez, J. L., Pastor, F. E., Peláez, B., Pena, P., Peruzzo, B., & Amat, P. (2005). Hypothalamic tanycytes: a key component of brain–endocrine interaction. *International review of cytology*, 247, 89-164.
- Rossi, M. A., & Stuber, G. D. (2018). Overlapping brain circuits for homeostatic and hedonic feeding. *Cell metabolism*, 27(1), 42-56.
- Rowan, B. G., Gimble, J. M., Sheng, M., Anbalagan, M., Jones, R. K., Frazier, T. P.,...Kutner, R. (2014). Human adipose tissue-derived stromal/stem cells promote migration and early metastasis of triple negative breast cancer xenografts. *PloS one*, 9(2), e89595.
- Römer, B., Krebs, J., Overall, R. W., Fabel, K., Babu, H., Overstreet-Wadiche, L.,...Kempermann, G. (2011). Adult hippocampal neurogenesis and plasticity in the infrapyramidal bundle of the mossy fiber projection: I. Co-regulation by activity. *Frontiers in neuroscience*, 5, 107.
- Salgado, M., Elizondo-Vega, R., Villar, P. S., Konar, M., Gallegos, S., Tarifeno-Saldivia, E.,...Garcia-Robles, M. A. (2022). GGRP-dependent modulation of feeding behavior by tanycyte-released monocarboxylates. *Theranostics*, 12(4), 1518-1536. <https://doi.org/10.7150/thno.66634>
- Salgado, M., Ordenes, P., Villagra, M., Uribe, E., Garcia-Robles, M. L. A., & Tarifeno-Saldivia, E. (2019). When a Little Bit More Makes the Difference: Expression Levels of GGRP Determines the Subcellular Localization of GK in Tanycytes. *Front Neurosci*, 13, 275. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00275>

- Salgado, M., Tarifeno-Saldivia, E., Ordenes, P., Millan, C., Yanez, M. J., Llanos, P.,...de Los Angeles Garcia-Robles, M. (2014). Dynamic localization of glucokinase and its regulatory protein in hypothalamic tanycytes. *PLoS One*, 9(4), e94035. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094035>
- Schreiber, R., Xie, H., & Schweiger, M. (2019). Of mice and men: The physiological role of adipose triglyceride lipase (ATGL). *Biochimica et biophysica acta (BBA)-Molecular and cell biology of lipids*, 1864(6), 880-899.
- Schwartz, M. W. (1997). Regulation of appetite and body weight. *Hospital Practice*, 32(7), 109-119.
- Schwartz, M. W., Seeley, R. J., Campfield, L. A., Burn, P., & Baskin, D. G. (1996). Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *The Journal of clinical investigation*, 98(5), 1101-1106.
- Schwartz, M. W., Woods, S. C., Porte, D., Seeley, R. J., & Baskin, D. G. (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature*, 404(6778), 661-671.
- Shen, Y., Tian, M., Zheng, Y., Gong, F., Fu, A. K., & Ip, N. Y. (2016). Stimulation of the hippocampal POMC/MC4R circuit alleviates synaptic plasticity impairment in an Alzheimer's disease model. *Cell reports*, 17(7), 1819-1831.
- Simpson, K. A., Martin, N. M., & Bloom, S. R. (2009). Hypothalamic regulation of food intake and clinical therapeutic applications. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 53, 120-128.
- Skwarzynska, D., Sun, H., Williamson, J., Kasprzak, I., & Kapur, J. (2023). Glycolysis regulates neuronal excitability via lactate receptor, HCA1R. *Brain*, 146(5), 1888-1902.
- Solheim, M. H., Stroganov, S., Chen, W., Subagia, P. S., Bauder, C. A., Wnuk-Lipinski, D.,...Klemm, P. (2025). Hypothalamic PNOC/NPY neurons constitute mediators of leptin-controlled energy homeostasis. *Cell*, 188(13), 3550-3566. e3522.
- Spiegelman, B. M., & Flier, J. S. (2001). Obesity and the regulation of energy balance. *Cell*, 104(4), 531-543.

- Sánchez-Alvarez, R., Tabernero, A., & Medina, J. M. (2004). Endothelin-1 stimulates the translocation and upregulation of both glucose transporter and hexokinase in astrocytes: relationship with gap junctional communication. *Journal of neurochemistry*, 89(3), 703-714.
- Tang, F., Lane, S., Korsak, A., Paton, J., Gourine, A., Kasparov, S., & Teschemacher, A. (2014). Lactate-mediated glia-neuronal signalling in the mammalian brain. *Nature communications*, 5(1), 3284.
- Turner, H. E., Nagy, Z., Gatter, K. C., Esiri, M. M., Harris, A. L., & Wass, J. A. (2000). Angiogenesis in pituitary adenomas and the normal pituitary gland. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 85(3), 1159-1162.
- Uranga, R. M., Millan, C., Barahona, M. J., Recabal, A., Salgado, M., Martinez, F.,...Garcia-Robles, M. L. A. (2017). Adenovirus-mediated suppression of hypothalamic glucokinase affects feeding behavior. *Sci Rep*, 7(1), 3697. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03928-x>
- Valassi, E., Scacchi, M., & Cavagnini, F. (2008). Neuroendocrine control of food intake. *Nutrition, metabolism and cardiovascular diseases*, 18(2), 158-168.
- Varela, L., & Horvath, T. L. (2012). Leptin and insulin pathways in POMC and AgRP neurons that modulate energy balance and glucose homeostasis. *EMBO reports*, 13(12), 1079-1086.
- Villasana, L. E., Kim, K. N., Westbrook, G. L., & Schnell, E. (2015). Functional integration of adult-born hippocampal neurons after traumatic brain injury. *eneuro*, 2(5).
- Wang, R., Liu, X., Hentges, S., Dunn-Meynell, A., Levin, B., Wang, W., & Routh, V. H. (2004). The regulation of glucose-excited neurons in the hypothalamic arcuate nucleus by glucose and feeding-relevant peptides. *Diabetes*, 53(8), 1959-1965.
- Wang, T., Han, S., Wang, Y., Li, Y., Li, Y., Xing, Z.,...Chen, Z.-H. (2025). Identification of a neural basis for energy expenditure in the mouse arcuate hypothalamus. *Neuron*.
- Wardlaw, S. L. (2011). Hypothalamic proopiomelanocortin processing and the regulation of energy balance. *European journal of pharmacology*, 660(1), 213-219.

- Wattez, J.-S., Delahaye, F., Lukaszewski, M.-A., Risold, P.-Y., Eberlé, D., Vieau, D., & Breton, C. (2013). Perinatal nutrition programs the hypothalamic melanocortin system in offspring. *Hormone and Metabolic Research*, 45(13), 980-990.
- Wen, S., Wang, C., Gong, M., & Zhou, L. (2019). An overview of energy and metabolic regulation. *Science China Life Sciences*, 62(6), 771-790.
- Wise, A., Foord, S. M., Fraser, N. J., Barnes, A. A., Elshourbagy, N., Eilert, M.,...Green, A. (2003). Molecular identification of high and low affinity receptors for nicotinic acid. *Journal of Biological Chemistry*, 278(11), 9869-9874.
- Woods, S. C. (2009). The control of food intake: behavioral versus molecular perspectives. *Cell metabolism*, 9(6), 489-498.
- Wyss, M. T., Jolivet, R., Buck, A., Magistretti, P. J., & Weber, B. (2011). In vivo evidence for lactate as a neuronal energy source. *Journal of Neuroscience*, 31(20), 7477-7485.
- Yang, L., Kono, T., Gilbertsen, A., Li, Y., Sun, B., Jacobson, B. A.,...Kratzke, R. A. (2025). GPR81 nuclear transportation is critical for cancer growth and progression in lung and other solid cancers. *World Journal of Clinical Oncology*, 16(8), 107208.
- Yang, X., Kow, L.-M., Funabashi, T., & Mobbs, C. V. (1999). Hypothalamic glucose sensor: similarities to and differences from pancreatic beta-cell mechanisms. *Diabetes*, 48(9), 1763-1772.
- Yoshimatsu, H., Nijima, A., Oomura, Y., Yamabe, K., & Katafuchi, T. (1984). Effects of hypothalamic lesion on pancreatic autonomic nerve activity in the rat. *Brain research*, 303(1), 147-152.