



ESCUELA DE DOCTORADO
INTERNACIONAL DE LA USC

María
Silveira Loureiro

Tesis doctoral

Papel de la señalización de los
astrocitos en la regulación del
comportamiento circadiano y el
equilibrio energético a través
de AMPK

Santiago de Compostela, 2023

Programa de doctorado en Endocrinología

TESIS DOCTORAL

**PAPEL DE LA SEÑALIZACIÓN DE
LOS ASTROCITOS EN LA
REGULACIÓN DEL
COMPORTAMIENTO
CIRCADIANO Y EL EQUILIBRIO
ENERGÉTICO A TRAVÉS DE AMPK**

María Silveira Loureiro

Director: Miguel Antonio López Pérez

Directora: Olga Barca Mayo

PROGRAMA DE DOCTORADO EN ENDOCRINOLOGÍA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

A mi familia

A David

No te rindas por favor no cedas,
aunque el frío queme,
aunque el miedo muerda,
aunque el sol se ponga y se calle el viento,
aún hay fuego en tu alma,
aún hay vida en tus sueños,
porque cada día es un comienzo,
porque esta es la hora y el mejor momento.

Mario Benedetti



DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERÉS
PAPEL DE LA SEÑALIZACIÓN DE LOS ASTROCITOS EN LA
REGULACIÓN DEL COMPORTAMIENTO CIRCADIANO Y EL
EQUILIBRIO ENERGÉTICO A TRAVÉS DE AMPK

D./Dña. María Silveira Loureiro

Declaro no tener ningún conflicto de interés en relación con la tesis doctoral. Para que así conste, firmo el presente documento:

En Santiago de Compostela, a 22 de diciembre de 2023.



Resumen

La homeostasis energética en mamíferos se alcanza a través de mecanismos que regulan el equilibrio entre la ingesta y el gasto de energía. Una característica fundamental de esta regulación homeostática es su naturaleza intrínsecamente rítmica, la cual está controlada por los ritmos circadianos. Éstos aseguran una distribución temporal adecuada entre las reacciones catabólicas y anabólicas, sincronizando el metabolismo con los ciclos de luz-oscuridad y alimentación-ayuno. Durante el período de ayuno, la activación de la proteína *AMP-activated protein kinase* (AMPK) en tejidos periféricos desencadena procesos catabólicos y modula la degradación rítmica de las proteínas del reloj biológico. No obstante, se desconoce el papel de la señalización central de AMPK en el control de la sincronización a la luz y al horario de alimentación.

Los astrocitos desempeñan un papel crucial como sensores en la detección de nutrientes y en la regulación de los ritmos circadianos. Sin embargo, hasta el momento, sigue siendo un misterio cómo su reloj biológico intrínseco logra detectar y responder a los patrones de alimentación y a las variaciones en la iluminación. En esta tesis, nos hemos propuesto investigar el papel de la señalización de AMPK en los astrocitos sobre el control de los patrones de comportamiento circadiano y la homeostasis energética en ratones.

Para ello, hemos generado ratones condicionales inducibles con delección de la subunidad reguladora AMPK γ 2 (*Prkag2*) en astrocitos, así como ratones con ablación específica de AMPK γ 2 en astrocitos del núcleo ventromedial del hipotálamo. Nuestros hallazgos revelan que la activación de AMPK en los astrocitos altera la sincronización de los ritmos circadianos a la luz y al patrón de alimentación, así como la homeostasis energética.

Este descubrimiento arroja luz sobre la compleja interacción entre los ritmos circadianos, la señalización de AMPK y la regulación de la energía en el organismo, brindando nuevos conocimientos sobre cómo se coordinan estos procesos para garantizar un equilibrio adecuado en la utilización de la energía.

Resumo

A homeostase enerxética en mamíferos alcánzase a través de mecanismos que regulan o equilibrio entre a inxesta e o gasto de enerxía. Unha característica fundamental desta regulación homeostática é a súa natureza intrínsecamente rítmica, a cal está controlada polos ritmos circadianos. Estes aseguran unha distribución temporal adecuada das reaccións catabólicas e anabólicas, sincronizando o metabolismo cos ciclos de luz-escuridade e alimentación-xaxún. Durante o período de xaxún, a activación da proteína *AMP-activated protein kinase* (AMPK) en tecidos periféricos desencadea procesos catabólicos e modula a degradación rítmica das proteínas do reloxo biolóxico. Con todo, descoñécese o papel da sinalización central de AMPK no control da sincronización á luz e ao horario de alimentación.

Os astrocitos desempeñan un papel crucial como sensores na detección de nutrientes e na regulación dos ritmos circadianos. Porén, ata o momento, continúa sendo un misterio como o seu reloxo biolóxico intrínseco logra detectar e responder aos patróns de alimentación e ás variacións na iluminación. Nesta tese, propuxémonos investigar o papel da sinalización de AMPK nos astrocitos sobre o control dos patróns de comportamento circadiano e a homeostase enerxética en ratos.

Con este fin, xeramos ratos condicionais inducibles con deleción da subunidade reguladora AMPK γ 2 (*Prkag2*) en astrocitos, así como ratos con ablación específica de AMPK γ 2 en astrocitos do núcleo ventromedial do hipotálamo. Os nosos descubrimentos revelan que a activación de AMPK nos astrocitos altera a sincronización dos ritmos circadianos á luz e ao patrón de alimentación, así como da homeostase enerxética.

Este descubrimento arroxa luz sobre a complexa interacción entre os ritmos circadianos, a sinalización de AMPK e a regulación da enerxía do organismo, brindando novos coñecementos sobre como se coordinan estes procesos para garantir un equilibrio adecuado na utilización da enerxía.

Abstract

Homeostasis in mammals is achieved through various complex mechanisms that control the balance between energy intake and energy expenditure. A key feature of homeostatic regulation is its intrinsic rhythmic nature, which is, in large part, controlled by circadian rhythms. The circadian system ensures a temporal partitioning of catabolic and anabolic reactions synchronizing metabolism to the light-dark cycle and to the feeding-fasting cycle. During fasting, AMP-activated protein kinase (AMPK) activation in peripheral tissues triggers catabolic processes and modulates clock-proteins rhythmic degradation. However, the role of central AMPK signaling in controlling circadian entrainment to light and feeding time is largely unknown.

Astrocytes play a crucial role as sensors in nutrient sensing and in the regulation of circadian rhythms. However, how the intrinsic astrocyte clock sense and respond to daily feeding and lighting by adjusting internal ~24 h rhythms to resonate with, and anticipate, external cycles of day and night is largely unexplored. In this thesis, we investigate the role of astrocytic AMPK signaling in the control of circadian behavior and energy homeostasis in mice.

Specifically, we have generated mice with global deletion of AMPK γ 2 regulatory subunit (*Prkag2*) in adult astrocytes, as well as mice with ventromedial hypothalamus targeted ablation of AMPK γ 2. We found that AMPK signaling in astrocytes disrupts light- and nutrient-dependent entrainment of hypothalamic clocks, as well as energy homeostasis.

This discovery sheds light on the complex interaction between circadian rhythms, AMPK signaling and energy regulation in the organism, providing new insights into how these processes are coordinated to ensure a proper balance in energy utilization.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	13
ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y ANGLICISMOS	19
INTRODUCCIÓN.....	25
1 HOMEOSTASIS ENERGÉTICA	27
1.1 Gasto energético y termogénesis	29
1.2 Hipotálamo y regulación de la homeostasis energética	33
1.2.1 Núcleo ventromedial.....	34
2 SISTEMA DE CRONOMETRAJE CIRCADIANO	35
2.1 Medidas de los ritmos circadianos	35
2.2 Organización del sistema circadiano	36
2.2.1 El núcleo supraquiasmático como marcapasos circadiano	37
2.1.2 Osciladores circadianos en los tejidos periféricos	37
2.3 El reloj circadiano molecular	39
2.4 Ritmos circadianos y metabolismo: las dos caras de la misma moneda.....	42
3 ASTROCITOS	47
3.1 Biología de los astrocitos en el sistema nervioso central.....	47
3.2 Morfología y organización de los astrocitos	47
3.3 Fisiología de los astrocitos.....	50
3.4 Funciones de los astrocitos en el control metabólico	51
3.4.1 Astrocitos como mediadores de las señales hormonales	53
3.4.2 Astrocitos como sensores de nutrientes	54
3.5 Funciones de los astrocitos en el sistema circadiano.....	55
3.5.1 Contribución de los genes reloj de los astrocitos al sistema circadiano	56
3.5.2 Otras funciones de los astrocitos en el sistema circadiano	59
4 AMPK COMO SENSOR ENERGÉTICO	61
4.1 Estructura de AMPK.....	61
4.2 Regulación de AMPK.....	62
4.3 AMPK hipotalámica y regulación de la ingesta	64
4.4 AMPK hipotalámica y homeostasis de la glucosa.....	65
4.5 AMPK hipotalámica y termogénesis	66
4.6 AMPK y ritmos circadianos	68
HIPÓTESIS	71
OBJETIVOS.....	75

MATERIAL Y MÉTODOS.....	79
5 MODELOS ANIMALES	81
5.1 Legislación	81
5.2 Modelos animales.....	82
6 ANESTESIA Y ANALGESIA	82
7 VÍAS DE ADMINISTRACIÓN DE SUSTANCIAS	83
7.1 Vía intraperitoneal (IP).....	83
7.2 Vía subcutánea (SC).....	83
7.3 Vía hipotalámica núcleo-específica.....	83
8 PROCEDIMIENTOS NO QUIRÚRGICOS	84
8.1 Generación de ratones knockout condicionales e inducibles GLAST-Cre AMPK γ 2 ^{flox/flox} 84	
8.2 Monitorización de la ingesta y la masa corporal.....	85
8.3 Medición de la temperatura corporal.....	85
8.4 Medición de la temperatura del BAT	85
8.5 Test de tolerancia a glucosa (GTT)	86
8.6 Test de tolerancia a insulina (ITT)	86
8.7 Test de tolerancia a piruvato (PTT).....	86
8.8 Monitorización del gasto energético, coeficiente respiratorio y actividad locomotora .	87
8.9 Determinación de la composición corporal.....	87
8.10 Estudio de la actividad locomotora circadiana.....	87
8.11 Experimentos de restricción de la ingesta	88
9 PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS	89
9.1 Esterotaxia núcleo-específica	89
9.2 Perfusión intracardiaca.....	90
9.3 Disección y extracción de tejidos.....	90
10 DISEÑOS EXPERIMENTALES	91
10.1 Generación de ratones knockout para AMPK γ 2 en los astrocitos glast-positivos y su fenotipado metabólico y circadiano	91
10.2 Inoculación de Adenovirus Asociados Cre en ratones AMPK γ 2 FLOX en VMH.....	92
11 TÉCNICAS ANALÍTICAS	94
11.1 Análisis de proteínas por Western Blot.....	94
11.1.1. Extracción de proteína.....	94
11.1.2. Cuantificación de proteína.....	95

11.1.3. Preparación de las muestras	96
11.1.4 Western Blot	97
11.1.4.1 <i>Preparación de geles</i>	97
11.1.4.2 <i>Electroforesis</i>	98
11.2 PCR para genotipado	102
11.2.1 Extracción de ADN	102
11.2.2 Amplificación por PCR convencional	102
11.2.3 Electroforesis de agarosa	104
11.3 Doble inmunofluorescencia	104
11.4 Determinaciones séricas.....	106
11.5 Análisis histológico de los tejidos	106
11.5.1 Inmunohistoquímica	106
11.5.2 Adquisición y análisis de imágenes	107
11.6 Estadística	107
RESULTADOS	109
1 La delección de AMPK γ 2 en astrocitos GLAST-positivos activa constitutivamente AMPK 111	
2 La eliminación de AMPK γ 2 en astrocitos altera la homeostasis energética en machos y hembras	113
3 La eliminación de AMPK γ 2 en los astrocitos GLAST no afecta a la homeostasis de la glucosa	121
4 La eliminación de AMPK γ 2 en los astrocitos GLAST aumenta el período y altera la sincronización del SCN	125
5 La eliminación de AMPK γ 2 en los astrocitos GLAST altera la anticipación a la comida en los machos.....	130
6 La eliminación de AMPK γ 2 en el VMH disminuye el peso corporal y aumenta el gasto energético.....	136
DISCUSIÓN.....	149
CONCLUSIONES.....	155
BIBLIOGRAFÍA.....	159
ANEXOS.....	201
AGRADECIMIENTOS.....	209

ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y ANGLICISMOS

ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y ANGLICISMOS

AAV: adenovirus asociados, *adeno-associated virus*.

AMPc: adenosín monofosfato cíclico.

AMPK: proteína quinasa activada por AMP, *AMP-activated protein kinase*.

ANGPTL4: proteína similar a la angiopoyetina 4, *angiopoietin-related protein 4*.

ANOVA: análisis de varianza, *analysis of variance*.

AP: antero-posterior.

ARC: núcleo arcuato, *arcuate nucleus*.

ATGL: lipasa adipocítica de triglicéridos, *adipose triglyceride lipase*.

AUC: área bajo la curva, *area under the curve*.

AVP: arginina-vasopresina, *arginine vasopressin*.

B3-AR: receptores β 3-adrenérgicos, *β 3-adrenergic receptors*.

BAT: tejido adiposo pardo, *brown adipose tissue*.

BHE: barrera hematoencefálica, *brain blood barrier*.

BMP8B: proteína morfogenética ósea 8B, *bone morphogenetic protein 8B*.

BMR: tasa metabólica basal, *basal metabolic rate*.

BSA: albumina de suero bovino, *albumin from bovine serum*.

CBM: módulo de unión a carbohidratos, *carbohydrate-binding module*.

CBS : dominios de la cistationina β -sintasa, *cystathione β -synthase domains*.

CCGs: genes controlados por el reloj, *clock-controlled genes*.

CIDEA: complejo con el efector A inductor de muerte celular por fragmentación de DNA, *cell death-inducing DNA fragmentation factor- α -like effector A*.

CKIe: caseína quinasa Ie, *casein kinases Ie*.

CKK: colecistoquinina, *cholescistokinin*.

CNTF: factor neurotrófico ciliar, *ciliary neurotrophic factor*.

CPT1A: carnitina palmitoiltransferasa 1A, *carnitine palmitoyltransferase 1A*.

CRY: criptocromo, *cryptochrome*.

DBP: proteína de unión al promotor del sitio D de la albúmina, *D-box binding PAR bZIP transcription factor*.

DMH: núcleo dorsomedial del hipotálamo, *dorsomedial nucleus of the hypothalamus*.

DV: dorso-ventral.

EE: gasto energético, *energy expenditure*.

FAA: actividad anticipatoria a la comida, *food anticipatory activity*.

FAD: flavina adenina dinucleótido, *flavin adenine dinucleotide*.

FAS: ácido graso sintasa, *fatty acid synthase*.

FEO: oscilador de sincronización con los alimentos, *food entrainable oscillator*.

GCs: glucocorticoides.

GFAP: proteína gliofibrilar acídica, *glial fibrillary acidic protein*.

GLAST: transportador de glutamato de alta afinidad, *glial high affinity glutamate transporter*.

GLP-1: péptido análogo de glucagón 1, *glucagon-like peptide 1*.

GRP: péptido liberador de gastrina, *gastrin-releasing peptide*.

GTT: test de tolerancia a glucosa, *glucose tolerance test*.

gWAT: tejido adiposo gonadal, *gonadal white adipose tissue*.

HFD: dieta alta en grasas, *high fat diet*.

HSL: lipasa sensible a hormona, *hormone sensitive lipase*.

IGF-1: factor de crecimiento similar a la insulina, *insulin-like growth factor-1*.

IGL: fascículo intergeniculado, *intergeniculate leaflet*.

IP3: inositol trifosfato, *inositol triphosphate*.

IP: intraperitoneal.

ITT: test de tolerancia a insulina, *insulin tolerance test*.

KSR2: quinasa supresora de Ras, *kinase suppressor of Ras*.

LA: actividad locomotora, *locomotor activity*.

LD: ciclos de luz-oscuridad 12:12 horas, *light-dark*.

LHA: área lateral hipotalámica, *lateral hypothalamic area*.

LPL: lipoproteína lipasa, *lipoprotein lipase*.

MCH: hormona concentradora de melanina, *melanin concentrating-hormone*.

MCT: transportadores de monocarboxilato, *monocarboxylate transporter*.

MGL: monoacilglicerol lipasa, *monoacylglycerol lipase*.

NA: noradrenalina, *noradrenaline*.

NAD: nicotinamida adenina dinucleótido, *nicotinamide adenine dinucleotide*.

NAM: nicotinamida, *nicotinamide*.

NAMPT: nicotinamida fosforil-transferasa, *nicotinamide phosphoribosyltransferase*.

NGS: suero de cabra; *normal goat serum*.

NMDA: N-metil-D-aspartato, *N-methyl-D-aspartate*.

NMR: resonancia magnética nuclear, *nuclear magnetic resonance*.

O-GlcNAc: O-GlucosilNAcetilación.

OPCs: células progenitoras de oligodendrocitos, *oligodendrocyte progenitor cells*.

OX: orexina, *orexin*.

p38 MAPK: proteína quinasa activada por mitógeno p38, *p38-mitogen-activated protein kinase*.

PARP: poli ADP-ribosa polimerasa 1, *poly ADP-ribose polymerase*.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa, *polymerase chain reaction*.

PDF: factor de dispersión pigmentaria, *pigment dispersing factor*.

PER: *period*.

PKA: proteína quinasa A, *protein kinase A*.

PTT: test de tolerancia a piruvato, *pyruvate tolerance test*.

PVH: núcleo paraventricular, *paraventricular nucleus*.

PYY: péptido YY3-36, *peptide YY (PYY)3-36*.

RF: alimentación restringida, *restricted feeding*.

RQ: cociente respiratorio, *respiratory quotient*.

SC: subcutáneo.

SCN: núcleo supraquiasmático, *suprachiasmatic nucleus*.

SDS: dodecilsulfato sódico, *sodium dodecyl sulfate*.

SDS-PAGE: gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico.

SEM: desviación estándar de la media, *standard error of the mean*.

SIRT1: sirtuina 1 desacetilasa dependiente de NAD, *NAD-dependent deacetylase sirtuin-1*.

SNC: sistema nervioso central.

SNS: sistema nervioso simpático.

STD: dieta estándar, *standard diet*.

STZ: estreptozotocina, *streptozotocin*.

sWAT: tejido adiposo blanco subcutáneo, *subcutaneous white adipose tissue*.

T3: triyodotironina, *triiodothyronine*.

TAK1: factor de crecimiento transformante β , *transforming growth factor- β -activated kinase 1*.

THs: hormonas tiroideas, *thyroid hormones*.

TNF α : factor de necrosis tumoral α , *tumor necrosis factor*.

TRF: restricción alimentaria temporal, *time-restricted feeding*.

TTFL: bucle de retroalimentación transcripción-traducción, *transcriptional–translational feedback loops*.

UCP1: proteína desacoplante 1, *uncoupling protein 1*.

VIP: polipéptido intestinal vasoactivo, *vasoactive intestinal polypeptide*.

VMH: núcleo ventromedial, *ventromedial nucleus*.

vWAT: tejido adiposo blanco visceral, *visceral white adipose tissue*.

WAT: tejido adiposo blanco, *white adipose tissue*.

ZFH3: caja homeótica 3 de unión a la E-box con dedos de zinc, *zinc finger homeobox 3*.

ZT: *zeitgeber*.

ANGLICISMOS

Antigen retrieval: desenmascaramiento de antígenos.

Browning: pardeamiento del tejido adiposo.

Downstream: “aguas abajo” (referido a una vía de señalización).

Jet lag: desfase horario o síndrome de cambio de zona horaria.

Knockout: modificación genética en la cual se inactiva la expresión de un gen.

Outputs: salidas.

Upstream: “aguas arriba” (referido a una vía de señalización).

Wildtype: tipo salvaje.

INTRODUCCIÓN

1 HOMEOSTASIS ENERGÉTICA

La primera ley de la termodinámica – que establece que la energía no puede crearse ni destruirse – es un principio que también se aplica a los seres vivos, ya que necesitan controlar la energía para su supervivencia. Para garantizar esta regulación, conocida como homeostasis energética, se requiere un equilibrio entre las vías metabólicas que producen y consumen energía, debido a las oscilaciones en la disponibilidad y la demanda de la misma. La regulación de la homeostasis energética ocurre mediante el control del aporte de energía (ingesta alimentaria) y del gasto energético (Friedman, 2009). Mientras que la ingesta de energía proviene de las calorías asociadas a las proteínas, carbohidratos y grasas de los alimentos, el gasto energético se refiere a la tasa metabólica basal, a la termogénesis y a la actividad física. En consecuencia, las células han desarrollado sensores moleculares que permiten ajustar la actividad metabólica según la accesibilidad y las necesidades energéticas del organismo (López et al., 2016).

La masa corporal está directamente vinculada a la homeostasis energética, y las alteraciones en la ingesta o el gasto energético resultan en cambios en el peso corporal. Cuando la ingesta es igual al gasto energético, es decir, el balance energético está en equilibrio, el peso se mantiene estable. Sin embargo, este equilibrio no siempre permanece constante debido a diferentes factores, tanto extrínsecos (estilo de vida y ambiente) como intrínsecos (genética, sexo y edad) (Friedman, 2009; Kopelman, 2000). Así, si el balance energético es negativo, es decir, las calorías ingeridas son menores que las consumidas, se produce una pérdida de peso. En cambio, si el balance energético es positivo, es decir, si se ingieren más calorías de las que se consumen, esto conduce a un aumento de peso que puede resultar en sobrepeso u obesidad (Hill et al., 2012) (Figura 1).

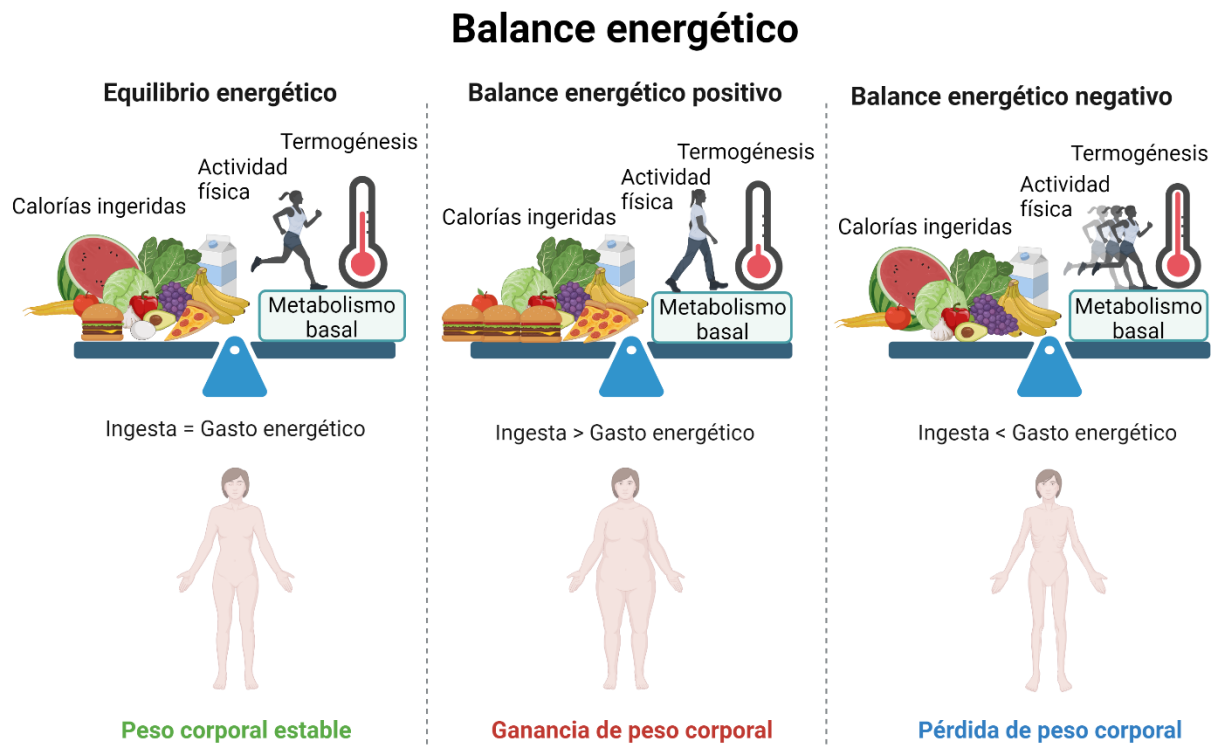


Figura 1. Componentes del balance energético y su impacto en la masa corporal. La masa corporal depende de la homeostasis energética. Cuando la ingesta se iguala al gasto energético, es decir, el balance energético está en equilibrio, el peso se mantiene constante. Las alteraciones en la ingesta o en el gasto energético dan lugar a cambios en el peso corporal. Un balance energético positivo, donde las calorías ingeridas superan a las consumidas, conduce a un aumento de peso, potencialmente dando lugar a sobrepeso u obesidad. Por el contrario, un balance energético negativo, donde las calorías ingeridas son menores que las consumidas, resulta en una pérdida de peso. Creado con Biorender.com.

La regulación de la homeostasis energética se lleva a cabo mediante un sistema fisiológico altamente complejo que involucra señales aferentes y eferentes que impactan en la ingesta y el gasto energético (Hill et al., 2012). El sistema nervioso central (SNC) recibe e integra dichas señales del estado energético de la periferia y, en respuesta, ajusta la ingesta y el gasto energético (Kampe et al., 2010; Seoane-Collazo et al., 2020). Uno de los centros neurales cruciales en el equilibrio energético es el hipotálamo, que integra señales periféricas hormonales y neuronales relacionadas con la saciedad y el estado nutricional. Además, éste regula la absorción y utilización de nutrientes, así como la homeostasis de la glucosa y el metabolismo lipídico periférico (Diéguez et al., 2009; González-García et al., 2017; Spiegelman & Flier, 2001; Williams, 2000) (Figura 2). Además del hipotálamo, existen otras zonas del cerebro como la corteza cerebral, las áreas olfativas y algunas áreas del tronco encefálico implicadas en el control del apetito y el equilibrio energético (Dietrich & Horvath, 2009; López et al., 2023; Spiegelman & Flier, 2001). En respuesta a la ingesta de alimentos, surgen señales de saciedad a nivel gastrointestinal, como la colecistoquinina (CKK,

INTRODUCCIÓN

cholecistokinina), el péptido YY3-36 (PYY, *Peptide YY (PYY)3-36*) o el péptido análogo de glucagón 1 (GLP-1, *glucagon-like peptide 1*) (Murphy & Bloom, 2006). Además, otras señales periféricas originadas en el estómago como la grelina (un péptido orexigénico) (Al Massadi et al., 2019; Nogueiras et al., 2010), en el tejido adiposo, como la leptina (una hormona anorexigénica) (Friedman, 2019) o la insulina segregada por las células beta del páncreas (Saltiel & Kahn, 2001), atraviesan la barrera hematoencefálica (BHE) para llegar al cerebro (Figura 2).

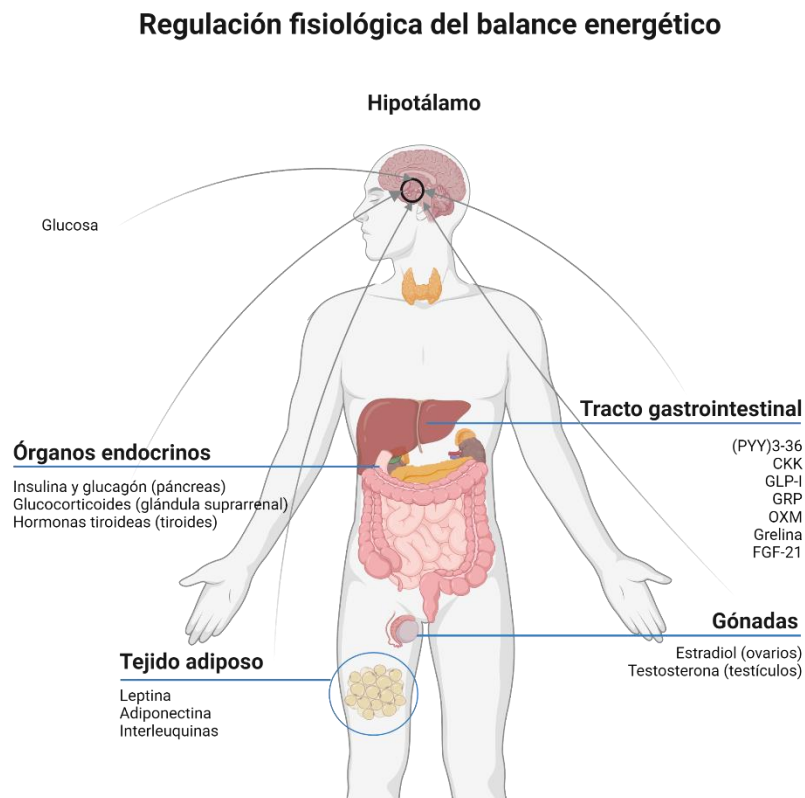


Figura 2. Integración a nivel central de hormonas derivadas del tracto gastrointestinal, el tejido adiposo, órganos endocrinos y gónadas. Creado con Biorender.com.

1.1 GASTO ENERGÉTICO Y TERMOGÉNESIS

El gasto energético (EE, *energy expenditure*) engloba tres factores:

- a) La tasa metabólica basal (BMR, *basal metabolic rate*), que hace referencia a la energía necesaria para mantener la homeotermia y el metabolismo celular.
- b) La actividad física, que incluye la actividad tanto intencionada como no intencionada, incluida la postura bípeda erguida.

- c) La termogénesis, que se refiere a la producción de calor no relacionada con la actividad física (Landsberg et al., 2009).

En individuos sedentarios, la BMR representa el 80% del gasto de energía, la actividad física constituye el 10%, mientras que el restante 10% se atribuye a la termogénesis. Sin embargo, en personas activas, la actividad física y la termogénesis pueden contribuir en más del 40% del gasto total de energía, lo que significa que la BMR solo constituiría en torno a un 60% del gasto energético total (Doucet et al., 2003; Landsberg et al., 2009).

La termogénesis es un proceso fundamental para los organismos homeotermos ya que les permite mantener una temperatura corporal estable. Se distinguen dos tipos de termogénesis: la termogénesis obligatoria y la termogénesis adaptativa. La termogénesis obligatoria es fundamental para mantener la temperatura en reposo en condiciones de termoneutralidad. Está relacionada con las reacciones del metabolismo energético y la regulación del efecto térmico de los alimentos (Himms-Hagen, 1989). Sin embargo, la termogénesis adaptativa se refiere a la generación de calor por el organismo en respuesta a estímulos externos como una dieta hipercalórica o la exposición al frío. Esto implica la disipación de energía en forma de calor mediante el temblor del músculo esquelético o la activación del tejido adiposo pardo (BAT, *brown adipose tissue*) (Chouchani et al., 2019). El BAT representa una variante especial del tejido adiposo. En roedores, se distribuye en áreas interescapulares, subescapulares, axilares, perirrenales y periaórticas (Cannon & Nedergaard, 2004). En seres humanos adultos, se encuentra en regiones como la subescapular, cervical, periespinal, mediastínica, periaórtica, pericárdica y perirrenal (Contreras et al., 2016; Nedergaard et al., 2007). El BAT está compuesto por adipocitos marrones, que presentan características anatómicas y funcionales diferentes a los adipocitos blancos del tejido adiposo blanco (WAT, *white adipose tissue*). A diferencia de los adipocitos blancos, que funcionan como depósitos de grasa con escasas mitocondrias y una sola gran gota lipídica para el almacenamiento de energía (Contreras et al., 2015; Contreras et al., 2017), los adipocitos marrones presentan una forma poligonal, múltiples gotas lipídicas y numerosas mitocondrias que generan energía. Estas mitocondrias contienen citocromos pigmentados con hierro, lo cual otorga su característico tono marrón al BAT y son esenciales para la producción de calor (Cannon & Nedergaard, 2004; Contreras et al., 2016).

La termogénesis adaptativa tiene lugar principalmente en los adipocitos marrones, que liberan energía en forma de calor para mantener la temperatura corporal (Contreras et al., 2016). Esta función se logra gracias a la presencia de una proteína llamada proteína desacoplante 1 (UCP1, *uncoupling protein 1*), también denominada termogenina, en las mitocondrias (Kozak et al., 1988; Nicholls et al., 1978). UCP1 facilita el flujo de protones a través de la membrana mitocondrial interna, interrumpiendo la síntesis de ATP y disipando en su lugar el exceso de energía en forma de calor (Cannon & Nedergaard, 2004; Contreras et al., 2016; Villarroya & Vidal-Puig, 2013). En los últimos años se ha descrito un nuevo tipo de adipocitos, denominados adipocitos beige o *brite* (*brown in white*) (Cannon & Nedergaard, 2004; Contreras et al., 2015). Estos se generan en depósitos de WAT, presentando características anatómicas y funcionales intermedias entre los adipocitos blancos y los marrones (González-García et al., 2019; Jespersen et al., 2013) (Figura 3). El proceso en que

INTRODUCCIÓN

los adipocitos beige emergen en los depósitos de WAT se conoce como *browning* o pardeamiento, permitiéndoles desarrollar capacidad termogénica (Contreras et al., 2016; González-García et al., 2019), aunque su poder termogénico es mucho menor que el de los adipocitos marrones (Petrovic et al., 2009; Shabalina et al., 2013). Varios factores fundamentales son necesarios para inducir el fenómeno de *browning*. Entre ellos, los más destacados son la expresión del receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas (PPAR γ , *peroxisome proliferator-activated receptor γ*), el dominio PR que contiene 16 (PRDM16, *PR domain containing 16*), la proteína 1 alfa coactivadora del receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas (PGC1 α , *proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha*) y la proteína de interacción con receptores 140 (RIP140, *receptor-interacting protein 140*) (Contreras et al., 2015). Estos factores, en conjunto con UCP1, se utilizan como marcadores de termogénesis tanto del *browning* del WAT como del BAT (Contreras et al., 2015).

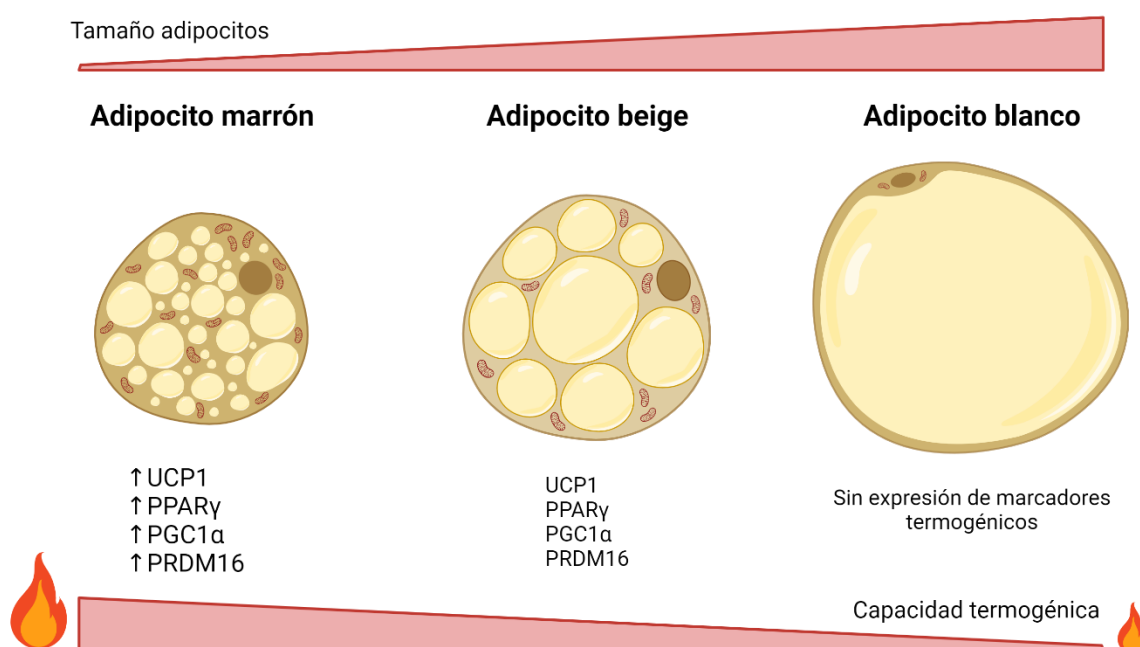


Figura 3. Representación gráfica del proceso de *browning*. Los adipocitos blancos se transforman en adipocitos beige adquiriendo en este proceso las características intermedias entre los primeros y los adipocitos marrones (Contreras et al., 2016). Creado con Biorender.com.

La termogénesis en el BAT está regulada por el sistema nervioso simpático (SNS) (Cannon & Nedergaard, 2004; Contreras et al., 2015, 2016; Villarroya & Vidal-Puig, 2013). Un incremento en el tono simpático del BAT provoca la liberación de noradrenalina (NA, *noradrenaline*), la cual activa los receptores β -adrenérgicos (β 3-AR, *β 3-adrenergic receptors*). Estos receptores, a su vez, están acoplados a proteínas G que activan la adenilato ciclasa (AC, *adenylate ciclase*), elevando así los niveles de adenosín monofosfato cíclico (AMPc, *cyclic adenosine monophosphate*), lo que finalmente activa la proteína quinasa A

(PKA, *protein kinase A*). La PKA tiene dos efectos principales. Primero, estimula la proteína quinasa activada por mitógeno p38 (p38 MAPK, *p38-mitogen-activated protein kinase*), que induce la transcripción génica, la síntesis de proteínas y el crecimiento y la diferenciación celular. Segundo, incrementa la actividad de las enzimas lipolíticas, incluyendo la lipasa adipocítica de triglicéridos (ATGL, *adipose triglyceride lipase*), la lipasa sensible a hormona (HSL, *hormone sensitive lipase*) y la monoacilglicerol lipasa (MGL, *monoacylglycerol lipase*), las cuales hidrolizan los triglicéridos y aumentan los niveles citosólicos de ácidos grasos libres (Cannon & Nedergaard, 2004; Contreras et al., 2016; González-García et al., 2019). Estos ácidos grasos libres son transportados al interior de las mitocondrias por la carnitina palmitoiltransferasa 1A (CPT1A, *carnitine palmitoyltransferase 1A*) y allí son oxidados para producir nicotinamida adenina dinucleótido (NAD, *nicotinamide adenine dinucleotide*) y flavín adenín dinucleótido (FAD, *flavín adenine dinucleotide*), los cuales continúan siendo oxidados en la cadena de transporte electrónico. Esta oxidación establece un gradiente de protones que UCP1 desacopla, generando calor (Cannon & Nedergaard, 2004; Contreras et al., 2015, 2016; Villarroya & Vidal-Puig, 2013) (Figura 4).

Además de su función termogénica, se ha confirmado que la actividad del BAT responde a los niveles de glucosa y está bajo el control de los ritmos circadianos, tanto en humanos (Lee et al., 2016), como en ratones (Orozco-Solis et al., 2016). Específicamente, este estudio ha revelado que, en ratones, la actividad del BAT está controlada por un marcapasos autónomo en el núcleo ventromedial del hipotálamo (VMH, *ventromedial hypothalamic nucleus*) (Orozco-Solis et al., 2016).

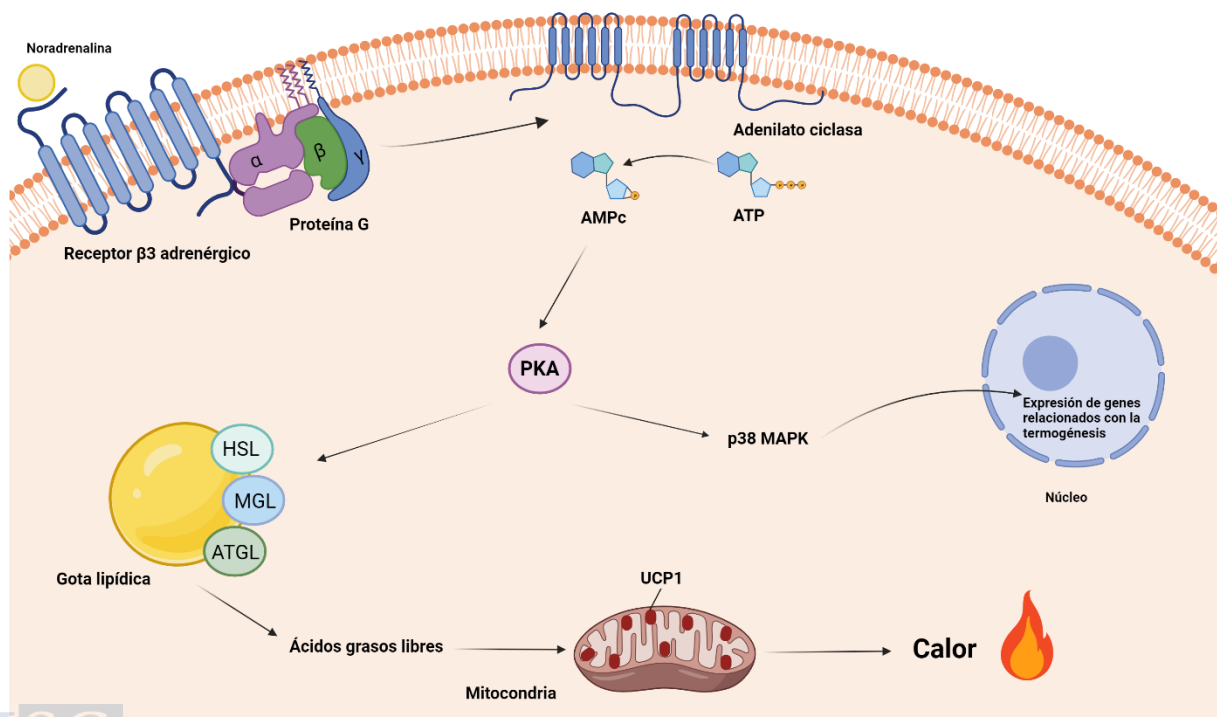


Figura 4. Mecanismo de regulación de la termogénesis en el BAT. Creado con Biorender.com.

1.2 HIPOTÁLAMO Y REGULACIÓN DE LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA

El control de la homeostasis energética se produce en el SNC, y el hipotálamo emerge como una región esencial en este proceso (Williams et al., 2001). Situado bajo el tálamo, el hipotálamo integra señales sensoriales y nutricionales en el SNC, activando respuestas autonómicas, endocrinas y conductuales para mantener la homeostasis (Saper & Lowell, 2014). El hipotálamo, dividido por el tercer ventrículo, se organiza en tres zonas principales. La región rostral, conocida como área preóptica, controla la termorregulación, el equilibrio electrolítico, los ritmos circadianos incluyendo los ciclos de vigilia y sueño y el comportamiento sexual. El área media o tuberal integra circuitos para la termorregulación y la ingesta, así como circuitos de respuesta para el comportamiento sexual, la agresividad y diversas respuestas autónomas y endocrinas. Por último, la región posterior regula la vigilia y las respuestas al estrés (Saper & Lowell, 2014) (Figura 5).

Los núcleos hipotalámicos, agrupaciones de neuronas definidas anatómicamente, interactúan a través de proyecciones axonales. Estos núcleos regulan la expresión de distintos neurotransmisores específicos en respuesta a señales periféricas (López et al., 2007; Saper & Lowell, 2014). Algunos núcleos clave en la regulación de la homeostasis energética incluyen el núcleo arcuato (ARC, *arcuate nucleus*), el núcleo paraventricular (PVH, *paraventricular nucleus*), el núcleo dorsomedial (DMH *dorsomedial hypothalamic nucleus*), el área lateral hipotalámica (LHA, *lateral hypothalamic area*) y el VMH (Figura 5).

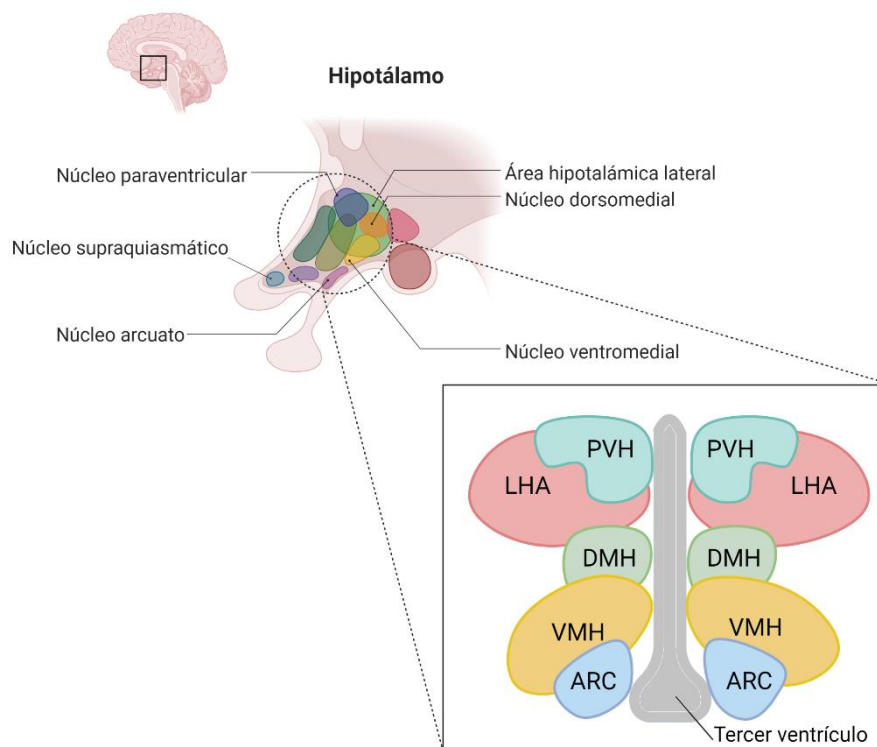


Figura 5. Representación de los núcleos del hipotálamo más relevantes en la regulación de la homeostasis energética. Creado con Biorender.com.

1.2.1 NÚCLEO VENTROMEDIAL

El VMH desempeña un papel crucial en la regulación de la homeostasis energética. Situado en la base del hipotálamo y por encima del ARC (McClellan et al., 2006), el VMH ha sido objeto de numerosos estudios que han demostrado su influencia en el control del peso corporal. Lesiones en esta región provocaron un fenotipo obeso en modelos animales (Hetherington & Ranson, 1983; Shimizu et al., 1987). Además, el VMH tiene un papel fundamental en la regulación de la homeostasis de la glucosa al expresar receptores de leptina e insulina (Elmqvist et al., 1998; Paranjape et al., 2011; Song et al., 2001; Wada et al., 2014) y en la modulación del gasto energético a través de la termogénesis del BAT (Contreras et al., 2015). El VMH también está involucrado en funciones fisiológicas adicionales, como el comportamiento sexual femenino y la regulación cardiovascular (McClellan et al., 2006; Shimogawa et al., 2014).

En el VMH se identifican distintos tipos de neuronas con funciones específicas que interactúan con el SNS. Por ejemplo, las neuronas que expresan el factor esteroideogénico 1 (SF1, *steroidogenic factor 1*) desempeñan funciones en el desarrollo del VMH, así como en la regulación del balance energético y la termogénesis (Davis et al., 2004; Kurrasch et al., 2007; Majdic et al., 2002). El VMH es un regulador clave de la termogénesis, actuando a través del SNS para estimular la termogénesis en el tejido adiposo marrón y promover el *browning* en el tejido adiposo blanco (Contreras et al., 2015, 2016). Diversas señales periféricas modulan la termogénesis del tejido adiposo marrón a través del VMH, incluyendo hormonas tiroideas, la proteína morfogenética ósea 8B (BMP8B, *bone morphogenetic protein 8B*), la leptina, el estradiol, los análogos de GLP-1, la nicotina y las ceramidas (Álvarez-Crespo et al., 2016; Capelli et al., 2021; López et al., 2010; Martínez-Sánchez et al., 2017; Rial-Pensado et al., 2022; Martins et al., 2016; Tanida et al., 2013; González-García et al., 2017, 2018; Martínez De Morentin et al., 2014; Seoane-Collazo et al., 2021; Beiroa et al., 2014; Martínez De Morentin et al., 2012; Seoane-Collazo et al., 2014; Contreras et al., 2014; Contreras et al., 2017).

Finalmente, se ha observado una estrecha interacción entre la homeostasis energética, la termogénesis y los relojes circadianos (Barca-Mayo & López, 2021; Orozco-Solis et al., 2016). El VMH, en particular, está implicado en la regulación circadiana del gasto energético y la termogénesis. La interrupción del reloj circadiano en el VMH altera la actividad circadiana del tejido adiposo marrón, contribuyendo así al control del equilibrio energético (Orozco-Solis et al., 2016).

2 SISTEMA DE CRONOMETRAJE CIRCADIANO

La rotación de la Tierra ha dado origen a la evolución de relojes biológicos, los cuales permiten que los seres vivos se adapten y se anticipen a los ciclos de luz y oscuridad (Albrecht & Ripperger, 2018; Barca-Mayo & López, 2021). Estos relojes biológicos están presentes en todo tipo de organismos, desde hongos unicelulares y bacterias hasta seres pluricelulares, incluyendo a los seres humanos (Koronowski & Sassone-Corsi, 2021; Rosbash, 2009). Este sistema circadiano, cuyo término proviene del latín “circa” (alrededor) y “diem” (día), regula y sincroniza ritmos de 24 horas en la expresión génica y en procesos fisiológicos o conductuales, como los ciclos de sueño-vigilia, el equilibrio energético o la consolidación de la memoria (Hastings et al., 2008). Estudios experimentales y epidemiológicos han demostrado los significativos impactos que resultan de la alteración de estos ritmos biológicos. Factores como el trabajo por turnos o alteraciones genéticas de los denominados “genes del reloj” han sido asociados con una mayor prevalencia de obesidad, diabetes y envejecimiento prematuro (Gao et al., 2020; Hansen et al., 2016; Hemmer et al., 2021; Lee et al., 2021; Li et al., 2019; Lim et al., 2018; Liu et al., 2018; Pan et al., 2011; Panda et al., 2016; Sancar & Van Gelder, 2021; Sun et al., 2018; Turek et al., 2005; Yu & Weaver, 2011).

2.1 MEDIDAS DE LOS RITMOS CIRCADIANOS

Para comprender plenamente los ritmos biológicos, necesitamos familiarizarnos con algunos conceptos clave:

Período, Frecuencia y Fase: El “**período**” (τ) es el tiempo que tarda en completarse un ciclo, medido en unidades como segundos, horas o días. Por otro lado, la “**frecuencia**” es la inversa del período ($1/\tau$). La “**fase**” (**f**) indica el valor de una variable en un punto específico del ciclo, medido en tiempos o grados. En la fase, destacamos la “**acrofase**”, cuando la variable alcanza su punto máximo, y el “**nadir**” o “**batifase**”, el momento de su mínimo valor. El “**mesor**” es el valor medio obtenido al promediar los valores de una variable durante un ciclo, y la “**amplitud**” es la diferencia entre el mesor y los valores máximo o mínimo de la variable.

Sincronización y Ritmos: Los ritmos son cambios en cualquier variable, y son previsibles y periódicos. Hablamos de “**estar en fase**” cuando dos ritmos sincronizan sus variables en el tiempo, y “**fuera de fase**” cuando sus puntos máximos ocurren en momentos distintos (Mistlberger & Rusak, 2011; Olavarrieta Bernardino, 2016). La sincronización de los diferentes cambios en los ritmos internos se denomina “**sincronización interna**”. En condiciones normales, los ritmos circadianos están sincronizados por factores periódicos del entorno, denominados zeitgebers (Aschoff y Pohl, 1978). El más importante, es el ciclo de luz-oscuridad. Hablamos de “**sincronización externa**” cuando los ritmos biológicos se

sincronizan o coordinan con factores geofísicos como los ciclos externos de luz y oscuridad. No obstante, debemos tener en cuenta que la actividad física o las interacciones sociales (denominados “**sincronizadores secundarios**”) también intervienen en este proceso (Grandin, Alloy y Abramson, 2006).

Ritmos Biológicos y Adaptación: Los “**ritmos biológicos**” son fenómenos cíclicos en los seres vivos, variando regularmente en función de una actividad biológica en un período (Cardinal, 2005). Es importante resaltar que no son meras coincidencias ni respuestas pasivas al entorno, sino procesos de adaptación a éste (Vargas-Vargas & Camargo-Sánchez, 2014).

Clasificación de los Ritmos: Según su frecuencia, los ritmos biológicos se dividen en tres grupos. Los “**ritmos infradianos**” tienen un período superior a 28 horas. Los “**ritmos circadianos**”, con un período cerca de las 24 horas, son especialmente importantes. Finalmente, los “**ritmos ultradianos**” tienen un período menor a 20 horas.

Influencia del entorno: Es fundamental considerar el entorno al analizar los períodos de los ritmos. Por ejemplo, los organismos en hábitats de mareas desarrollan ritmos mareales con períodos de doce horas. También existen otros ritmos, como los “**circanuales**”, con períodos cercanos a un año, y los “**circalunares**”, relacionados con ciclos lunares de 28 días.

2.2 ORGANIZACIÓN DEL SISTEMA CIRCADIANO

En mamíferos el sistema circadiano está organizado en una jerarquía de osciladores. A **nivel del organismo**, los ritmos son generados por un reloj central en el núcleo supraquiasmático (SCN, *suprachiasmatic nucleus*) del hipotálamo, y por los relojes periféricos en los diferentes tejidos (Moore & Eichler, 1972; Stephan & Zucker, 1972). En ausencia de señales temporales externas, estos relojes funcionan intrínsecamente con un período cercano a las 24 horas. Para ajustar las discrepancias entre este período intrínseco y los ciclos ambientales, estos relojes se sincronizan diariamente con factores externos naturales (zeitgeber, ZT). La luz es el ZT del SCN y sincroniza el marcapasos central a la hora local, que a su vez transmite información temporal a otros relojes cerebrales y periféricos mediante ritmos neuronales, hormonales o conductuales, como los ciclos de alimentación-ayuno o sueño-vigilia, que actúan como señales de sincronización para los relojes fuera del SCN (Crosby et al., 2019; Pezük et al., 2012) (Figura 6). Por otro lado, a **nivel celular**, las neuronas y los astrocitos del SCN son las células instructoras que coordinan los ritmos circadianos de todo el organismo (Barca-Mayo et al., 2017; Brancaccio et al., 2017, 2019; Tso et al., 2017). Por último, a **nivel molecular**, el reloj consiste en un circuito de retroalimentación negativa que regula la transcripción rítmica de los genes del reloj. Del 7% al 12% del transcriptoma presenta ritmos de expresión circadiana al estar controlados por este reloj molecular. Estos genes diana tienen funciones muy diversas en el control de la proliferación, metabolismo celular, regulación del estado redox, etc. De esta forma, los genes reloj controlan las funciones celulares circadianas en todos los seres vivos (Reppert & Weaver, 2002; Schibler & Sassone-Corsi, 2002).

2.2.1 EL NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO COMO MARCAPASOS CIRCADIANO

El SCN es un componente clave en el sistema circadiano, del que forma parte junto con los fotorreceptores, las vías de entrada que reciben y transmiten señales de luz y las vías de salida (Arendt et al., 1995; Moore et al., 1991). Ubicado bilateralmente en la región anterior del hipotálamo, encima del quiasma óptico, el SCN recibe información a través de la retina (Hastings et al., 2018). Se divide en dos subgrupos funcionales: ventrolateral y dorsal. El ventrolateral recibe *inputs* directos de las células ganglionares retinianas fotosensibles que expresan melanopsina (ipRGC) (Rollag et al., 2003), mientras que el dorsal regula la señalización GABAérgica hacia las neuronas que expresan arginina-vasopresina (AVP) (Mazuski et al., 2018; Mieda et al., 2015). La estimulación por la luz aumenta la activación de las células del SCN que expresan el polipéptido intestinal vasoactivo (VIP) y la liberación de VIP (Jones et al., 2018; Mazuski et al., 2018) induciendo cambios de fase en el tiempo circadiano (Figura 6). Aunque se ha avanzado en la comprensión de la neuroanatomía del SCN, los mecanismos de sincronización a la luz y la transmisión de señales temporales a otras áreas cerebrales o a los relojes periféricos aún no se comprenden completamente.

El SCN en ratones está compuesto por aproximadamente 10,000 neuronas a cada lado del tercer ventrículo, la mayoría de las cuales son GABAérgicas (Hastings et al., 2018; Ono et al., 2021). Además del GABA, en el SCN se expresan numerosos neuropéptidos (Abrahamson & Moore, 2001; Lee et al., 2015; Wen et al., 2020). Por ejemplo, el núcleo dorsal del SCN contiene neuronas que expresan principalmente AVP, encefalina y angiotensina II, mientras que el núcleo ventral del SCN contiene neuronas que expresan principalmente VIP, péptido liberador de gastrina (GRP, *gastrin-releasing peptide*), neurotensina y calretinina (Abrahamson & Moore, 2001). Además, la neuromedina-S se expresa ampliamente en todo el SCN. Estos neuropéptidos se unen a receptores acoplados a proteínas G, modulando la señalización de segundos mensajeros y afectando la fosforilación de proteínas CREB, lo que modifica la transcripción de los genes reloj *Periodo* (*Per*) (Ono et al., 2021).

Clásicamente se ha considerado que las neuronas del SCN en mamíferos son las células marcapasos que generan y controlan los ritmos diarios fisiológicos y conductuales y coordinan los programas circadianos en los tejidos periféricos (Yoo et al., 2004). Sin embargo, en los últimos años, se ha revelado que los astrocitos del SCN funcionan de forma autónoma como un reloj circadiano central, regulando los ritmos circadianos moleculares y conductuales (Barca-Mayo et al., 2017, 2020; Brancaccio et al., 2017, 2019; Tso et al., 2017).

2.1.2 OSCILADORES CIRCADIANOS EN LOS TEJIDOS PERIFÉRICOS

Mientras que el SCN se sincroniza a los ciclos de luz-oscuridad, los relojes circadianos en los tejidos periféricos se ajustan a los patrones diarios de alimentación. Esto puede resultar en la desincronización de los osciladores circadianos en estos tejidos respecto al SCN, como es común en los trabajadores nocturnos (Hastings et al., 2023). La restricción de la ingesta alimentaria a un período específico del día o de la noche, conocida como restricción

alimentaria temporal (TRF, *time-restricted feeding*), se ha asociado con un aumento de la actividad que precede a la hora de la ingesta (Damiola et al., 1996; Hara et al., 2001; Stokkan et al., 2001). Este aumento de la actividad se denomina actividad anticipatoria a la comida (FAA, *food anticipatory activity*). En este paradigma de TRF, los relojes periféricos ajustan su fase para sincronizarse con la hora de la comida. Una vez establecida la FAA, los efectos de la TRF en los relojes periféricos y en la actividad locomotora persisten incluso en ausencia de alimento. Además, estos ritmos permanecen desacoplados del SCN, que a su vez permanece sincronizado con los ciclos de luz (Damiola et al., 2000; Hara et al., 2001; Stokkan et al., 2001). Sorprendentemente, en ausencia de un SCN funcional, la FAA continúa manifestándose y la ingesta de alimentos se convierte en un ZT efectivo capaz de coordinar los ritmos fisiológicos circadianos, como la liberación de hormonas, patrones de comportamiento, la actividad de genes reloj en tejidos periféricos y sus genes diana (Izumo et al., 2014; Mistlberger, 2020; Sheward et al., 2007).

Por todo ello, se ha planteado la teoría de que la sincronización con los horarios de alimentación no depende del SCN, sino que está gobernada por un “oscilador de sincronización con los alimentos” (FEO, *food entrainable oscillator*), cuya ubicación aún se desconoce (Mistlberger, 2020). Investigaciones recientes han señalado que en las etapas tempranas después del nacimiento, la conexión entre las células ipRGC de la retina y las neuronas que producen el neuropéptido Y (NPY, *neuropeptide Y*) en el área conocida como zona intergenicular (IGL, *intergeniculate leaflet*) juega un papel crucial en la sincronización con el TRF en el animal adulto. En este modelo, las señales procedentes de las neuronas IGL^{NPY} inhiben la actividad del SCN, permitiendo que las señales de FEO generen la FAA (Fernández et al., 2020).

Considerando que las lesiones en el hipotálamo y los modelos *knockout* (KOs) dirigidos a tipos celulares específicos en el cerebro, como el tronco encefálico y las áreas cerebrales anteriores también alteran la FAA (Davidson, 2009; Mendoza et al., 2010), se plantea la posibilidad de que el FEO no resida necesariamente en una región cerebral específica, sino que podría estar distribuido funcionalmente entre áreas cerebrales competentes para provocar cambios en el comportamiento. En línea con esta idea, se ha descubierto recientemente que la acción de la insulina y del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1, *insulin-like growth factor-1*) en diversas regiones cerebrales, desencadenada por la ingesta, resulta esencial para el funcionamiento del FEO (Crosby et al., 2019). Es fundamental destacar que la señal que desencadena la FAA podría originarse en el hígado. Concretamente, este estudio evidenció que la proteína PERIOD2 (PER2) es crucial para la producción de cuerpos cetónicos derivados del hígado, los cuales, a su vez, envían señales al cerebro para inducir la FAA (Chavan et al., 2016).

En resumen, es posible que el FEO no esté confinado en un único tejido, sino que tenga naturaleza sistémica. En este contexto, señales relacionadas con la ingesta, como la insulina y los cuerpos cetónicos generados en tejidos periféricos, activan diferentes regiones cerebrales con la capacidad para influir en el comportamiento. Entre estas regiones se incluye el SCN, que se ve influenciado por la conexión de las células ipRGCs con el área IGL durante el desarrollo, permitiendo así la sincronización no fótica con la alimentación (Fernández et al., 2020) (Figura 6).

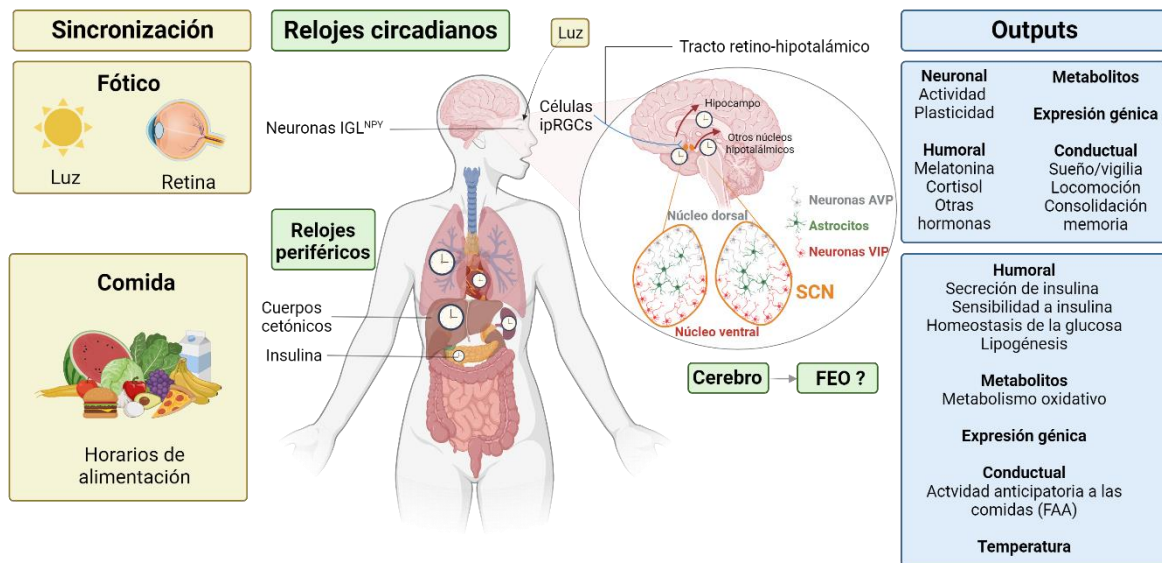


Figura 6. Sistema de cronometraje circadiano. El sistema de cronometraje se compone de dos marcapasos (el SCN y el FEO) y relojes periféricos en otras áreas cerebrales y tejidos periféricos, sincronizando los relojes de todo el cuerpo para adaptar y optimizar la fisiología a los cambios en el entorno. Los *inputs* de luz que llegan al SCN a través de la retina son el factor de sincronización más importante para el SCN, que a su vez coordina los relojes periféricos a través de señales neuronales, endocrinas y conductuales. Las señales relacionadas con la alimentación (insulina y cuerpos cetónicos) generadas por tejidos periféricos y las neuronas IGL^{NPY} controlan el FEO, que regula los *outputs* como la actividad anticipatoria a la comida (FAA). Creado con Biorender.com.

2.3 EL RELOJ CIRCADIANO MOLECULAR

La base molecular del reloj circadiano en mamíferos gira en torno a un circuito de retroalimentación transcripcional-traducciona (TTFL, *transcriptional-translational feedback loop*) rítmico y autónomo de genes/proteínas reloj (Figura 7) (Hastings et al., 2023). Los reguladores positivos del TTFL son dos factores de transcripción específicos de la secuencia E-box: BMAL1 (*Brain and Muscle ARNT-Like protein-1*) y CLOCK (*Circadian Locomotor Output Cycles Kaput*). Por la mañana, CLOCK y BMAL1 se heterodimerizan para activar la expresión de los genes *Period* (*Per1*, *Per2* y *Per3*) y *Criptocromo* (*Cry1* y *Cry2*) (Takahashi, 2017). PER/CRY se translocan al núcleo donde se acumulan gradualmente y reclutan factores inhibidores de la transcripción que provocan la degradación de los dímeros BMAL1/CLOCK, lo que a su vez inhibe su propia transcripción (Kume et al., 1999). Por la noche, los complejos PER: CRY se degradan hasta que la transactivación puede reiniciarse a la mañana siguiente (Hastings et al., 2023). De esta manera, se establecen fluctuaciones rítmicas en los niveles de BMAL1, CLOCK, PER y CRY, con una periodicidad de alrededor de 24 horas (Cox & Takahashi, 2019) (Figura 7). Este bucle central se complementa con bucles de retroalimentación adicionales, donde la expresión rítmica de los genes que codifican los receptores nucleares de la subfamilia 1 Nr1d1 y Nr1d2 (REV-ERB) y el receptor huérfano A

relacionado con los receptores de ácido retinoico (RORA) es controlada por CLOCK: BMAL1 (Preitner et al., 2002). A su vez, REV-ERB y RORA regulan negativa y positivamente, respectivamente, la expresión de *Bmal1*, al actuar en secuencias reguladoras del elemento de respuesta a REV-ERB (RORE) (Abe et al., 2022; Cho et al., 2012; Sato et al., 2004) (Figura 7).

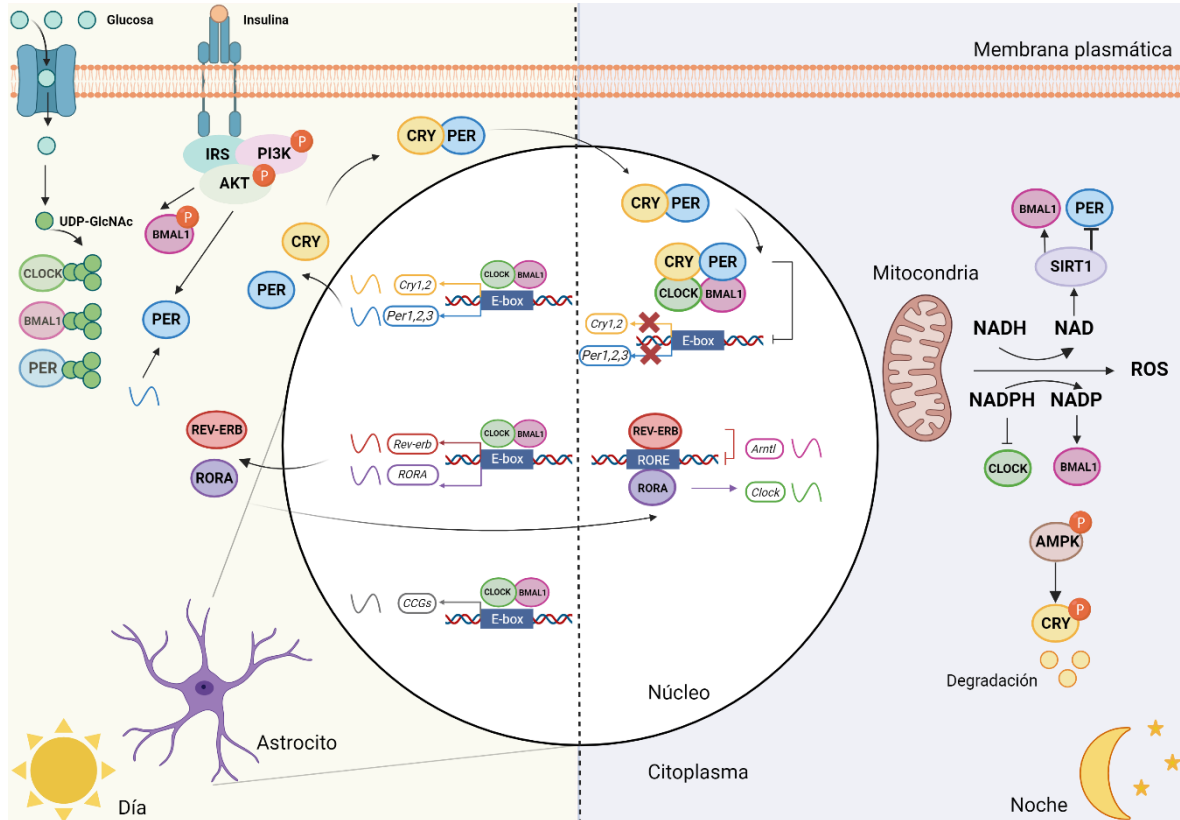


Figura 7. Red central del reloj molecular. El reloj molecular de los mamíferos se compone de un bucle de retroalimentación transcripcional-traduccional en el que intervienen las proteínas del reloj CLOCK, BMAL1, PER y CRY y los receptores nucleares REV-ERB y ROR. La heterodimerización de CLOCK y BMAL1 activa la transcripción de los genes *Per*, *Cry*, *Rora* y *Rev-erb*. Posteriormente, PER/CRY se translocan al núcleo e inhiben la actividad transcripcional de BMAL1 y CLOCK, bloqueando así su propia transcripción. Por otro lado, REV-ERB y su receptor nuclear ROR α , que se unen competitivamente a RORE, reprimen o activan la transcripción del gen *Bmal1* o *Clock*, respectivamente. Modificaciones postraduccionales de los factores nucleares también pueden regular la transcripción. Por ejemplo: la desacetilación de BMAL1 o PER2 por SIRT1, la fosforilación de BMAL1 o la traducción de PER2 por la señalización de insulina, la O-GINacilación de CLOCK, BMAL1 y PER2; y la fosforilación y consecuente degradación de CRY1 por AMPK. Creado con Biorender.com.

Las dianas directas de CLOCK/BMAL1, denominadas genes controlados por el reloj (CCGs, *clock-controlled genes*), incluyen genes relacionados con procesos rítmicos como la ingesta alimentaria, el ciclo sueño-vigilia y la regulación de la glucosa (Marcheva et al., 2010; Richards & Gumz, 2012) (Figura 7). Entre estos CCGs se encuentran factores de transcripción, como la proteína de unión al promotor del sitio D de la albúmina (DBP, *D-box*

binding PAR bZIP transcription factor) (Stratmann et al., 2012) y la caja homeótica 3 de unión a la caja E con dedos de zinc (*ZFH3, zinc finger homeobox 3*) (Parsons et al., 2015). Estos factores de transcripción inducen la expresión rítmica de genes diana. Como resultado de la secuencia organizada del bucle TTFL, se habilita la transcripción rítmica y autónoma de todos aquellos genes controlados por el reloj molecular, controlando así todos los aspectos relacionados con las funciones celulares rítmicas (Wen et al., 2020). Cabe destacar que los TTFL son responsables de las oscilaciones en aproximadamente el 10-20% de todos los genes expresados (Panda et al., 2002; Storch et al., 2002). Sin embargo, es interesante destacar que el 20% de las proteínas que oscilan no muestran signos de ritmicidad a nivel de ARN mensajero (mARN). Esto sugiere que el bucle de retroalimentación transcripcional no es el único mecanismo que genera ritmicidad en los seres vivos (Robles et al., 2017). De hecho, modificaciones postraduccionales, como la fosforilación, la acetilación, la ubiquitinación y otras, pueden afectar tanto a las proteínas del propio reloj circadiano como a las proteínas que son reguladas por este mecanismo. De esta manera, las modificaciones postraduccionales contribuyen a la generación y sincronización de los ritmos biológicos al influir en la actividad y la estabilidad de las proteínas involucradas en el reloj circadiano y en sus interacciones con otros componentes celulares (Barca-Mayo & López, 2021).

Las “vías sensoras” del metabolismo encargadas de detectar el estado metabólico, ejercen una influencia significativa en el reloj molecular de los tejidos periféricos. Durante la alimentación, se activan procesos anabólicos mediante la vía insulina-AKT-mTOR. Por otro lado, durante el ayuno, la activación de AMPK induce procesos catabólicos e inhibe la actividad de mTOR (Inoki et al., 2012). La vía de insulina-AKT-mTOR regula la fosforilación de BMAL1 y la traducción de PER2, especialmente en el estado postprandial (Dang et al., 2016; Luciano et al., 2018; Robles et al., 2017). La señalización de la insulina, por ejemplo, sincroniza los relojes circadianos tanto *in vivo* como *in vitro* al inducir la síntesis de proteínas PER (Crosby et al., 2019). De forma similar, en los tejidos periféricos, AMPK modula la fosforilación de CRY1, regulando así su degradación rítmica (Lamia et al., 2009). Además, los niveles de glucosa también influyen en la duración del período a través de la O-GlucosilNAcetilación (O-GlcNAc), afectando a las proteínas CLOCK, BMAL1 y PER2 (Kaasik et al., 2013; M. D. Li et al., 2013; Ma et al., 2013). Los relojes moleculares también responden a la relación entre el NAD y el FAD, indicadores indirectos del estado energético celular. La oxidación del NAD, bajo control del reloj, impacta en la actividad transcripcional del complejo CLOCK-BMAL1, a través de la sirtuina 1 (SIRT1) y la poli-ADP-ribosilación mediada por la poli ADP-ribosa polimerasa 1 (PARP, *Poly ADP-ribose polymerase*) (Asher et al., 2010; Foteinou et al., 2018; Nakahata et al., 2008) (Figura 7).

En resumen, el sistema circadiano garantiza una coordinación temporal precisa entre los procesos catabólicos y anabólicos en concordancia con el ciclo de alimentación-ayuno (Barca-Mayo & López, 2021). Dado que la relación entre el metabolismo y el reloj circadiano es bidireccional (Takahashi, 2017), no resulta sorprendente que los modelos animales con defectos genéticos en el reloj manifiesten alteraciones metabólicas y viceversa, es decir, que en condiciones de estrés metabólico se produzcan disrupciones en el sistema circadiano (Eckel-Mahan & Sassone-Corsi, 2013).

2.4 RITMOS CIRCADIANOS Y METABOLISMO: LAS DOS CARAS DE LA MISMA MONEDA

Los factores genéticos y ambientales, como la exposición a ciclos artificiales de luz-oscuridad, alteración en el sueño, trabajo por turnos y desfase horario, tienen un impacto significativo en el sistema circadiano lo que a su vez contribuye al desarrollo del síndrome metabólico (Zimmet et al., 2019) (Figura 8). Este síndrome abarca una serie de factores de riesgo y comorbilidades cardio-metabólicas que aumentan la probabilidad de padecer enfermedades cardiovasculares, obesidad y diabetes tipo 2 (Punjabi et al., 2004). Aproximadamente el 30% de los adultos se ven afectados por este síndrome (Światkiewicz et al., 2021).

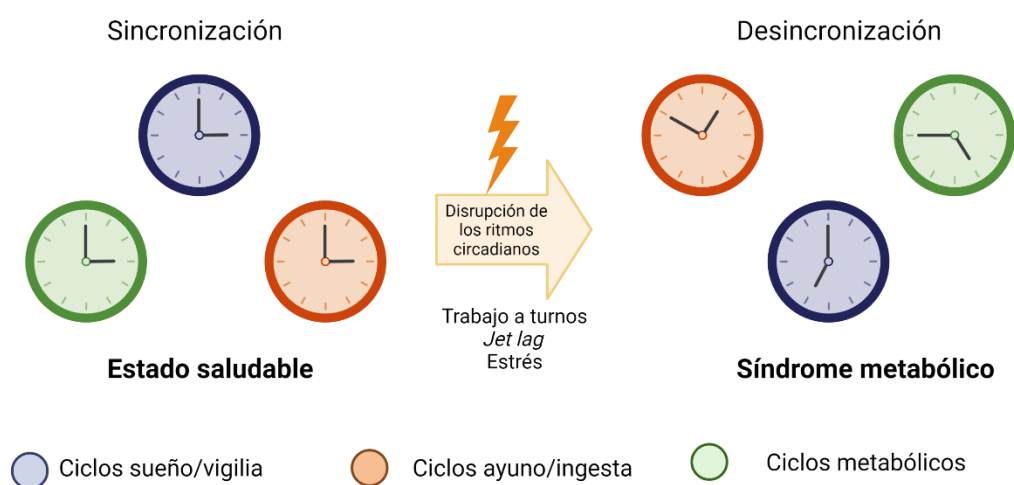


Figura 8. Impacto de la desincronización del sistema circadiano en el desarrollo del síndrome metabólico. El sistema circadiano se compone de múltiples ciclos circadianos como el ciclo de sueño/vigilia (azul), los ciclos de ayuno/ingesta (naranja) y los ciclos metabólicos (verde). En un organismo sano, mantienen una relación de fase estable entre sí y, por lo tanto, están sincronizados. Sin embargo, la alteración de esta sincronía puede producirse por la interrupción de uno o más de los ciclos, por ejemplo, por el trabajo a turnos, el *jet lag* y el estrés. Esto provoca el desacoplamiento de los ciclos y el consiguiente desarrollo de enfermedades como el síndrome metabólico y la obesidad. Creado con Biorender.com.

En los seres humanos, las mutaciones en genes del reloj molecular están fuertemente asociadas con la obesidad, la resistencia a insulina y la diabetes tipo 2. Específicamente, se han descrito asociaciones entre polimorfismos de un solo nucleótido en *BMAL1* y la diabetes tipo 2 (Woon et al., 2007), haplotipos específicos de *CLOCK* y obesidad (Scott et al., 2008; Sookoian et al., 2008), así como polimorfismos en *CRY2* y niveles elevados de glucosa en condiciones de ayuno (Barker et al., 2011; Dupuis et al., 2010). Los modelos en roedores con deleciones en genes del reloj, ya sea en todo el organismo o en tejidos específicos, también han demostrado asociaciones con resistencia a la insulina, obesidad y diabetes tipo 2 (Hogenboom et al., 2019; Marcheva et al., 2010; McDearmon et al., 2006; Paschos et al.,

2012; Shi et al., 2013). Un ejemplo notable son los ratones con la delección de BMAL1 en el SCN. Estos ratones presentan ritmos de actividad locomotora comparables a los animales control en ciclos de luz-oscuridad, pero se vuelven arrítmicos en oscuridad constante, lo que coincide con un aumento en la acumulación de grasa corporal y alteraciones en el metabolismo de la glucosa. Restringir la ingesta de alimentos a un intervalo de 12 horas en dichos mutantes logra restablecer parcialmente los ritmos circadianos, así como el peso corporal y la homeostasis de la glucosa (Kolbe et al., 2019). Estos resultados sugieren que el mantenimiento de los ritmos circadianos es esencial para la función metabólica adecuada (Koronowski & Sassone-Corsi, 2021). Sorprendentemente, la delección específica de BMAL1 en astrocitos en ratones es suficiente para inducir obesidad, resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa (Barca-Mayo et al., 2020), lo cual sugiere que un ritmo circadiano robusto de los astrocitos podría preservar la homeostasis de todo el organismo y la salud metabólica (Barca-Mayo & López, 2021). En conjunto, estos estudios subrayan la importancia crítica de la interacción entre el sistema circadiano y el metabolismo en el desarrollo y la prevención de trastornos metabólicos.

El SCN central anticipa y sincroniza la función diaria de los tejidos periféricos de acuerdo con los cambios naturales de la luz. Sin embargo, con la introducción de la luz artificial y el estilo de vida 24/7 de nuestra sociedad, ha expuesto a los seres humanos a una mayor cantidad de luz artificial y horarios irregulares (Albrecht, 2017; Barca-Mayo & López, 2021). Estos cambios en el entorno llevan a una desincronización entre el reloj interno y el ciclo luz-oscuridad, conocido como “desajuste circadiano” (Barca-Mayo & López, 2021) (Figura 8). Estudios en humanos y animales han asociado la obesidad y la diabetes tipo 2 con una mayor exposición a la luz durante las horas de oscuridad natural (Cheung et al., 2016; Fonken et al., 2010; Fonken & Nelson, 2014; McFadden et al., 2014; Obayashi et al., 2013; Versteeg et al., 2017).

A pesar de la importancia de este fenómeno para la salud, todavía se desconocen los mecanismos moleculares y celulares implicados en la fototransducción fisiológica y patológica en el SCN. Un ejemplo es el ritmo del neuropéptido VIP, que desempeña un papel crucial en la sincronización de las neuronas del SCN con el ciclo luz-oscuridad (Aton et al., 2005; Colwell et al., 2003). Este ritmo está impulsado por el ciclo luz-oscuridad en lugar del reloj circadiano (Takahashi et al., 1989). Así, el mecanismo por el cual la delección de BMAL1 en los astrocitos conduce a niveles constantemente elevados de VIP sigue siendo desconocido (Barca-Mayo et al., 2017). De hecho, la exposición constante a la luz aumenta los niveles de VIP, alargando el período circadiano y resultando en patrones de actividad diaria con dos o más picos (Ohta et al., 2005). Este patrón se asemeja al de los ratones con delección de BMAL1 en astrocitos (Barca-Mayo et al., 2017). Curiosamente, estudios en *Drosophila* mostraron que las manipulaciones genéticas específicas en células gliales provocan arritmicidad circadiana debido al aumento constante del factor de dispersión pigmentaria (PDF, *pigment dispersing factor*), que actúa sobre un receptor similar al de VIP en mamíferos (Ng et al., 2011; Suh & Jackson, 2007). Estos hallazgos sugieren que el reloj astrocítico tiene una función crucial en la facilitación de la sincronización a la luz y, por ende, en la mediación de los cambios de fase inducidos por la luz en la fisiología y el comportamiento. Este fenómeno indica que la regulación de VIP por parte de los astrocitos podría estar conservada en diferentes especies,

subrayando la importancia de profundizar en esta línea de investigación para comprender mejor cómo las señales lumínicas influyen en los ritmos circadianos.

La luz es la principal señal temporal para el SCN, mientras que el horario de las comidas se posiciona como el principal ZT para los relojes periféricos. La desregulación en los horarios de alimentación ha demostrado tener un impacto negativo en la salud cardiometabólica, alterando los ritmos circadianos y provocando una regulación metabólica anómala, desequilibrios en la homeostasis energética y un mayor riesgo cardiometabólico (Pot et al., 2016). Además, los patrones alimentarios prolongados o irregulares, comunes en trabajadores a turnos, se asocian con una disminución en la tolerancia a la glucosa y la sensibilidad a la insulina (Gan et al., 2015; Leproult et al., 2014; Morris et al., 2016; Qian et al., 2018; Scheer et al., 2009; Vetter et al., 2018; Wefers et al., 2018). Incluso, un breve protocolo de desajuste circadiano de tan solo 8 días en humanos es capaz de aumentar los niveles de glucosa e insulina en sangre (Scheer et al., 2009). Este desajuste circadiano también incrementa el riesgo de obesidad al reducir el gasto energético (Chaput et al., 2023), generando cambios en las hormonas orexigénicas que promueven la sensación de hambre (McHill et al., 2014; Nguyen & Wright, 2009; Qian et al., 2019; Scheer et al., 2009; Qian et al., 2019; Scheer et al., 2009). Aunque no se observa un aumento significativo en la cantidad de calorías ingeridas por parte de los trabajadores a turnos que experimentan desajustes circadianos en comparación con aquellos que mantienen un horario regular de sueño y vigilia, estudios han revelado un mayor riesgo de obesidad en estos trabajadores en comparación con aquellos cuyos ciclos de sueño y vigilia se ajustan a los ciclos de luz y oscuridad (Balieiro et al., 2014; Bonham et al., 2016; Mota et al., 2013; Qian et al., 2019). Esto sugiere que el momento de la ingesta es esencial para la salud metabólica.

La biología circadiana influye en cómo el cuerpo procesa y utiliza la energía a lo largo del día y la noche. Consumir calorías durante la noche, cuando el organismo está programado para un menor gasto energético y una menor sensibilidad a la insulina, resulta en una utilización menos eficiente de esas calorías. Alinear el consumo de alimentos con la fase de vigilia durante el día, cuando el organismo está naturalmente preparado para consumir energía y procesar alimentos, contribuye a mantener el equilibrio energético (Arble et al., 2009; Hatori et al., 2012). La elección de alimentos y el horario de las comidas son aspectos interconectados que pueden desempeñar un papel crucial en la salud metabólica. Consumir calorías durante los momentos adecuados puede ayudar a optimizar la respuesta metabólica del cuerpo, mientras que la alimentación en momentos menos apropiados puede alterar este equilibrio y contribuir a un mayor riesgo de obesidad y otros problemas cardiometabólicos (Chaput et al., 2023). En este sentido, el enfoque en la sincronización de los ritmos circadianos, tanto en términos de sueño como de alimentación, es fundamental para mantener una salud metabólica óptima y reducir el riesgo de enfermedades relacionadas con la obesidad y la resistencia a insulina.

Estudios epidemiológicos y experimentales han revelado las consecuencias perjudiciales de la restricción prolongada del sueño y las alteraciones en los patrones de sueño en diversos órganos y tejidos (Xie et al., 2019). Estos trastornos impactan significativamente en la salud metabólica. Por ejemplo, la tasa metabólica basal tiende a disminuir, y tras la ingesta de alimentos, se observa un aumento en la concentración de glucosa debido a una respuesta

INTRODUCCIÓN

inadecuada de la secreción pancreática de insulina (Buxton et al., 2012; Stenvers et al., 2019). Además, existe un mayor riesgo de desarrollar obesidad y diabetes tipo 2 (Bosy-Westphal et al., 2008; Cappuccio et al., 2010; Karatsoreos et al., 2011; Nedeltcheva et al., 2009; Reutrakul & Mokhlesi, 2017; Shan et al., 2015), se producen alteraciones en el equilibrio entre el sistema nervioso simpático y parasimpático (Spiegel et al., 1999; Stamatakis & Punjabi, 2010), aumentan los niveles circulantes de catecolaminas (Rao et al., 2015), cortisol (Rao et al., 2015; Stamatakis & Punjabi, 2010) y disminuyen los niveles de melatonina (Szewczyk-Golec et al., 2015). La presencia de niveles anómalos de glucocorticoides y melatonina podría afectar negativamente la secreción de insulina, ya que los glucocorticoides disminuyen su producción mientras que la melatonina la aumenta (Stenvers et al., 2019). El sistema circadiano desempeña un papel fundamental en el mantenimiento a largo plazo del equilibrio energético al regular la comunicación hormonal entre el tejido adiposo y el cerebro a través de la hormona leptina. Se ha observado que alteraciones en el reloj circadiano, como el *jet lag* a largo plazo, pueden ocasionar la resistencia a la leptina en animales, resaltando la importancia crítica del reloj circadiano en el control preciso del metabolismo y el equilibrio energético (Kettner et al., 2015). Este fenómeno indica que la adecuada sincronización de los ritmos circadianos es esencial para garantizar un funcionamiento metabólico óptimo y prevenir desregulaciones que podrían conducir a problemas de salud. Al mismo tiempo, el sistema circadiano también ejerce su influencia en la regulación de las neurohormonas asociadas con la función cardiovascular, como la angiotensina II, la renina, la aldosterona, la hormona del crecimiento y el péptido natriurético auricular (Bhatnagar, 2017). Estas neurohormonas desempeñan un papel crucial en la regulación de la presión arterial y otros aspectos del sistema cardiovascular. Cuando se produce un desajuste en los ritmos circadianos, como en el caso de la alteración del sueño o cambios en los horarios de alimentación, estas neurohormonas pueden contribuir al aumento de la presión arterial (Chellappa et al., 2019; Scheer et al., 2009). En resumen, estas investigaciones resaltan la interconexión entre el reloj circadiano, el metabolismo energético y la función cardiovascular. Subrayan también la importancia crítica de mantener ritmos circadianos adecuados para una salud metabólica y cardiovascular óptima.

Una dieta alta en grasas perturba la coordinación temporal de las vías metabólicas entre diferentes tejidos, como se observa en el metaboloma circadiano del cerebro y suero de ratones (Dyar et al., 2018). La falta de un ritmo claro de ingesta y ayuno puede inhibir la oscilación de genes metabólicos clave (Greenwell et al., 2019; Su et al., 2016). En contraste, los patrones de alimentación y los horarios de comida pueden fortalecer el reloj circadiano (Koronowski & Sassone-Corsi, 2021). La sincronización circadiana de los ciclos de alimentación y ayuno se asocia con beneficios en diversas especies. Por ejemplo, en la mosca, esta alineación se ha asociado con una mayor esperanza de vida (Ulgherait et al., 2021); en ratones, esto se vincula a la protección contra trastornos metabólicos (Arble et al., 2009; Chaix et al., 2019; Hatori et al., 2012; Palmisano et al., 2017) y, en seres humanos, se relaciona con la promoción de la salud (Manoogian et al., 2019; Wilkinson et al., 2020). La restricción calórica en ratones tiene beneficios metabólicos notables, como la reducción del contenido de grasa (Acosta-Rodríguez et al., 2022). Curiosamente, la restricción calórica temporal en ratones, especialmente durante la noche, muestra efectos positivos al atenuar cambios relacionados con el envejecimiento bajo condiciones de alimentación *ad libitum*,

incluyendo mejoras en la homeostasis de la glucosa, la sensibilidad a la insulina y los perfiles hormonales (Acosta-Rodríguez et al., 2022). En definitiva, la sincronización adecuada de los patrones de alimentación y ayuno, así como la consideración de los momentos óptimos para la restricción calórica, es crucial para mantener la salud metabólica y promover un envejecimiento saludable. Por lo tanto, es razonable considerar que las interrupciones en los flujos de nutrientes o la falta de armonización entre los ritmos de los relojes centrales y periféricos podrían contribuir a la patofisiología de la resistencia a la insulina a nivel tisular. Un ejemplo concreto sería el desequilibrio entre la producción hepática de glucosa, la captación muscular de glucosa y la ingesta de carbohidratos, que podría contribuir al aumento de los niveles de glucosa. De manera similar, un desajuste entre el almacenamiento de lípidos en el WAT, la oxidación de lípidos en el BAT y la producción hepática de lípidos podría impulsar la acumulación anormal de lípidos en distintos tejidos (Barca-Mayo & López, 2021). Es relevante mencionar que los astrocitos, al ubicarse en la interfaz entre los vasos sanguíneos y las neuronas, tienen una posición estratégica para detectar señales metabólicas sistémicas que sincronizan los relojes periféricos, como los glucocorticoides o la insulina (Barca-Mayo et al., 2017; Crosby et al., 2019).

En resumen, estos estudios indican que la falta de sincronización circadiana conduce a la desincronización de múltiples órganos y desempeña un rol patológico en el desarrollo de la disfunción metabólica sistémica. Es importante destacar que la disfunción metabólica, a su vez, puede agravar el desajuste circadiano, estableciendo así un círculo vicioso entre la obesidad y las perturbaciones en el funcionamiento de los relojes biológicos (Froy, 2010).

3 ASTROCITOS

3.1 BIOLOGÍA DE LOS ASTROCITOS EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

El cerebro de los mamíferos alberga células con una gran diversidad molecular, morfológica y funcional. Estas células forman circuitos altamente especializados desempeñando funciones específicas. En las últimas décadas, se han identificado redes neuronales específicas en la región hipotalámica, cruciales en la regulación del metabolismo sistémico, la ingesta de alimentos y el control del peso corporal (García-Cáceres et al., 2019). La glía constituye el tipo celular más abundante en el cerebro y puede clasificarse en función de su origen celular en dos tipos: (1) microglía y (2) macroglía, donde se incluyen astrocitos, oligodendrocitos y tanicitos (García-Cáceres et al., 2012). La macroglía deriva del neuroectodermo (Verkhatsky et al., 2019), mientras que la microglía proviene del neuroepitelio o de las células hematopoyéticas (Ginhoux & Prinz, 2015). Aunque históricamente las células gliales fueron consideradas principalmente como soporte y nutrición para las neuronas, ahora se comprende que desempeñan funciones más complejas y activas en la regulación del entorno cerebral. Los astrocitos, en particular, han atraído atención debido a su capacidad para influir en la función neuronal, modular la transmisión sináptica y participar en la homeostasis de iones y neurotransmisores (Fields & Stevens-Graham, 2002; García-Cáceres et al., 2019; Jäkel & Dimou, 2017; Tasker et al., 2012). Además, se ha reconocido que las células gliales también están implicadas en la regulación metabólica sistémica (García-Cáceres et al., 2019). En particular, los astrocitos hipotalámicos han demostrado ser elementos clave en la detección de señales metabólicas y la transducción de estas señales para influir en la función neuronal y, por lo tanto, en la homeostasis metabólica general (García-Cáceres et al., 2016; Kim et al., 2014). Su capacidad para detectar y responder a cambios en los niveles de glucosa, hormonas y metabolitos les otorga un papel importante en la coordinación de las respuestas metabólicas y la adaptación a diferentes estados nutricionales y energéticos (González-García & García-Cáceres, 2021).

3.2 MORFOLOGÍA Y ORGANIZACIÓN DE LOS ASTROCITOS

Dentro de la macroglía, los astrocitos constituyen una de las poblaciones celulares más abundantes del cerebro (Sofroniew, 2020). En función de su morfología y localización los astrocitos se clasifican en dos grandes grupos: (1) astrocitos protoplásmicos, localizados en la sustancia gris y (2) astrocitos fibrosos, situados en la sustancia blanca (Liddelow & Barres, 2015). Los astrocitos protoplásmicos son el tipo predominante. Estos astrocitos poseen forma estrellada con múltiples procesos gruesos y cortos que irradian desde el soma celular y que se dividen gradualmente en procesos cada vez más finos, generando una densa red de procesos terminales, que terminan en forma de pie en los vasos sanguíneos, en contacto directo con

otros astrocitos o se asocian muy estrechamente con las sinapsis (Freeman, 2010; Oberheim et al., 2006; Zhou et al., 2019). Los pies terminales perivasculares, junto con las células endoteliales de los vasos sanguíneos cerebrales, forman el sistema glinfático (Iliff et al., 2012). Por su parte, los astrocitos fibrosos tienen procesos más largos y finos, en su mayoría no ramificados. Los procesos terminales también terminan en forma de pie, que rodean los nódulos de Ranvier y entran en contacto con los vasos sanguíneos. Los astrocitos fibrosos participan principalmente en la reparación del tejido dañado, especialmente en la médula espinal, un proceso que da lugar a la formación de cicatrices (Sofroniew & Vinters, 2010).

Aunque esta clasificación es ampliamente utilizada, los astrocitos forman una población muy heterogénea, distinguiéndose varios subtipos celulares. Además, los astrocitos muestran diferenciación incluso dentro de una misma región cerebral, ya que desempeñan funciones específicas en regiones particulares del sistema nervioso (Allen & Barres, 2009). Por ejemplo, los astrocitos radiales son células especializadas que están presentes durante la embriogénesis temprana del SNC, formando un andamiaje crucial para favorecer la migración neuronal. Posteriormente, se diferencian en astrocitos, aunque las células gliales radiales permanecen en la retina, como la glía de Müller, o en el cerebelo, como la glía de Bergmann (Barres, 2008; Liddelow & Barres, 2017).

Clásicamente los astrocitos se identificaban por la presencia de una proteína denominada proteína ácida fibrilar glial (GFAP, *glial fibrillary acidic protein*) que actúa como un filamento intermedio (García-Cáceres et al., 2012, 2019). No obstante, en la actualidad se sabe que su uso como marcador de este tipo celular tiene algunas limitaciones. GFAP es expresada por la mayoría de los astrocitos reactivos, pero no siempre es detectable en astrocitos de tejidos sanos (como la corteza cerebral) o alejados del lugar de la lesión. Además, GFAP no está presente en todo el citoplasma, únicamente en las ramificaciones principales, lo que dificulta la identificación del número de astrocitos. Por último, la expresión de GFAP no es exclusiva de los astrocitos protoplásmicos y fibrosos, sino que también es expresada en el SNC por la glía de Müller, la glía de Bergmann, tanicitos, y fuera del SNC por la glía entérica. También expresan GFAP las células mesenquimales de distintos órganos como el hígado, riñón, páncreas, pulmón y testículos (Zhao & Burt, 2007). Debido a estas limitaciones, para la identificación de los astrocitos se han utilizado otros marcadores, como la glutamina sintetasa (Anlauf & Derouiche, 2013; Norenberg, 1979; Patel et al., 1985), la S100 β (Gonçalves et al., 2008), Aldh1a1 (Cahoy et al., 2008; S. A. Liddelow & Barres, 2017) o GLAST (Mori et al., 2006).

Los astrocitos se organizan en dominios no superpuestos, lo que significa que cada astrocito ocupa un territorio espacial único sin superponerse con otros astrocitos cercanos (Bushong et al., 2002; Haber et al., 2006; Halassa, Fellin, & Haydon, 2007). Esta disposición asegura que cada astrocito tenga un control sobre su área designada en el cerebro, permitiéndoles interactuar de manera precisa con las neuronas y las sinapsis dentro de su dominio. Esta organización eficiente contribuye a regular la comunicación y el equilibrio químico en su entorno cercano (Chung et al., 2015; Halassa et al., 2007). Dependiendo de la región cerebral, un solo astrocito de roedor puede cubrir un dominio espacial en el cerebro que oscila entre 20.000 y 80.000 μm^3 , envolver entre 4 y 8 somatas neuronales (Halassa et al., 2007), asociarse con 300 a 600 dendritas neuronales y contactar con aproximadamente

INTRODUCCIÓN

100.000 sinapsis (Freeman, 2010). En el ser humano, estas cifras aumentan, ya que un solo astrocito ocupa un volumen en el cerebro casi 30 veces superior al de los roedores y se asocia con aproximadamente 2.000.000 sinapsis (Oberheim et al., 2006). Las ramificaciones de los astrocitos varían en función de su maduración (en humanos) o en respuesta a estímulos. Esta heterogeneidad en la morfología permite que estas células cambien rápidamente en respuesta a la actividad neuronal o señales específicas (Escartin et al., 2021; Freeman, 2010). Estos cambios pueden ser inducidos por la señalización de calcio (Ca^{2+}) (Shigetomi et al., 2019), alteraciones en los transportadores de glutamato (García-Cáceres et al., 2012) o ajustes en la cobertura alrededor de las sinapsis, que tiende a aumentar en respuesta a la estimulación neuronal (Lushnikova et al., 2009).

Además, también se producen cambios en la morfología de los astrocitos en respuesta a procesos inflamatorios o daño cerebral (Sofroniew, 2020; Sofroniew & Vinters, 2010). En estas situaciones, se desencadena la activación y proliferación de las células gliales en un proceso conocido como astrogliosis, en el cual tanto los astrocitos como la microglía desarrollan un fenotipo hipertrófico o reactivo (Sofroniew, 2020). Este proceso se caracteriza por un aumento en la expresión de proteínas estructurales como GFAP (Escartin et al., 2021) y la vimentina (Ridet et al., 1997), que le confieren una apariencia más fibrosa. Se han descrito astrocitos reactivos en todas las especies de mamíferos estudiadas, mientras que se ha encontrado reactividad de GFAP mínima o nula en peces (Baumgart et al., 2012; Bignami & Dahl, 1976; Hui et al., 2010; Murray, 1976), anfibios (Egar & Singer, 1972; Hung & Stelzner, 1991; O'Hara et al., 1992) y reptiles (Kálmán et al., 2013). Por el contrario, otros estudios informan de algún tipo de reactividad de los astrocitos en estas mismas especies (Bernstein & Bernstein, 1967; Lang et al., 2008; Reier, 1979). Además, en invertebrados, todavía no está claro hasta qué punto existe una glía reactiva (Doherty et al., 2009; MacDonald et al., 2006). Esta falta de consenso sugiere que GFAP podría no ser el principal marcador de la reactividad astrocitaria, y que ésta podría tratarse de un proceso heterogéneo, más que de una respuesta a reacciones inflamatorias (Liddel & Barres, 2017). Existen al menos dos tipos de astrocitos reactivos, denominados A1 y A2, que son inducidos por diferentes lesiones del SNC. Los procesos neuroinflamatorios inducen los astrocitos A1, mientras que las lesiones isquémicas generan los astrocitos A2 (Zamanian et al., 2012). Los análisis transcriptómicos de los astrocitos reactivos muestran que los astrocitos reactivos neuroinflamatorios A1 regulan numerosos genes, incluidos aquellos de la cascada del complemento, que impulsan la destrucción de las sinapsis. Esto sugiere que los astrocitos A1 podrían desempeñar funciones neurotóxicas (Zamanian et al., 2012), contribuyendo a la muerte neuronal y de oligodendrocitos maduros diferenciados tras lesiones agudas del SNC (Liddel et al., 2017). Por el contrario, los astrocitos reactivos A2 regulan numerosos factores neurotróficos, que promueven la supervivencia neuronal, así como las trombospondinas, que promueven la reparación de las sinapsis. Esta regulación sugiere que los astrocitos A2 podrían desempeñar funciones neuroprotectoras (Liddel & Barres, 2017) y promueven la recuperación y reparación del SNC (Bush et al., 1999; Sofroniew & Vinters, 2010; Zador et al., 2009). Sin embargo, aunque los astrocitos muestran algunas características comunes en respuesta a diferentes estímulos patológicos, su heterogeneidad es mucho más compleja de lo que se pensaba (Batiuk et al., 2020; Bayraktar et al., 2020; Gomes et al., 2020; Habib et al., 2020; Hasel et al., 2021; Orre et al., 2014; Pekny et al., 2019; Rusnakova et al., 2013; Sadick et al.,

2022; Ståhlberg et al., 2011; Wheeler et al., 2020). Estudios recientes sugieren que las poblaciones de astrocitos reactivos no deben definirse teniendo en cuenta un único gen marcador (Escartin et al., 2021), sino que es necesario considerar múltiples parámetros, incluyendo la expresión génica, la proteómica, la morfología y la función (Matusova et al., 2023). Así, mediante técnicas de secuenciación, se han identificado distintas poblaciones de astrocitos reactivos en enfermedades neurológicas crónicas asociadas al envejecimiento, como la enfermedad de Huntington, Parkinson y Alzheimer (Clarke et al., 2018; Liddelow et al., 2017; Liddelow & Barres, 2017).

Cabe destacar que en los últimos años ha cobrado un mayor interés el papel de las células gliales en el desarrollo de enfermedades metabólicas, como la obesidad (García-Cáceres et al., 2013; González-García & García-Cáceres, 2021; Horvath et al., 2010; Thaler et al., 2012; Varela et al., 2021). La obesidad inducida por dieta en ratones también provoca astrogliosis en el hipotálamo (Horvath et al., 2010). Sorprendentemente, los cambios morfológicos producidos en los astrocitos, así como el aumento de la producción de citoquinas en el hipotálamo, se producen antes de cualquier indicio de inflamación sistémica o de ganancia de peso corporal (Thaler et al., 2012). La reactividad de los astrocitos inducida por dieta alta en grasa (HFD, *high fat diet*) se caracteriza por un aumento en la expresión de GFAP, la promoción de un fenotipo proinflamatorio (producción y liberación de citoquinas) y la adquisición de una morfología hipertrófica, pero sin proliferación, a diferencia de otras patologías cerebrales (González-García & García-Cáceres, 2021). Estudios recientes han descubierto que la inducción del gen GFAP se produce muy pronto, y que incluso una hora de exposición a HFD es suficiente para provocar cambios significativos en su expresión (Cansell et al., 2021). Además de la obesidad inducida por la dieta, otros estudios también han descrito la presencia de astrogliosis reactiva en modelos genéticos de ratón obesos (Buckman et al., 2013; Hsuchou et al., 2008; Pan et al., 2008), o por la influencia de la dieta materna durante las etapas fetal y temprana de la vida de la descendencia (Fuente-Martín et al., 2012).

3.3 FISIOLÓGÍA DE LOS ASTROCITOS

A diferencia de las neuronas, cuya excitabilidad se basa en señales eléctricas generadas a través de la membrana plasmática, los astrocitos presentan excitabilidad celular fundamentada en las variaciones de Ca^{2+} citosólico principalmente como resultado de la movilización de Ca^{2+} almacenado en el retículo endoplasmático (Perea et al., 2009). Los niveles elevados de Ca^{2+} desempeñan un papel crucial como señales celulares (Perea & Araque, 2005). La elevación de estos niveles puede ocurrir de forma espontánea en ausencia de actividad neuronal, o bien ser desencadenada por diferentes estímulos, como la estimulación mecánica, ligandos exógenos o neurotransmisores liberados durante la actividad neuronal (Perea & Araque, 2005), evidenciando así la existencia de una comunicación activa entre neuronas y astrocitos (Navarrete et al., 2013).

Además, los astrocitos liberan sustancias neuroactivas denominadas gliotransmisores (Perea et al., 2009), incluyendo el glutamato, ATP, D-serina, adenosina, GABA, factor de

INTRODUCCIÓN

necrosis tumoral α (TNF- α , *tumor necrosis factor*), prostaglandinas, etc. Estos gliotransmisores pueden influir en la excitabilidad neuronal, así como en la transmisión y plasticidad sináptica (Navarrete et al., 2013). Estos hallazgos han llevado al desarrollo del concepto de “sinapsis tripartita”, donde los astrocitos y neuronas se comunican de manera recíproca, sugiriendo que la función cerebral resulta de la coordinación de la señalización entre ambos tipos celulares (Perea & Araque, 2007). La sinapsis tripartita se compone de tres elementos: los componentes presinápticos, los elementos postsinápticos y los astrocitos adyacentes. Estos elementos intercambian información con el propósito de regular la transmisión de señales (Perea et al., 2009) (Figura 9).

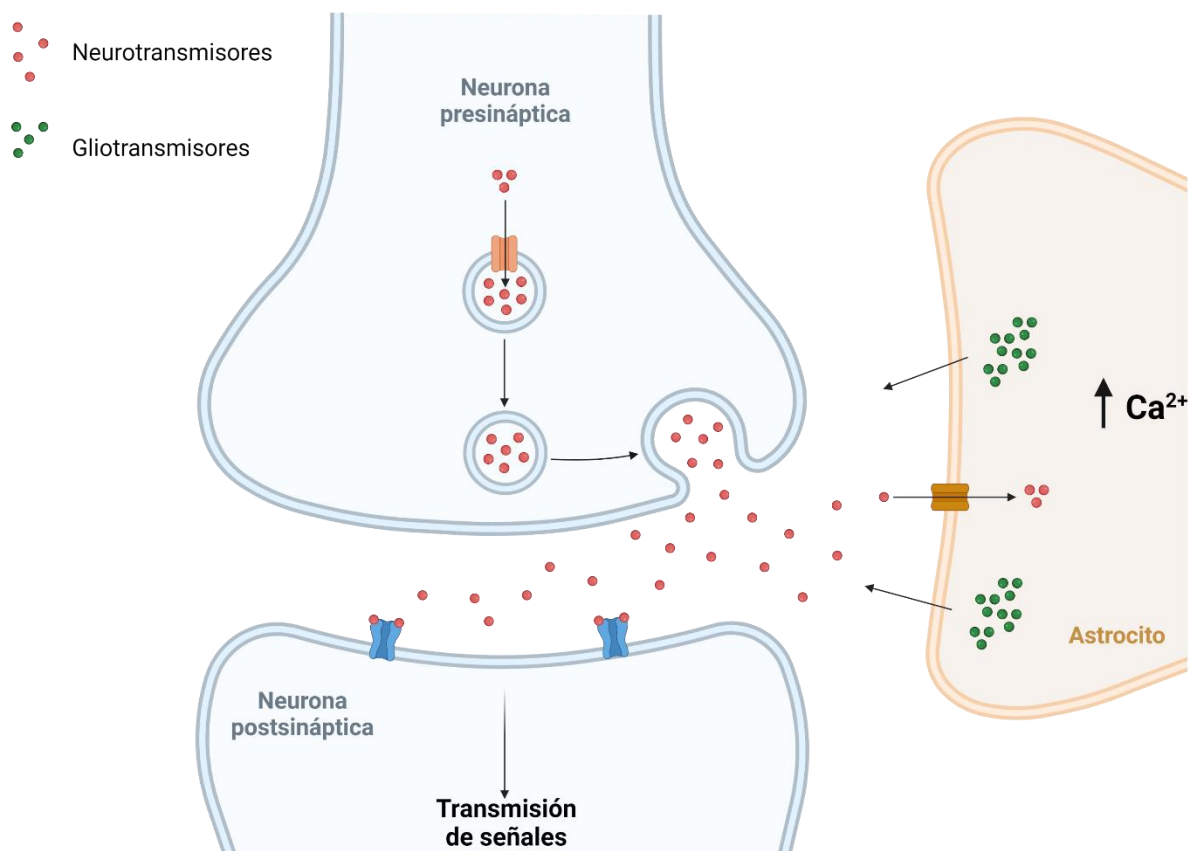


Figura 9. Esquema de una sinapsis tripartita. Creado con Biorender.com.

3.4 FUNCIONES DE LOS ASTROCITOS EN EL CONTROL METABÓLICO

Los astrocitos desempeñan un conjunto diverso de funciones esenciales en el SNC (Sofroniew & Vinters, 2010). Estas células interactúan con las neuronas y sus sinapsis, los oligodendrocitos, las células progenitoras de oligodendrocitos (OPCs, *oligodendrocyte progenitor cells*), la microglía, diversas células perivasculares, los fibroblastos meníngeos y las células inmunitarias circulantes (Sofroniew, 2020). En el SNC los astrocitos desempeñan

varias funciones clave como el mantenimiento de la homeostasis de los fluidos extracelulares, iones y neurotransmisores (Verkhratsky & Nedergaard, 2018). Proporcionan metabolitos de glucosa como fuentes de energía para las neuronas (Magistretti & Allaman, 2018), regulan el flujo sanguíneo local (Macvicar & Newman, 2015), contribuyen al drenaje del líquido intersticial (Macvicar & Newman, 2015) y juegan un papel crucial en el desarrollo y la plasticidad sináptica (Allen & Eroglu, 2017). Además, exhiben actividades dinámicas que son esenciales para el funcionamiento de los circuitos neuronales, la función neurológica y el comportamiento (Allen & Eroglu, 2017). Los astrocitos también desempeñan un papel fundamental en el control metabólico tanto en situaciones fisiológicas como patológicas (Argente-Arizón et al., 2017). Junto con los vasos sanguíneos y las neuronas, los astrocitos forman una unidad sensorial que facilita la comunicación metabólica entre el SNC y la periferia. Los astrocitos desempeñan un papel en la regulación de la entrada de nutrientes al cerebro, actuando como sensores metabólicos y promoviendo la supervivencia neuronal y el equilibrio del SNC (Abbott et al., 2010; Wang et al., 2014) (Figura 10).

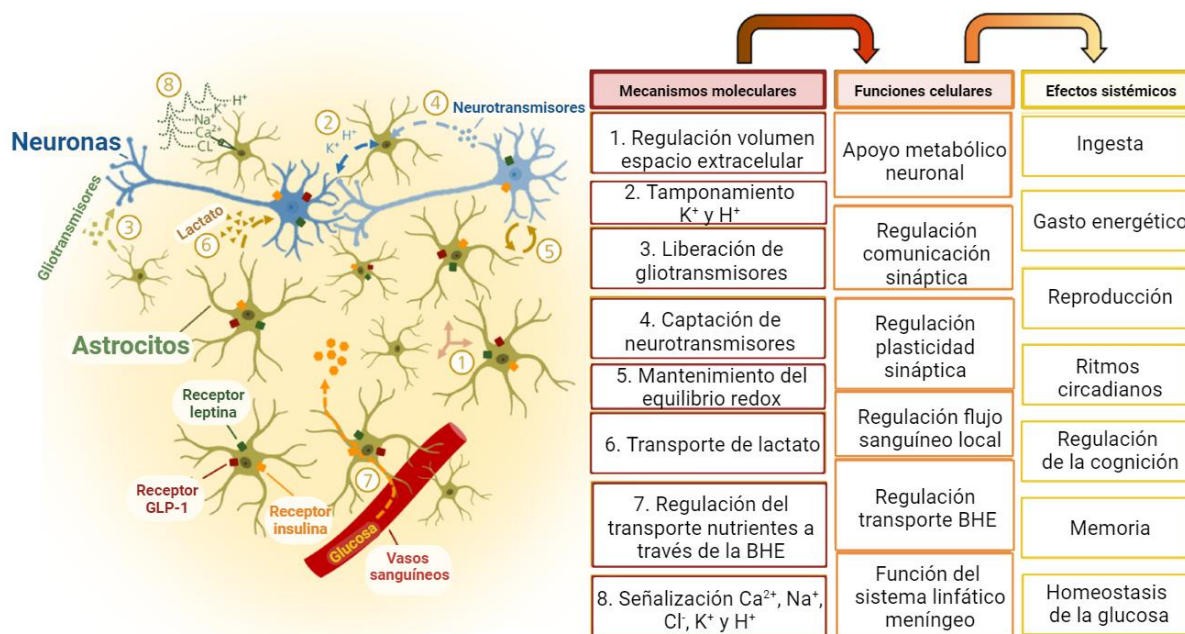


Figura 10. Mecanismos moleculares de los astrocitos asociados a los procesos metabólicos celulares y sistémicos en los que participan. El transporte de lactato por parte de los astrocitos es un importante mecanismo de apoyo metabólico neuronal. En este proceso, la captación de glucosa va unida a la liberación de lactato desde los astrocitos para ser luego absorbido por las neuronas. Los astrocitos regulan la comunicación sináptica y la homeostasis mediante la captación de neurotransmisores del espacio sináptico, el tamponamiento de K^+ y H^+ , el mantenimiento del equilibrio redox y la liberación de gliotransmisores. Además, los astrocitos se comunican con otros astrocitos y con las neuronas a través de ondas de Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- y H^+ . El estrecho contacto de los astrocitos con los vasos sanguíneos cerebrales les permite regular el transporte de nutrientes al cerebro. Todo ello ha permitido situar a los astrocitos como actores centrales en la regulación de diversas funciones metabólicas como la ingesta, la homeostasis de la glucosa, el gasto energético, los ritmos circadianos, además de estar involucrados en la regulación de la cognición, de la memoria y de la reproducción. (Adaptado de González-García et al., 2021). Licencia Creative Commons.

3.4.1 ASTROCITOS COMO MEDIADORES DE LAS SEÑALES HORMONALES

Los astrocitos desempeñan un papel importante en la transducción de señales hormonales, ya que expresan receptores para hormonas relacionadas con el control de la ingesta de alimentos, como la leptina, la grelina y la insulina, y responden a estas hormonas (Argente-Arizón et al., 2017) (Figura 10). Muchos de estos factores hormonales y metabólicos influyen en la morfología y las funciones de los astrocitos, incluyendo la producción de citoquinas y otros factores, así como el transporte de nutrientes y neurotransmisores (Fuente-Martín et al., 2013; García-Cáceres et al., 2011, 2016).

Un ejemplo destacado de los efectos hormonales y metabólicos en los astrocitos es la influencia de la leptina en los astrocitos hipotalámicos. La leptina tiene impactos significativos en su morfología y funciones (García-Cáceres et al., 2011; Kim et al., 2014). Esto se refleja en cambios en la longitud y el número de las proyecciones asociados. Estas alteraciones están relacionadas con la expansión de la cobertura astrocítica y ajuste del número y la proporción de las conexiones sinápticas en las neuronas locales (Horvath et al., 2010; Kim et al., 2014). Estas modificaciones en la morfología de los astrocitos podrían ser cruciales para la adaptación de los circuitos neuronales hipotalámicos a nuevas condiciones metabólicas, como se observa en las etapas iniciales de la ingesta de dieta alta en grasas (Buckman et al., 2015). Sin embargo, cuando situaciones adversas se prolongan en el tiempo, como el consumo prolongado de una dieta alta en grasas o la obesidad crónica, las modificaciones en los astrocitos podrían tener implicaciones patológicas (Argente-Arizón et al., 2017). Por ejemplo, los astrocitos responden tanto a la leptina como a la grelina, pero los efectos de estas hormonas en la síntesis y liberación de citoquinas y glutamato, así como el transporte de glucosa, pueden variar con la duración de la exposición, conduciendo a efectos opuestos en situaciones a corto y largo plazo (Fuente-Martín et al., 2012; García-Cáceres et al., 2011).

La importancia de la señalización hormonal en los astrocitos se destacó en un estudio en modelos animales modificados genéticamente. La ablación del receptor de leptina (Ob-R) específicamente en astrocitos altera la organización sináptica del sistema de melanocortina (Kim et al., 2014). La ausencia de Ob-R resulta en una disminución en el número y la longitud de las proyecciones astrocíticas, lo que se relaciona con una menor cobertura de las neuronas POMC y cambios en la actividad eléctrica de las neuronas POMC y AgRP (Kim et al., 2014). Estos cambios anatómicos y funcionales están asociados con una atenuación de la respuesta anorexigénica a la leptina y un aumento de la respuesta al ayuno inducida por la grelina. Además, cuando ratones KO de Ob-R en astrocitos son alimentados con una dieta alta en grasas, muestran resistencia a la hiperleptinemia provocada por la obesidad inducida por la dieta (Jayaram et al., 2013). Adicionalmente, la generación de modelos animales en los cuales se deleta el receptor de insulina (IR, *insulin receptor*) en los astrocitos, ya sea en todo el cerebro o de manera específica en la región mediobasal del hipotálamo, ha demostrado que la función de la insulina en los astrocitos está directamente relacionada con la entrada de glucosa en el cerebro y con la detección sistémica de los niveles de glucosa (García-Cáceres et al., 2016; González-García et al., 2021).

También se ha demostrado que los astrocitos disminuyen la ingesta inducida por la grelina al regular los niveles extracelulares de adenosina, lo que a su vez impacta en la actividad de neuronas AgRP (Yang et al., 2015). Asimismo, la grelina puede actuar directamente sobre los astrocitos hipotalámicos. Éstos no solo expresan receptores para esta hormona orexigénica (Baquedano et al., 2013; Fuente-Martín et al., 2016), sino que también se ha observado que la grelina altera la capacidad de los astrocitos para transportar glutamato y glucosa. Además, esta hormona también influye en la expresión de enzimas como la glutamina sintetasa, la lactato deshidrogenasa y la glucógeno fosforilasa, así como en los transportadores de lactato (Fuente-Martín et al., 2016). Estos hallazgos sugieren un impacto directo de la grelina en el metabolismo del glutamato y los carbohidratos en los astrocitos (Argente-Arizón et al., 2017).

3.4.2 ASTROCITOS COMO SENSORES DE NUTRIENTES

A pesar de que el cerebro demanda un alto consumo de energía, su capacidad para almacenar glucosa o energía es limitada y se encuentra restringida a los astrocitos. A diferencia de las neuronas, los astrocitos tienen la capacidad de almacenar glucosa en forma de glucógeno, utilizando el lactato como fuente energética para mantener su propia función (González-García & García-Cáceres, 2021) (Figura 10). Además de su papel en el almacenamiento de energía, los astrocitos también actúan como sensores de glucosa. Esto se demostró en estudios donde la inhibición del transportador de glucosa 2 (GLUT2, *glucose transporter 2*) en el área preóptica del hipotálamo alteraba la detección de glucosa, afectando la respuesta a la inyección de glucosa en la arteria carótida interna (Leloup et al., 1998). Asimismo, se ha observado que, en el hipotálamo, GLUT2 se expresa predominantemente en astrocitos (Arluison et al., 2004; Leloup et al., 1994). Estudios en ratones con delección global de GLUT2 confirmaron la importancia de los astrocitos en la detección central de la glucosa, ya que presentaban niveles elevados de glucagón en sangre y una menor respuesta en la liberación de glucagón ante cambios en los niveles sistémicos de glucosa, un fenotipo que refleja la importancia de GLUT2 en astrocitos en la respuesta contrarreguladora a la hipoglucemia (Marty et al., 2005). Además, los astrocitos hipotalámicos también participan en el mecanismo de detección de glucosa a través de GLUT1 en ratas tratadas con estreptozotocina (STZ, *streptozotocin*), un inductor de diabetes en roedores. La restauración de GLUT1 en astrocitos hipotalámicos de ratas diabéticas con niveles reducidos de GLUT1, normalizó los niveles de glucosa en sangre y restauró la detección hipotalámica de glucosa (Chari et al., 2011). A través de estos receptores los astrocitos capturan y almacenan glucosa en forma de glucógeno, a partir del cual producen lactato que es transferido a las neuronas como fuente de energía (García-Cáceres et al., 2012). El lactato se transporta mediante transportadores de monocarboxilato (MCT, *monocarboxylate transporter*), entre los cuales MCT1 y MCT4 se expresan en los astrocitos, permitiéndoles participar en la regulación de la concentración de lactato (Bergersen, 2007; Bergersen & Gjedde, 2012). De hecho, se ha observado que las neuronas productoras de orexina (OX, *orexin*) dependen del lactato derivado de los astrocitos para su actividad (Parsons & Hirasawa, 2010). Otros tipos de

carbohidratos también pueden tener un impacto directo en los astrocitos (Argente-Arizón et al., 2017). Por ejemplo, la fructosa ha sido identificada como un factor que induce la astrogliosis hipotalámica (Li et al., 2015). A pesar de que la ingesta elevada de sacarosa se ha asociado con la inflamación en el hipotálamo, no se ha observado una relación directa con la astrogliosis (Fuente-Martín et al., 2013). Esto sugiere que la respuesta de los astrocitos podría variar dependiendo del tipo de carbohidrato consumido en exceso. Sin embargo, se requieren más investigaciones para comprender los mecanismos subyacentes de estas respuestas diferenciales y su relación con los resultados metabólicos finales (Argente-Arizón et al., 2017).

En cuanto a la detección de lípidos, los astrocitos tienen la capacidad de almacenar y captar lípidos mediante diversos transportadores, siendo la lipoproteína lipasa (LPL, *lipoprotein lipase*), la de mayor relevancia (González-García & García-Cáceres, 2021). La eliminación de la LPL en astrocitos postnatales, induce un fenotipo obesogénico con aumento de peso corporal e intolerancia a la glucosa en respuesta a una dieta rica en grasas (Gao et al., 2017). Estos ratones también muestran mayor acumulación de ceramidas, un fenómeno presente en procesos neurodegenerativos inducidos por lipotoxicidad (Chaurasia & Summers, 2015; González-García et al., 2017). En condiciones ricas en ácidos grasos saturados, estudios *in vitro* han demostrado que los astrocitos hipotalámicos acumulan gotas lipídicas, adoptando simultáneamente un perfil inflamatorio reactivo (Kwon et al., 2017). En contraste, los ácidos grasos no saturados no inducen este tipo de respuesta inflamatoria en los astrocitos (Morselli et al., 2014; Valdearcos et al., 2014). En consecuencia, las señales liberadas por los astrocitos hacia las neuronas vecinas están influenciadas por el tipo específico de nutriente percibido por estas células gliales, lo cual, a su vez, afecta a la señalización metabólica neuronal (Argente-Arizón et al., 2017). Además de su función en la homeostasis lipídica, los astrocitos desempeñan un papel clave en la oxidación de ácidos grasos, ya que son responsables de sintetizar la mayor parte de los cuerpos cetónicos en el SNC. La exposición a corto plazo a una dieta hipercalórica se asocia con mayores niveles de cuerpos cetónicos derivados de astrocitos en el hipotálamo, lo que se relaciona con una reducción aguda en la ingesta de alimentos (González-García & García-Cáceres, 2021). Estudios *in vitro* e *in vivo* indican que los astrocitos desempeñan un papel clave en el mantenimiento de una regulación precisa de la homeostasis lipídica hipotalámica, lo cual es esencial para lograr un control metabólico adecuado (Le Foll et al., 2014; Valdebenito et al., 2016).

3.5 FUNCIONES DE LOS ASTROCITOS EN EL SISTEMA CIRCADIANO

El cerebro humano contiene más de 100 billones de células, muchas de ellas siendo células gliales, que funcionan de manera coordinada por medio del reloj endógeno. Los astrocitos han permanecido durante mucho tiempo a la sombra de las neuronas, ya que se consideraba que desempeñaban principalmente un papel de soporte estructural y nutricional. Sin embargo, actualmente se sabe que los astrocitos regulan numerosas actividades cruciales para el correcto funcionamiento del SNC. Una de estas funciones clave es la cooperación con

elementos neuronales presinápticos y postsinápticos para regular los eventos de comunicación. En este contexto, los astrocitos no solo participan en la transmisión y el procesamiento de señales neuronales, sino que también influyen en la modulación de la actividad sináptica y en la plasticidad neuronal. Su interacción con las neuronas en esta sinapsis tripartita es un componente esencial para el correcto funcionamiento del SNC (Allen & Barres, 2009; Pfrieger & Barres, 1997). En los últimos años, se ha demostrado que los astrocitos desempeñan un papel fundamental en la generación de los ritmos circadianos y en la coordinación de los relojes periféricos y, por ende, en el comportamiento circadiano a nivel de todo el organismo (Barca-Mayo et al., 2017, 2020; Brancaccio et al., 2017, 2019; Tso et al., 2017).

3.5.1 CONTRIBUCIÓN DE LOS GENES RELOJ DE LOS ASTROCITOS AL SISTEMA CIRCADIANO

El SCN contiene una notable presencia de astrocitos, los cuales, al igual que las neuronas, poseen TTFLs activos (Barca Mayo et al., 2019; Barca-Mayo et al., 2017; Brancaccio et al., 2017, 2019; Prolo et al., 2005; Tso et al., 2017). Un hecho intrigante es que los relojes astrocíticos operan en fases opuestas en comparación con los relojes neuronales. Esto se evidencia en la expresión circadiana de CRY1, donde el pico de expresión circadiana de CRY1 en los astrocitos se retrasa aproximadamente 7 horas en comparación con su pico en las neuronas del SCN (Brancaccio et al., 2019). Adicionalmente, la actividad de los astrocitos, medida mediante el ciclo circadiano del Ca^{2+} intracelular, alcanza su punto máximo durante la noche, a diferencia de las neuronas, cuyo pico de actividad del Ca^{2+} se presenta durante el día circadiano (Brancaccio et al., 2017). Este patrón contrastante sugiere que el SCN está compuesto por neuronas que están más activas durante el día y astrocitos más activos durante la noche. Esta observación señala hacia una relación de inhibición recíproca entre ambos tipos celulares, donde su actividad opuesta podría desempeñar un papel crucial en la sincronización y regulación de los ritmos circadianos en el marcapasos central (Patton & Hastings, 2023). En última instancia, esta compleja interacción entre neuronas y astrocitos en el SCN contribuye de manera significativa a la coordinación precisa de los ritmos circadianos y a la funcionalidad adecuada del sistema circadiano en su conjunto (Figura 11).

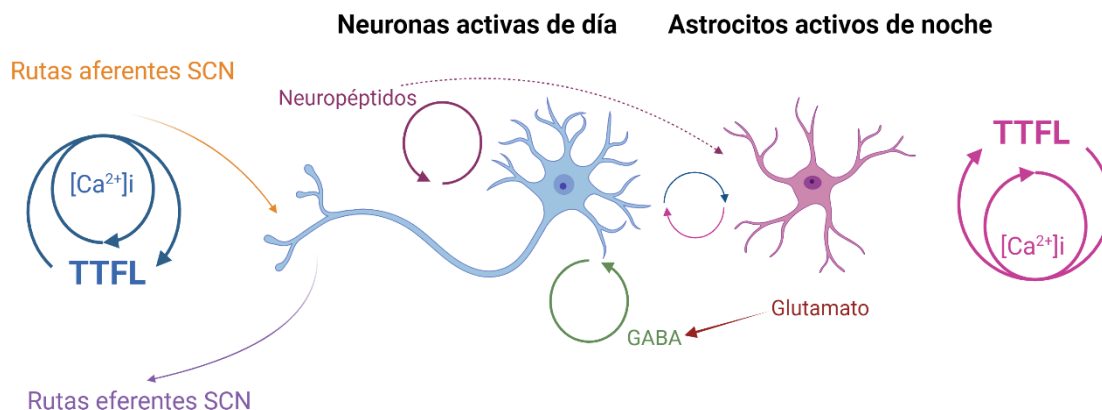


Figura 11. Las interacciones entre neuronas y astrocitos regulan el correcto funcionamiento del SCN. Tanto las neuronas (azul) como los astrocitos (magenta) contienen un TTFL, pero sus ritmos de actividad celular, evidenciados por los ritmos del Ca^{2+} intracelular, tienen fases opuestas (neuronas activas de día y astrocitos activos de noche). La sincronización de la red neuronal del SCN se logra mediante neuropéptidos y GABA, mientras que los astrocitos transmiten señales, principalmente a través del glutamato (y posiblemente otras señales, representada por la flecha magenta), para regular los ritmos neuronales. Del mismo modo, las señales neuronales (aún por identificar, representadas en azul y posiblemente incluyendo neuropéptidos, línea discontinua) proporcionan información circadiana a los astrocitos. Esta comunicación recíproca desempeña un papel crucial en la regulación adecuada del sistema circadiano. Las señales aferentes que llegan a las neuronas desde fuera del NQS determinan la fase y el período, mientras que las señales eferentes neuronales transmiten la información temporal a otras regiones cerebrales. (Adaptado de Patton & Hastings, 2023). Licencia Creative Commons.

Estudios genéticos que manipulan exclusivamente el reloj molecular en los astrocitos han proporcionado pruebas sólidas de su capacidad para funcionar como marcapasos en el sistema circadiano. La delección de *Bmal1* en astrocitos, por ejemplo, tiene diversos efectos:

- (1) **Período de actividad locomotora:** Alarga el período de la actividad locomotora al alterar la señalización GABAérgica y glutamatérgica (Barca-Mayo et al., 2017; Brancaccio et al., 2017, 2019; Tso et al., 2017).
- (2) **Impacto en la retina:** altera la organización del patrón de expresión rítmica de los genes del reloj de la retina, afectando la función retiniana (Riccitelli et al., 2022).
- (3) **Ciclos metabólicos y homeostasis energética:** conlleva cambios notables en los ciclos metabólicos y la homeostasis energética, revelando un interesante dimorfismo sexual en sus efectos, con impactos diferenciados entre machos y hembras (Luengo-Mateos et al., 2023).

Curiosamente, la manipulación genética tanto de activadores (BMAL1) como de represores (CRY1) del TTFL alarga la duración de los ritmos circadianos, aumentando su periodicidad. Este fenómeno se replica en estudios que emplean la mutación en el alelo Tau de la caseína quinasa 1 epsilon (*CK1ε Tau*, *Tau allele of the kinase CK1ε*) en astrocitos. La

alteración en el exón 4 del gen *CK1ε* provoca la degradación de las proteínas PER, acelerando el reloj molecular y llevando a ritmos circadianos con una periodicidad de 20 horas en ratones homocigotos *CK1ε^{tau/tau}* (Meng et al., 2008). La reversión de este fenotipo, mediante la recombinasa Cre, resulta en ratones *CK1ε^{+/-}* o *CK1ε^{-/-}* con períodos de aproximadamente 24 horas (Meng et al., 2008). Es particularmente interesante destacar que la eliminación de la mutación *CK1ε Tau* en los astrocitos del SCN prolonga el período de los ratones mutantes (Tso et al., 2017). Este hallazgo es sorprendente, ya que el alargamiento del período en una subpoblación de neuronas del SCN no necesariamente conduce a ritmos conductuales más extensos. De manera llamativa, la supresión de *CK1ε Tau* en los astrocitos es suficiente para incrementar el período conductual en 1,5 horas. En consecuencia, los relojes circadianos de los astrocitos en el SCN parecen desempeñar un papel más significativo que algunas neuronas del SCN en la determinación de la periodicidad de los ritmos circadianos (Tso et al., 2017).

En conjunto, la delección de *BMAL1*, *CRY1* o el rescate de la mutación *CK1ε Tau* en los astrocitos del SCN resultaron en un alargamiento del período muy similar tanto *in vitro* como *in vivo*. Este hecho sugiere que cualquier alteración genética o ambiental de los ritmos circadianos en los astrocitos podría afectar a los ritmos conductuales. En resumen, estos estudios destacan el papel fundamental del reloj circadiano de los astrocitos en la regulación de los comportamientos diarios (Tso et al., 2017).

Un ejemplo destacado de la función circadiana de los astrocitos del SCN se evidencia en su capacidad para iniciar la oscilación *de novo* en ratones que carecen de los genes *Cry1* y *Cry2* (Maywood et al., 2018). La eliminación global de *CRY1* y *CRY2* desactiva el TTFL, lo que lleva a la pérdida de los ritmos circadianos (Horst et al., 1999). La restauración de *CRY1* en astrocitos de este modelo de ratón arrítmico restauró los ciclos del TTFL, los ritmos de Ca^{2+} intracelular, la actividad diurna neuronal en el SCN (aun cuando las neuronas carecen de *Cry1* y *Cry2*) y el comportamiento circadiano (actividad locomotora) (Brancaccio et al., 2019). Curiosamente, cuando se compararon estos resultados con los obtenidos tras la complementación de *Cry1* en las neuronas, se observó que los astrocitos tardaban más que las neuronas en iniciar los ritmos del SCN *de novo* y cambiar su período. Esto es consistente con la opinión de que los astrocitos del SCN regulan la función neuronal mediante mecanismos indirectos de modulación de la actividad sináptica, como el ya comentado mecanismo que involucra al glutamato extracelular, mientras que las neuronas tienen acceso inmediato a sus redes sinápticas (Patton & Hastings, 2023).

En resumen, estas evidencias respaldan la idea de que los astrocitos son capaces de generar e imponer estos ritmos a las neuronas, situándolos en la cúspide de la jerarquía del sistema circadiano (Figura 12).

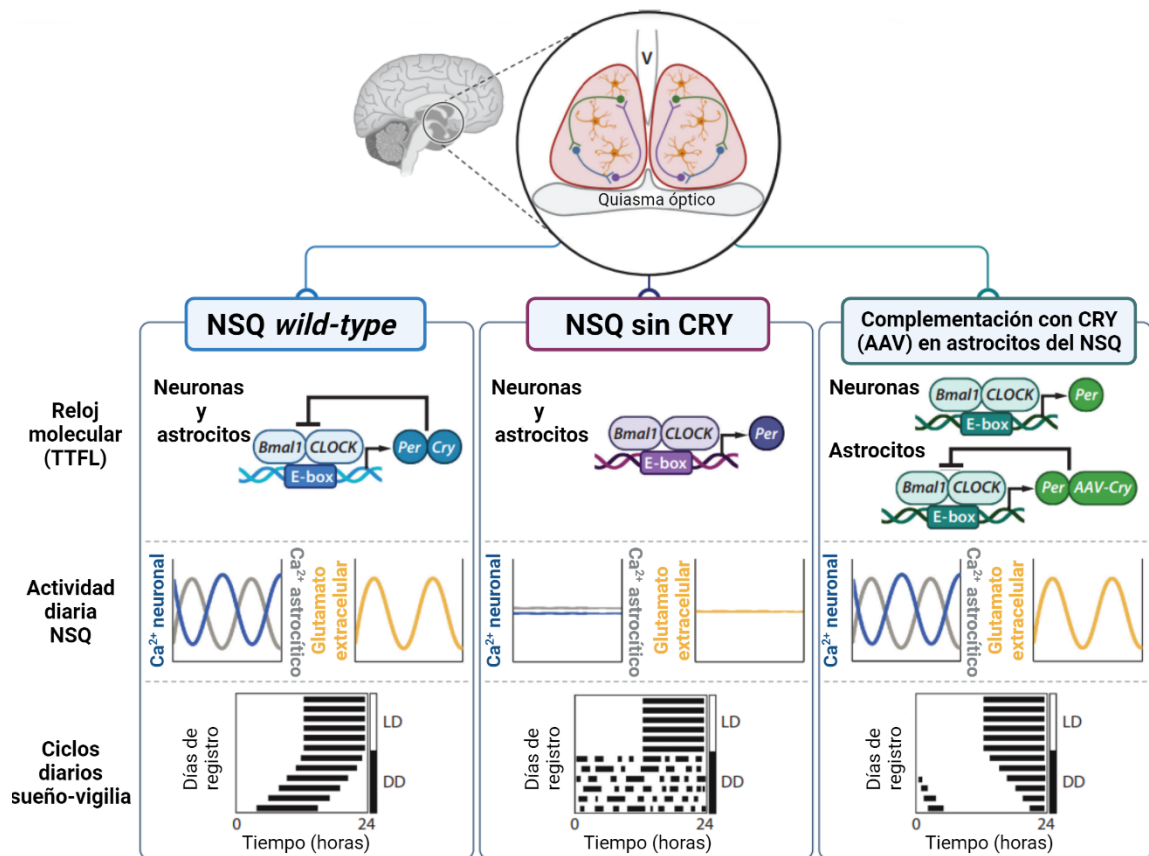


Figura 12. Control astrocítico del sistema circadiano. En la parte superior se muestra una representación esquemática de los relojes moleculares de neuronas y astrocitos, mientras que en la sección media se ilustran los ciclos circadianos de Ca^{2+} intracelular en ambos tipos celulares, así como el glutamato extracelular en el SCN. En la parte inferior, se presentan actogramas que representan los ciclos de reposo/actividad en ratones sometidos a ciclos de luz/oscuridad (LD) y a oscuridad constante (DD). En la columna izquierda, se observa la condición de ratones *wild-type*, donde el reloj molecular está intacto, los ritmos de Ca^{2+} y glutamato son pronunciados, y el control circadiano de los ciclos de reposo/actividad es robusto. En el centro, se representa la condición de ratones que carecen de proteínas CRY, mostrando un TTFL inactivo, la pérdida de ritmos de Ca^{2+} y glutamato, y la falta de ritmicidad en los ciclos de reposo/actividad. En la columna derecha, se destaca la condición en la cual CRY1 se restablece solo en los astrocitos del SCN en ratones deficientes en CRY1. En esta situación, se activa el TTFL, restableciendo los ritmos de Ca^{2+} y glutamato en los astrocitos, así como el Ca^{2+} neuronal. Este control dependiente de los astrocitos es suficiente para mantener el comportamiento circadiano de los ratones (Adaptado de Hastings et al., 2023). Licencia Creative Commons.

3.5.2 OTRAS FUNCIONES DE LOS ASTROCITOS EN EL SISTEMA CIRCADIANO

Además de su función en la comunicación neuronal local, los astrocitos establecen conexiones entre sí mediante uniones GAP, permitiéndoles un acoplamiento metabólico o bioquímico en extensas redes que pueden abarcar distancias de 4 a 30 astrocitos (Sul et al., 2004; Tian et al., 2006). Esta característica no solo implica una influencia en la comunicación

dentro de redes neuronales cercanas, sino también la capacidad de propagar información a regiones distantes del cerebro, tanto en términos espaciales como temporales (Giantomasi et al., 2023). Pero los astrocitos no solo influyen en la comunicación neuronal local a través de uniones GAP, sino que también pueden transmitir señales a larga distancia y sincronizar poblaciones neuronales distantes, lo que destaca su papel en la regulación de los ritmos circadianos y la comunicación interneuronal (Giantomasi et al., 2023). Sin embargo, en el SCN los astrocitos no solo desempeñan un papel en la comunicación neuronal, sino que también exhiben patrones rítmicos de reorganización estructural (Becquet et al., 2008). Así, la expresión de GFAP muestra un patrón rítmico específico, con niveles más altos durante el día circadiano (Monique & Servière, 1993; Servière & Lavialle, 1996), lo que facilita una cobertura diferenciada a lo largo del ciclo día/noche para las neuronas que liberan VIP, lo que modula la respuesta de estas neuronas a las señales lumínicas, contribuyendo así a la regulación del ritmo circadiano (Girardet et al., 2010). Pero el papel de los astrocitos también se extiende a la regulación del espacio extracelular (Iloff et al., 2012; Mendelsohn & Larrick, 2013; Murlidharan et al., 2016; Taoka et al., 2018), facilitando el intercambio de solutos entre el líquido cefalorraquídeo y el espacio intersticial, conocido como sistema glinfático (Barca-Mayo & López, 2021). Dado que la difusión de las señales del SCN es suficiente para preservar el comportamiento rítmico (Lesauter & Silver, 1998; Maywood et al., 2011), los cambios diarios en el sistema glinfático pueden subyacer a la sincronización entre diferentes regiones cerebrales a lo largo del ciclo circadiano (Maywood et al., 2011).

4 AMPK COMO SENSOR ENERGÉTICO

La regulación de la homeostasis energética en organismos heterótrofos, como mamíferos, es un proceso complejo que involucra diversos factores y señales. En estos organismos, la energía liberada durante la oxidación de biomoléculas como carbohidratos, lípidos y proteínas se almacena en forma de ATP. Por otro lado, los procesos metabólicos que consumen ATP convierten este nucleótido trifosfato en sus precursores (ADP, AMP y grupos fosfato), lo que resulta en un aumento de las proporciones de AMP:ATP y ADP:ATP durante los procesos de consumo de energía (López et al., 2016). En respuesta a esto, las células han evolucionado para desarrollar un eficaz mecanismo de detección basado en estas proporciones, centrado en, AMPK, considerada el principal sensor energético de las células eucariotas (Carling et al., 1987; Hardie et al., 2012; López et al., 2016).

4.1 ESTRUCTURA DE AMPK

AMPK, una quinasa de serina/treonina, está altamente conservada en diferentes especies eucariotas a lo largo de la evolución, incluyendo protistas, plantas, hongos y animales (Carling et al., 2011; Hardie, 2014; López, 2018). A nivel molecular, es un complejo heterotrimérico compuesto por una subunidad catalítica, la subunidad α , de la cual existen dos variantes ($\alpha 1$ y $\alpha 2$), dos subunidades reguladoras, denominadas β (con variantes $\beta 1$ y $\beta 2$) y la subunidad γ (con variantes $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$) (Figura 13). Estas subunidades son codificadas por genes distintos y pueden combinar de diversas maneras, dando lugar a la formación de hasta 12 complejos heterotriméricos de AMPK posibles (López et al., 2016).

La subunidad α contiene un dominio quinasa en su extremo N-terminal y un dominio regulador en su extremo C-terminal, que es necesario para la interacción con las subunidades β y γ (Xiao et al., 2013). La subunidad β actúa como un puente de unión entre la subunidad α y la γ a través de su dominio C-terminal, y contiene un dominio de unión a glucógeno denominado módulo de unión a carbohidratos (CBM, *carbohydrate-binding module*) (García & Shaw, 2017; Huynh et al., 2016; Lin & Hardie, 2018). Por otro lado, la subunidad γ posee cuatro dominios de la cistationina β -sintasa (CBS; *cystathione β -synthase domains*) que forman los cuatro sitios de unión a AMP, ADP o ATP (García & Shaw, 2017; Lin & Hardie, 2018).

4.2 REGULACIÓN DE AMPK

La regulación de AMPK es fundamental para mantener la homeostasis energética celular. AMPK se activa mediante la fosforilación de la treonina 172 (Thr-172) en la subunidad catalítica α , un proceso que puede inducirse alostéricamente mediante la unión de AMP (pero no de ADP) a la subunidad γ . Además, tanto AMP como ADP pueden aumentar la fosforilación de AMPK a través de la quinasa hepática B1 (LKB1, *liver kinase B1*) (Hardie, 2013; Woods et al., 2003) y la calcio/calmodulina quinasa 2 (CaMKK2, *calcium/calmodulin dependent protein kinase kinase 2*) (Hawley et al., 2005; Woods et al., 2005) y proteger contra la defosforilación por las fosfatasas. AMPK también se activa mediante un aumento de Ca^{2+} intracelular mediado por CaMKK2. Además, se ha descrito un mecanismo independiente de AMP/ADP que en situaciones de bajos niveles de glucosa promueve la activación de AMPK mediante un mecanismo que implica una disminución de la unión de fructosa 1,6-bifosfato (FBP, *fructose 1,6-biphosphate*) a la aldolasa. Esto promueve la interacción entre AMPK y LKB1 mediante la unión a la axina en el lisosoma, lo que da lugar a la fosforilación y activación de AMPK (Zhang et al., 2017). Aparte de LKB1 y CaMKK2, se han descubierto otras quinasas que activan AMPK a través de su fosforilación, incluyendo la quinasa 1 activada por el factor de crecimiento transformante β (TAK1, *transforming growth factor- β -activated kinase 1*) (Momcilovic et al., 2006) y la quinasa supresora de Ras (KSR2, *kinase suppressor of Ras*) (Costanzo-Garvey et al., 2009). La unión de AMP o ADP a la subunidad γ no solo induce la fosforilación de Thr172, sino que también induce un cambio conformacional que impide la defosforilación de esta treonina por parte de proteínas fosfatasas (Gowans et al., 2013; Xiao et al., 2011). Una de estas proteínas fosfatasas es la proteína fosfatasa 1A (conocida comúnmente como proteína fosfatasa 2C o PP2C α) (López et al., 2016; Salminen et al., 2016). Adicionalmente, se ha propuesto un mecanismo de regulación de AMPK independiente de AMP mediante procesos de fosforilación/defosforilación. Cuando se asocian con la subunidad β de AMPK y el efector A inductor de muerte celular por fragmentación de DNA (CIDEA, *cell death-inducing DNA fragmentation factor- α -like effector A*), se induce la degradación de AMPK mediante su ubiquitinación (Qi et al., 2008).

Se han identificado diversas mutaciones en AMPK que destacan la función de esta proteína en el mantenimiento de la fisiología (Carling, 2004). Las únicas mutaciones en cualquiera de los siete genes que codifican subunidades de AMPK y que se han demostrado causantes de patologías en el ser humano son las mutaciones en PRKAG2, el gen que codifica la subunidad $\gamma 2$ de AMPK (Hardie, 2004). Estas mutaciones están asociadas con varios trastornos cardíacos como preexcitación ventricular, acumulación excesiva de glucógeno en los cardiomiocitos e hipertrofia cardíaca (Salt & Hardie, 2017). Aunque son raras, las mutaciones de *Prkag2* tienen un efecto autosómico dominante y, por lo tanto, son comunes en las familias afectadas. Estas mutaciones son el resultado de sustituciones de aminoácidos, y se han descrito al menos 14 de ellas (Salt & Hardie, 2017), aunque aún no se ha aclarado el efecto de cada una en la actividad de AMPK (Miyamoto, 2018). Los residuos afectados están perfectamente conservados entre las subunidades $\gamma 1$, $\gamma 2$ y $\gamma 3$, y se encuentran en o entre los cuatro dominios CBS, los cuales interactúan con AMP, ADP o ATP (Salt & Hardie, 2017). Por lo tanto, estas mutaciones alteran la afinidad por AMP y ATP, explicando así los complicados efectos sobre la actividad de AMPK (Miyamoto, 2018). Curiosamente, seis de

INTRODUCCIÓN

las mutaciones (R302Q, H383R, H384T, H530R, R531G y R531Q) afectan a residuos cuyas cadenas laterales interactúan directamente con los grupos fosfato de una o más moléculas de AMP o ATP, mientras que otras dos también interactúan directa (S548) o indirectamente (T400) con AMP (Xiao et al., 2007).

La disminución de la unión de AMP a la subunidad γ provoca una disminución de la activación por AMP, representando un claro efecto de pérdida de función. Sin embargo, debido a que las mutaciones impactan tanto en la unión del nucleótido inhibidor (ATP) como del nucleótido activador (AMP) (Scott et al., 2004), la explicación más probable es que disminuyan la unión del ATP y, por ende, aumenten la fosforilación de la Thr172 y la actividad de AMPK, generando un efecto de ganancia de función (Salt & Hardie, 2017). Este fenómeno se ha confirmado directamente en los mutantes R531G y R531Q (Burwinkel et al., 2005; Hawley et al., 2010), así como en las mutaciones T400N y N488I (Arad et al., 2002, 2003). Dado que estas mutaciones son dominantes, es probable que sea el efecto de ganancia de función, el aumento de la actividad basal, el responsable de la mayor parte de la patología. Por otro lado, es posible que el efecto de pérdida de función sea compensado por la isoforma γ_1 , la cual es la principal isoforma expresada en el corazón en roedores (Cheung et al., 2000). La identificación de mutaciones en PRKAG2, que se caracterizan por aumentar la actividad de AMPK y provocar enfermedades cardíacas, ofrece la oportunidad de explorar las consecuencias metabólicas de la activación de AMPK tanto en ratones como en seres humanos (Blair, 2001; Folmes et al., 2009; Yavari et al., 2016).

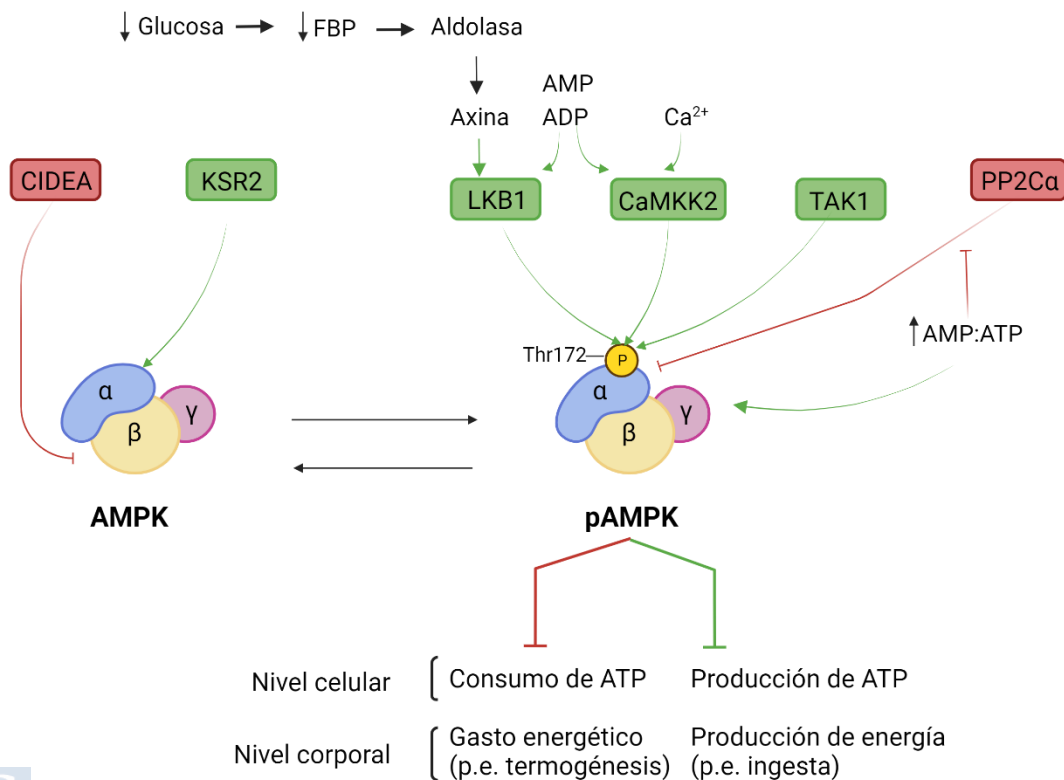


Figura 13. Mecanismos de regulación de AMPK. Creado con Biorender.com.

4.3 AMPK HIPOTALÁMICA Y REGULACIÓN DE LA INGESTA

AMPK desempeña un papel clave en el control de los flujos de energía en todo el organismo. Dicho control se consigue regulando el metabolismo de lípidos y glucosa, así como la acción hormonal, en órganos metabólicos clave como el hígado, las células β pancreáticas, el WAT, el BAT, el músculo esquelético y el corazón (Carling et al., 2011; Hardie et al., 2012). Además, en el cerebro, AMPK controla el equilibrio energético de todo el organismo al actuar en el hipotálamo (López, 2018, 2022; López et al., 2016). AMPK está altamente expresada en el hipotálamo, donde las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$ y $\gamma 2$ se encuentran en los núcleos ARC, VMH, PVH, LHA y DMH (López et al., 2016; Sjöstedt et al., 2020). La regulación de AMPK en el hipotálamo es un componente crucial de los ajustes adaptativos observados durante la regulación fisiológica de la ingesta. Durante el ayuno, se produce un aumento de la actividad de AMPK hipotalámica, mientras que durante la ingesta se observa su inhibición (Minokoshi et al., 2004). En este contexto, la activación de AMPK en el hipotálamo, por ejemplo, mediante el uso de adenovirus que expresan una forma constitutivamente activa de AMPK, provoca un aumento en la ingesta y en la ganancia de peso corporal (López et al., 2010, 2016). Por el contrario, la inhibición de AMPK hipotalámica mediante adenovirus que expresan una forma dominante negativa de AMPK resulta en la pérdida de peso (López et al., 2010, 2016).

AMPK hipotalámica desempeña un papel fundamental en el control central de la ingesta de alimentos al mediar los efectos de señales periféricas, tanto nutricionales como hormonales. Además de su regulación por estímulos periféricos, numerosos metabolitos también influyen en la función de AMPK en el hipotálamo. Estos incluyen la glucosa (Kim et al., 2004; Minokoshi et al., 2004), el ácido α -lipólico (Kim et al., 2004), los ácidos grasos (Gomez-Pinilla & Ying, 2010; Martin et al., 2006), el citrato (Stoppa et al., 2008) y el lactato (Cha & Daniel Lane, 2009). Estos metabolitos pueden inducir respuestas anorexigénicas al inhibir AMPK, activar la acetil-CoA carboxilasa y el aumento de la concentración de malonyl-CoA, el que a su vez actúa como una señal anorexigénica en las neuronas hipotalámicas.

La principal función de AMPK en el hipotálamo es la integración de señales hormonales. Tanto las hormonas orexigénicas como anorexigénicas convergen en la AMPK hipotalámica para modular el apetito (López et al., 2016). Es notable que, aunque los principales factores que reducen el apetito actúan como inhibidores en el hipotálamo, la mayoría de las hormonas que incrementan el apetito activan AMPK (Lage et al., 2008) (Figura 14). En situaciones de ayuno, hormonas orexigénicas como la grelina (Al Massadi et al., 2017, 2019; Müller et al., 2015), la adiponectina (Martínez De Morentin et al., 2014), los glucocorticoides (Shimizu et al., 2008), los cannabinoides (Kola et al., 2008) y neuropéptidos como la proteína relacionada con agouti (AgRP, *agouti-related peptide*) (Minokoshi et al., 2004) inducen la activación de AMPK, dando lugar a la fosforilación y consiguiente inactivación de ACC, inhibiendo la síntesis de ácidos grasos (López et al., s. f.). Por el contrario, durante la ingesta, hormonas anorexigénicas como la leptina (Andersson et al., 2004; Gao et al., 2007), la insulina (Minokoshi et al., 2004; Namkoong et al., 2005), el glucagón (Quiñones et al., 2015), péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP1, *glucagon-like peptide-1*) (Beiroa et al., 2014; Seo

INTRODUCCIÓN

et al., 2008), estradiol (Martínez De Morentin et al., 2014), CKK (Akieda-Asai et al., 2014), factor neurotrófico ciliar (CNTF, *ciliary neurotrophic factor*) y proteína similar a la angiopoyetina 4 (ANGPTL4, *angiopoietin-related protein 4*) (Kim et al., 2010) inhiben la actividad de AMPK en el hipotálamo. Curiosamente, numerosos agentes farmacológicos con efectos sobre la alimentación, como los agonistas de los receptores de melanocortina (Minokoshi et al., 2004); el C75, que es un inhibidor de la ácido graso sintasa (FAS, *fatty acid synthase*) (Kim et al., 2004) y la nicotina, tengan un efecto de inhibición en la actividad de AMPK hipotalámica (Martínez De Morentin et al., 2012; Seoane-Collazo et al., 2014, 2021). Por el contrario, antipsicóticos como la olanzapina, con efectos orexigénicos e inductores de obesidad, activan AMPK en el hipotálamo (Fernø et al., 2011; Mukherjee et al., 2021; Skrede et al., 2014).

Se han empleado modelos genéticos para demostrar el papel clave de AMPK hipotalámica en la regulación de la homeostasis energética. Sin embargo, es importante destacar que el hipotálamo no es una entidad homogénea, sino una región cerebral compleja con varios núcleos y poblaciones neuronales, cada uno desempeñando funciones específicas en la regulación del comportamiento alimentario y energético (López et al., 2016). En este contexto, la función de la AMPK en el hipotálamo se presenta de manera precisa y diferenciada en cada conjunto de neuronas. Al emplear estrategias como la inhibición de AMPK mediante isoformas dominantes negativas, se ha observado que los efectos de la AMPK varían según el núcleo neuronal en el que esté involucrada. Por ejemplo, la inhibición de AMPK en neuronas que expresan neuropéptidos orexigénicos como AgRP y NPY en el ARC resulta en una disminución de la expresión de los genes relacionados con el apetito (Minokoshi et al., 2004). Sin embargo, cuando la AMPK es sobreexpresada en estas neuronas, se incrementan los niveles de AgRP y NPY durante situaciones de ayuno. Adicionalmente, en otras poblaciones neuronales como las que expresan la hormona concentradora de melanina (MCH) en el LHA, también se observan cambios en la expresión en respuesta a la regulación de AMPK (Al-Massadi et al., 2021; Minokoshi et al., 2004). Estos resultados sugieren que la AMPK hipotalámica actúa de manera precisa y adaptable en cada conjunto de neuronas dentro del hipotálamo para coordinar la regulación del comportamiento alimentario y energético en respuesta a diversos estímulos hormonales y nutricionales. Por ejemplo, la deficiencia de la isoforma $\alpha 2$ de AMPK en las neuronas POMC del ARC conduce a la hiperfagia y la obesidad (Claret et al., 2007), mientras que su deficiencia en neuronas AgRP del ARC resulta en un fenotipo delgado que también está influenciado por la edad (Claret et al., 2007). En resumen, la AMPK hipotalámica actúa de manera altamente específica y diferenciada en función de las poblaciones neuronales y sus interacciones para regular la homeostasis energética de manera precisa y adaptativa.

4.4 AMPK HIPOTALÁMICA Y HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA



Dado que la glucosa constituye la principal fuente de energía para el cerebro, la hipoglucemia puede compensar seriamente su función (Coppari & Bjørbæk, 2012; Morton &

Schwartz, 2011). Las neuronas sensoras de glucosa, ubicadas en áreas clave del cerebro relacionadas con la homeostasis energética y de la glucosa desempeñan un papel crucial en estas respuestas (Song et al., 2001). AMPK hipotalámica también ejerce un papel fundamental en la modulación de estas respuestas (López et al., 2016) (Figura 14). De esta manera, la administración intracerebroventricular de glucosa reduce la actividad hipotalámica de AMPK, mientras que la inhibición de la utilización de la glucosa intracelular en el cerebro aumenta su actividad (Alquier et al., 2007; Kim et al., 2004). La regulación de la actividad de AMPK en el hipotálamo también afecta a la respuesta contrarreguladora a la hipoglucemia, que implica señales como el glucagón, la corticosterona y las catecolaminas (Alquier et al., 2007; Fan et al., 2009; Han et al., 2005; McCrimmon et al., 2008). La inhibición genética o farmacológica de AMPK en el área mediobasal del hipotálamo conduce a una disminución en la secreción de estas señales provocando una hipoglucemia grave y prolongada (McCrimmon et al., 2008; Namkoong et al., 2005). Por otro lado, la activación específica de AMPK en el VMH tiene efectos contrarreguladores, incluyendo la disminución de la sensibilidad a la insulina (McCrimmon et al., 2008), el aumento de los niveles plasmáticos de hormonas contrarreguladoras (McCrimmon et al., 2008; Namkoong et al., 2005) y la estimulación de la actividad neuronal de las neuronas sensoras de glucosa (Canabal et al., 2007).

En el hipotálamo, es importante destacar que AMPK también juega un papel significativo en la regulación de la producción hepática de glucosa (Yang et al., 2010). Además, AMPK desempeña un papel crucial en mediar las acciones de otras señales que intervienen en el control de la producción de glucosa. Por ejemplo, la leptina, actúa a través de AMPK para normalizar los niveles de glucosa en sangre en modelos de roedores de diabetes mellitus tipo 1 y tipo 2, así como en pacientes con lipodistrofia (Coppari & Bjørnbæk, 2012; Morton & Schwartz, 2011; Tanida et al., 2013, 2015). Además, la fructosa, incrementa la gluconeogénesis hepática en roedores a través de la AMPK hipotalámica (Kinote et al., 2012). En resumen, AMPK en el hipotálamo no solo regula la producción hepática de glucosa, sino que también actúa como intermediario clave en las respuestas a diversas señales metabólicas y hormonales, como la leptina y la fructosa, que influyen en la homeostasis de la glucosa y en el control global de la energía.

4.5 AMPK HIPOTALÁMICA Y TERMOGÉNESIS

También cabe señalar el papel clave de AMPK hipotalámica como regulador de la termogénesis del BAT a través de la modulación del SNS (Figura 14). Estudios con modelos de ratones genéticamente deficientes en la isoforma $\alpha 2$ de AMPK revelaron un aumento en los niveles de catecolaminas en la orina, indicando una hiperactivación del SNS (Xue et al., 2009). Asimismo, en ratones deficientes en tirosina fosfatasa 1B, un inhibidor de los receptores de insulina y de leptina, se observó una pérdida de peso corporal y una resistencia a la obesidad inducida por dieta, lo cual se relacionó con una menor actividad de la isoforma $\alpha 2$ de AMPK. Esta disminución de actividad se asoció con un aumento de la termogénesis, de la biogénesis mitocondrial y la oxidación muscular, lo que en conjunto contribuye a un aumento

INTRODUCCIÓN

del gasto energético, la delgadez y la resistencia a obesidad inducida por dieta (Xue et al., 2009).

Además, AMPK también regula los efectos de las THs en el gasto energético. La administración de triyodotironina (T_3 , *triiodothyronine*) específicamente en el VMH inhibe la actividad de AMPK en este núcleo, lo que a su vez incrementa la termogénesis y la actividad del SNS en el BAT. Este proceso contribuye al aumento del gasto energético y la regulación del balance térmico (Capelli et al., 2021; Martínez-Sánchez et al., 2017). De forma similar, el estradiol también ejerce un efecto en la regulación de AMPK en el SNC. La administración de estradiol en el SNC inhibe de manera específica AMPK a través del receptor de estrógenos α en el VMH. Esta inhibición de AMPK en el VMH resulta en la activación de la termogénesis en el BAT, independiente de la ingesta, lo que conduce a una pérdida de peso corporal (Martínez De Morentin et al., 2014). Sin embargo, la sobreexpresión de AMPK en animales tratados con estradiol centralmente produce un efecto contrario; disminuye la termogénesis y, por lo tanto, previene de la pérdida de peso que normalmente se observa con la administración de estradiol (Martínez De Morentin et al., 2014). Es importante destacar que otras señales también juegan un papel en la regulación de la termogénesis en el SNC, y su efecto puede depender del estado de activación de AMPK en el VMH. Un ejemplo es la proteína BMP8B, que actúa en el SNC y su efecto termogénico depende del estado de activación de AMPK en el VMH (Martins et al., 2016; Rial-Pensado et al., 2022; Whittle et al., 2012). De hecho, se ha observado en ratas que la activación constitutiva de AMPK en el VMH inhibe la termogénesis inducida por BMP8B (Martins et al., 2016; Rial-Pensado et al., 2022; Whittle et al., 2012).

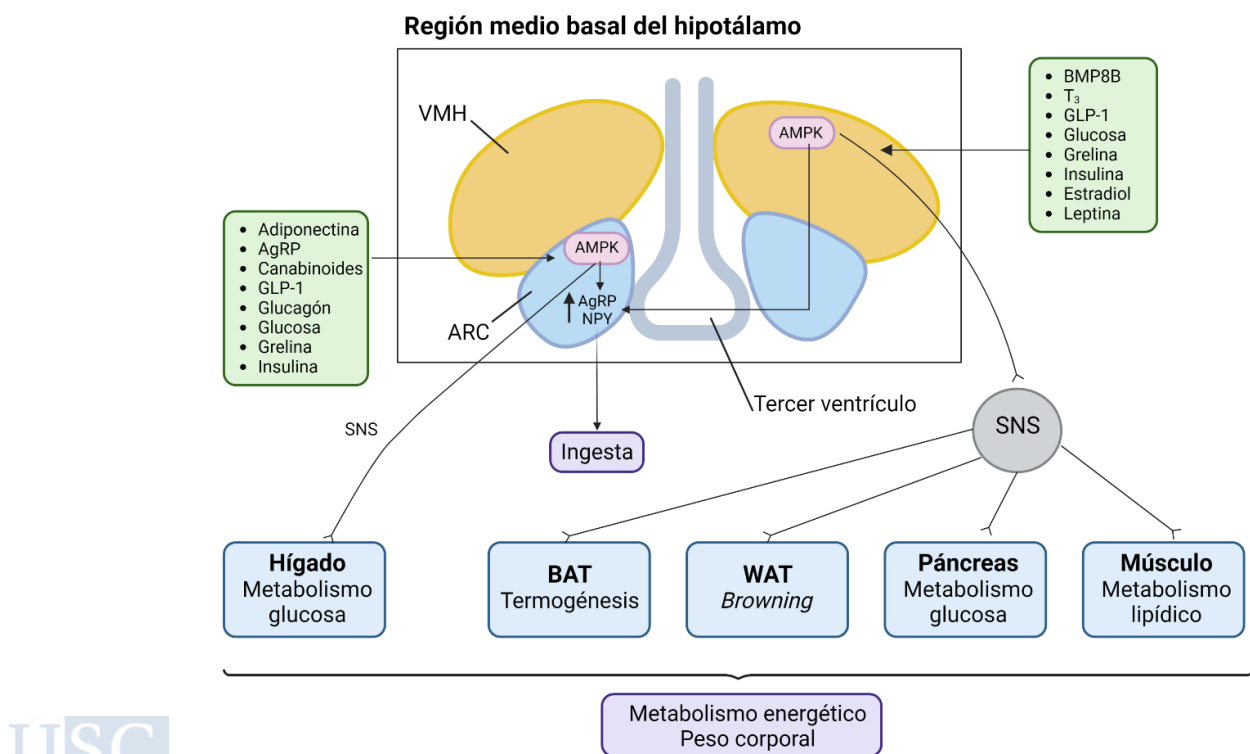


Figura 14. Modulación del balance energético por AMPK en el hipotálamo. Creado con Biorender.com.

En conjunto, todos estos hallazgos destacan la importancia del eje AMPK (VMH)-SNS-BAT como un mecanismo fundamental en la regulación de la homeostasis energética (Contreras et al., 2015; López et al., 2016). Otras señales también ejercen sus efectos a través de este eje. Por ejemplo, la administración de nicotina provoca un aumento de la termogénesis y una reducción en el peso corporal al inhibir la actividad de AMPK en el hipotálamo (Martínez De Morentin et al., 2012; Seoane-Collazo et al., 2014, 2021). De manera similar, el liraglutide, un análogo de GLP1 utilizado en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2, tiene propiedades termogénicas y estimula el *browning* del WAT a través de la regulación de AMPK en el VMH, lo que resulta en una disminución del peso corporal (Beiroa et al., 2014; González-García et al., 2019). Además, estudios recientes han demostrado que la inyección intravenosa de exosomas dirigidos específicamente a AMPK hipotalámica en poblaciones neuronales selectivas pueden convertirse en una estrategia eficaz para el tratamiento de la obesidad. Mediante la regulación de la actividad de AMPK hipotalámica se incrementa la termogénesis del BAT mediada por el SNS, permitiendo atenuar la obesidad (Milbank et al., 2021, 2023).

4.6 AMPK Y RITMOS CIRCADIANOS

AMPK desempeña un papel complejo en la regulación de los ritmos circadianos y su interacción con el sistema de reloj molecular del hipotálamo. Hay dos maneras principales de entender su función en este contexto: como una salida (*output*) del reloj molecular o como un componente activo dentro del propio TTFL. En primer lugar, AMPK puede funcionar como una salida del reloj molecular, respondiendo a los cambios en los ritmos circadianos generados por los relojes moleculares. Por ejemplo, en el hipotálamo, la actividad de AMPK muestra una oscilación diurna, alcanzando su punto máximo durante la fase de oscuridad, cuando los ratones están activos y se alimentan (Um et al., 2011). Este patrón de oscilación se correlaciona con un aumento del apetito, lo que sugiere que el reloj central influye en la modulación de la actividad de AMPK para sincronizarla con los ritmos circadianos y las necesidades metabólicas del organismo. Por otro lado, AMPK puede ser un componente activo dentro del reloj molecular. Se ha demostrado que AMPK puede adelantar la fase de expresión de los genes del reloj al degradar proteínas como PER2 a través de la fosforilación de la caseína quinasa I ϵ Ser389 (CKI ϵ , casein kinases I ϵ) (Um et al., 2007). También contribuye a la sincronización metabólica de los relojes periféricos al fosforilar y desestabilizar CRY1 (Lamia et al., 2009). Por lo tanto, la relación entre AMPK y el reloj molecular es bidireccional y compleja. Por un lado, AMPK responde a las señales del reloj molecular, ajustando su actividad de acuerdo con los ritmos circadianos. Por otro lado, también influye activamente en los mecanismos que generan los ritmos circadianos. En conjunto, esta interacción precisa contribuye a sincronizar los procesos fisiológicos y metabólicos en el hipotálamo y otros tejidos, permitiendo que el organismo se adapte de manera óptima a los ciclos diarios de luz y oscuridad.

INTRODUCCIÓN

Curiosamente, la delección de las subunidades $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de AMPK en ratones no conduce a la pérdida de los ritmos circadianos de la actividad locomotora en condiciones de oscuridad completa (Um et al., 2011), lo cual suele utilizarse como un indicador de la funcionalidad del SCN (Ralph et al., 1990; Stephan & Zucker, 1972). Sin embargo, los ratones $\alpha 1$ $-/-$ presentan un período más corto y los ratones $\alpha 2$ $-/-$ muestran una ligera tendencia hacia un período más largo. También se ha observado que el ritmo circadiano de la temperatura corporal se reduce en los ratones $\alpha 1$ $-/-$, pero no en los $\alpha 2$ $-/-$. En relación con el patrón circadiano de expresión de los genes centrales del reloj, se ha observado una perturbación severa en el tejido adiposo de los ratones $\alpha 1$ $-/-$, y en el corazón y el músculo esquelético de los ratones $\alpha 2$ $-/-$. Además, la actividad circadiana de la enzima nicotinamida fosforil-transferasa (NAMPT), que convierte la nicotinamida (NAM) en NAD⁺ y es un regulador crucial del reloj circadiano, se encuentra alterada en los tejidos que carecen de AMPK (Um et al., 2011). Estos hallazgos subrayan la importancia fundamental de AMPK en la regulación de los ritmos circadianos y su contribución en la sincronización de procesos fisiológicos en el hipotálamo y otros tejidos.

La capacidad de AMPK para responder a señales metabólicas y modificar directamente los componentes del reloj circadiano sugiere que desempeña un papel fundamental en la sincronización metabólica en los relojes periféricos (Jordan & Lamia, 2013). La activación farmacológica de AMPK mediante la inyección intraperitoneal (IP) del ribonucleótido 5-aminoimidazol-4-carboxamida (AICAR, 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside) (Lamia et al., 2009) o de metformina (Um et al., 2007), provoca un cambio de fase del reloj hepático en ratones, lo que sugiere su posible capacidad para controlar el reloj en el hígado. Además, la estimulación aguda con AICAR alteró la expresión de los genes del reloj en el músculo esquelético en ratones *wildtype*, pero no en ratones deficientes en la subunidad $\gamma 3$, lo que indica que la activación de AMPK también puede desempeñar un papel en el reloj muscular (Vieira et al., 2008). La alteración genética de los relojes circadianos ya sea de forma ubicua (Lee et al., 2011; Preitner et al., 2002) o de forma específica en un tejido (Vielhaber et al., 2000), provoca cambios drásticos en el comportamiento alimenticio, el peso corporal y la homeostasis de la glucosa, cada uno de los cuales también se ve alterado por la manipulación de AMPK (Akashi et al., 2002; Blau, 2008; Camacho et al., 2001; Gallego & Virshup, 2007; Keesler et al., 2000; Kloss et al., 1998). Por lo tanto, el papel de AMPK entre el reloj circadiano y el metabolismo es esencial para el mantenimiento de la homeostasis energética y para prevenir trastornos metabólicos (Lee & Kim, 2013).

HIPÓTESIS

HIPÓTESIS

Dado que los astrocitos pueden detectar señales metabólicas periféricas, nuestra hipótesis propone que AMPK, actuando como un sensor metabólico en los astrocitos, desempeña un papel esencial en la coordinación de los ritmos circadianos y en la homeostasis energética en el organismo. Postulamos que la actividad de AMPK en los astrocitos podría ser un factor clave en la sincronización y regulación de los ritmos circadianos, así como en la adecuada gestión del equilibrio energético a nivel sistémico.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis doctoral es comprender el papel de AMPK γ 2 en el balance energético y la sincronización del reloj astrocítico. Para abordar este propósito, se han establecido tres objetivos específicos:

1. Generación de ratones *knockout* para AMPK γ 2 en astrocitos GLAST.
2. Investigar el impacto de la delección de la subunidad AMPK γ 2 en los astrocitos GLAST positivos en la regulación del balance energético.
3. Analizar el efecto de la delección de la subunidad AMPK γ 2 en los astrocitos GLAST positivos en la sincronización del reloj astrocítico.

MATERIAL Y MÉTODOS

5 MODELOS ANIMALES

5.1 LEGISLACIÓN

En materia de experimentación animal, los procedimientos experimentales y protocolos de manipulación de animales llevados a cabo durante la realización de esta tesis doctoral, se efectuaron bajo la supervisión del Comité Ético de la Universidad de Santiago de Compostela, siendo responsables finales el Dr. Miguel Antonio López Pérez y la Dra. Olga Barca Mayo con los números de procedimiento ID 15012/2020/010 e ID 15012/2021/011, respectivamente, siendo aprobados previamente por el jefe del servicio provincial de ganadería del departamento territorial de la Consellería do Medio Rural e do Mar de la provincia de A Coruña, órgano competente para dictar dicha resolución. Siempre se ha actuado conforme la legislación vigente:

- Orden del 15 de septiembre de 2006 por la que se crea el “Comité de Bioética da Consellería Rural”.
- Ley estatal 32/2007, de 7 de noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio.
- Decreto 296/2008, de 30 de diciembre, de protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, incluida la docencia, y por el que se crea el Registro de los centros de cría, de suministradores y usuarios y la Comisión Gallega de Bienestar de los Animales de Experimentación.
- Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos.
- Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral se prestó especial atención al cumplimiento del artículo 4 del Real Decreto 53/2013, el cual establece como principio general la promoción e implementación del “principio de las tres erres”, es decir, el reemplazo, la reducción y el refinamiento de los procedimientos. Para ello se trató de emplear el mínimo número de animales en cada experimento, evitando la duplicación innecesaria de experimentos y reduciendo el número experimental por grupo sin comprometer la consecución de los objetivos del estudio. De este modo, se tuvo en especial consideración el mantenimiento del bienestar animal disminuyendo, en la medida de lo posible, el estrés causado por dolor, sufrimiento o daño prolongado en los animales.

5.2 MODELOS ANIMALES

Durante el desarrollo de la presente tesis doctoral, se emplearon ratones macho y hembras *knockout* para el gen AMPK γ 2 en astrocitos que expresan GLAST (ver en detalle en “Procedimientos no quirúrgicos”). Los animales se estabularon en condiciones estables de temperatura ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) y humedad, con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas (8:00 horas - 20:00 horas). Antes de iniciar cualquier experimento, se realizaron períodos de aclimatación a las instalaciones de 7 días aproximadamente. Durante todos los procedimientos, los animales se mantuvieron en condiciones *ad libitum* de acceso libre a agua y a dieta estándar (STD, *standard diet*) (STD, SAFE A04: 3.1% grasa, 59.9% carbohidratos, 16.1% proteínas, 2791 kcal/g; Scientific Animal Food & Engineering; Nantes, Francia), exceptuando aquellos experimentos en los que se especifique. Además, distintos parámetros fueron monitorizados periódicamente para confirmar el bienestar animal, mediante un seguimiento del peso corporal e ingesta, una valoración del aspecto físico y acostumbrándolos al manejo por el personal técnico del laboratorio para minimizar el estrés ocasionado durante los experimentos. En cuanto a las condiciones de estabulación, en la mayor parte de los procedimientos los animales fueron alojados de manera colectiva, pero en algunos procedimientos se requirió su estabulación individual.

6 ANESTESIA Y ANALGESIA

De forma previa al inicio de los procedimientos quirúrgicos, se suministró anestesia general a los animales de experimentación mediante una inyección IP. En ratones la dosis administrada fue de 100 μl /100g de peso corporal, con una composición de 13.8% de ketamina (*Ketamidol 100 mg/ml*; Richter Pharma; Wels, Austria) 3.45% de hidrocloreuro de xilacina (*Rompun 20 mg/ml*; Bayer Health Care; Berlin, Alemania) y 82.75% de suero salino fisiológico (*Suero fisiológico isotónico 0.9%*; Braun; Lugo, España). Para verificar el estado de anestesia de los animales, se comprobó la pérdida de reflejo podal y palpebral, indicando esta referencia un estado profundo de anestesia durante el cual se pueden llevar a cabo los procedimientos quirúrgicos.

Como métodos analgésicos, por vía subcutánea (SC) se administró una dosis de 5 mg/kg de masa corporal de meloxicam (*Metacam 5 mg/ml*; Boehringer Ingelheim; Ingelheim am Rhein, Alemania) antes del inicio del procedimiento quirúrgico y una dosis de 0.05 mg/kg de masa corporal de buprenorfina (*Bupaq 0.3 mg/ml*; Richter Pharma; Wels, Austria) una vez finalizada la cirugía.

7 VÍAS DE ADMINISTRACIÓN DE SUSTANCIAS

7.1 VÍA INTRAPERITONEAL (IP)

La administración de sustancias por vía intraperitoneal (IP) se realiza a través del peritoneo, en la parte ventro-caudal del animal y no necesita el uso de anestesia. Para evitar infligir cualquier daño al animal, éste debe estar correctamente inmovilizado, para lo cual se sujeta por el lomo, garantizando que la cabeza tenga la menor movilidad posible. El animal debe inclinarse ligeramente hacia abajo con el fin de reducir el riesgo de desgarro de los órganos internos y a continuación se inserta la aguja (*BD Microlance, 25G 5/8" 0.5x16mm*; BD Medical Surgical Systems; Nueva Jersey; EEUU), acoplada a una jeringa (*1ml BD slip-tip syringe, bulk, non-sterile*; BD Medical Surgical Systems; Nueva Jersey, EEUU), preferiblemente en el costado derecho del animal en un ángulo de 45 grados con respecto al vientre. Esta vía de administración fue la seleccionada para inocular la anestesia a los animales (dosis detallada en la sección anterior) y otros reactivos como glucosa, insulina y piruvato.

7.2 VÍA SUBCUTÁNEA (SC)

Esta vía de administración se realiza por la zona lateral dorso-caudal del animal, por encima de las patas traseras. Inmovilizando al animal, se pellizca la piel del lomo y con la otra mano se realiza la inyección con una aguja (*BD Microlance, 25G 5/8" 0.5x16mm*, BD Medical Surgical Systems; Nueva Jersey, EEUU) acoplada a una jeringa (*1ml BD slip-tip syringe, bulk, non-sterile*; BD Medical Surgical Systems; Nueva Jersey, EEUU) de forma paralela a la columna vertebral. Este procedimiento no requiere anestesia y se emplea para la administración de los agentes analgésicos.

7.3 VÍA HIPOTALÁMICA NÚCLEO-ESPECÍFICA

Esta vía se emplea para la administración de virus bilateralmente en diferentes núcleos del hipotálamo mediante el uso de coordenadas específicas para cada núcleo y especie, indicadas en el Atlas Estereotáxico de Cerebro de rata y ratón. Para establecer las coordenadas estereotáxicas antero-posterior (AP), lateral (L) y dorso-ventral (DV) se utiliza como punto de referencia la intersección de la sutura coronal con la sutura sagital, denominada bregma. Las coordenadas de los núcleos hipotalámicos estudiados fueron las siguientes (Paxinos & Franklin,

2001):

-Núcleo ventromedial en ratón: -1.7 mm AP; ± 0.5 mm L; -5.5 mm DV.

Una vez anestesiado el animal, se inyecta la sustancia de interés mediante la utilización de un aparato de esterotaxia (*David Kopf Instruments*; Tujunga, CA, EEUU) (ver en más detalle en el apartado “Procedimientos quirúrgicos”) y jeringuillas de microinyección (*NeuroHamilton Modelo 7001KH Neuros Syringe*; Hamilton Company; NV, EEUU), con un flujo de inyección de 200 nl/min durante 10-15 minutos.

8 PROCEDIMIENTOS NO QUIRÚRGICOS

8.1 GENERACIÓN DE RATONES KNOCKOUT CONDICIONALES E INDUCIBLES GLAST-CRE AMPK γ 2^{FLOX/FLOX}

Para generar el modelo de ratón *knockout* (KO) de AMPK γ 2 específico en los astrocitos que expresan el transportador de glutamato de alta afinidad (GLAST), se cruzaron ratones GLAST-CreER^{T2} (Mori et al., 2006) (proporcionados por la Dra. Cristina García Cáceres, Helmholtz Diabetes Center) con ratones AMPK γ 2 floxeados (AMPK γ 2^{flox/flox}) (Prkag2^{tm1.1Rti/J}; cepa: 030979; The Jackson Laboratory; Bar Harbor, ME, EEUU), ambos bajo un fondo genético C57BL/6J.

Los ratones GLAST-CreER^{T2} son ratones transgénicos inducibles, ya que presentan una secuencia promotora del transportador de glutamato de alta afinidad (GLAST) que dirige la expresión de la proteína de fusión Cre-ER^{T2}. Dicha proteína consiste en una recombinasa Cre fusionada con una forma mutante del receptor de estrógeno humano que no se une a su ligando natural (17 β -estradiol) a concentraciones fisiológicas, pero sí a los ligandos sintéticos del receptor de estrógenos, como el tamoxifeno (Tx). De este modo, la recombinasa Cre únicamente se expresa en aquellos astrocitos positivos para GLAST cuando se administra el Tx. Los animales utilizados de esta línea son ratones hemicigotos, viables, fértiles y sin anomalías físicas o de comportamiento grave.

Los ratones AMPK γ 2 floxeados presentan sitios loxP que flanquean al exón 6 del gen de la subunidad reguladora gamma 2 (*Prkag2*) de la proteína AMPK. Los animales empleados de esta línea son animales homocigotos para el inserto, viables, fértiles y sin anomalías físicas o de comportamiento.

A través del cruce de ratones GLAST-CreER^{T2 +/-} y AMPK γ 2^{flox/flox} se obtienen animales heterocigotos GLAST-CreER^{T2 +/-} AMPK γ 2^{flox/flox} (GLAST-Cre AMPK γ 2^{flox/flox}). Para los estudios realizados en esta tesis doctoral se utilizaron ratones GLAST-Cre AMPK γ 2^{flox/flox} (*AMPK γ 2cKO*) machos y hembras. Como controles se emplearon los hermanos de camada con el mismo fondo genético, pero negativos para Cre (AMPK γ 2^{flox/flox}). Tanto los animales *AMPK γ 2cKO* como los controles fueron tratados con Tx. Para realizar la escisión del gen AMPK γ 2 por la recombinasa Cre, se administra diariamente Tx vía IP (100 mg/kg peso

corporal) a las 6 semanas de edad durante 5 días consecutivos (García-Cáceres et al., 2016). El Tx (*Tamoxifen*; Sigma-Aldrich; San Luis, MI, EEUU), es disuelto en aceite de girasol (*Sunflower seed oil*; Sigma-Aldrich; San Luis, MI, EEUU) a una concentración final de 10 mg/ml a 37°C y se almacena a -20°C en oscuridad. El genotipado de los animales se lleva a cabo mediante el método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *polimerase chain reaction*) (ver el apartado “PCR para genotipado” en la sección “Material y métodos”).

8.2 MONITORIZACIÓN DE LA INGESTA Y LA MASA CORPORAL

El registro del peso corporal y de la ingesta se determinó con una balanza de precisión (*Balanza de precisión PS 4500.R1.M*; RADWAG; Radom, Polonia). Las mediciones de masa corporal se tomaron semanalmente a partir de la sexta semana de vida de los animales, tras la administración de Tx, y se continuaron durante un período de 20 semanas.

Con el propósito de medir la ingesta, los ratones fueron alojados individualmente. A no ser que se especifique en el texto, las mediciones de ingesta se llevaron a cabo en dos momentos específicos del ciclo circadiano: ZT0, correspondiente al momento en que se encienden las luces (8:00 horas), y ZT12, momento en el que se apagan las luces (20:00 horas), durante un período de cuatro días. Esto permitió distinguir la cantidad de alimento consumido por cada animal durante la fase de luz y la fase de oscuridad.

8.3 MEDICIÓN DE LA TEMPERATURA CORPORAL

Para el registro de la temperatura corporal, los animales se estabularon individualmente. La temperatura corporal se midió a través de una sonda rectal conectada a un termómetro (*BAT-12 Microprobe-Thermometer*; Physitemp; Clifton, NJ). Durante el procedimiento los ratones se encontraban despiertos y parcialmente inmovilizados.

8.4 MEDICIÓN DE LA TEMPERATURA DEL BAT

El día anterior a la adquisición de imágenes térmicas del BAT, es imprescindible afeitar la zona interescapular del animal. La temperatura de la piel de la zona del BAT se midió con una cámara infrarroja (*B335: Compact-Infrared-Thermal-Imaging-Camera*; FLIR; West Malling, Kent, Reino Unido) y se analizó empleando un software específico (*FLIR-Tools-Software*, FLIR; West Malling, Kent, Reino Unido), delimitando el área del BAT. Para el cálculo de la temperatura media se utilizó el promedio de tres imágenes por ratón.

8.5 TEST DE TOLERANCIA A GLUCOSA (GTT)

Para valorar el grado de tolerancia a glucosa se llevó a cabo un test de tolerancia a glucosa (GTT, *glucose tolerance test*). Los ratones se mantuvieron en ayuno durante las 12 horas previas al inicio del experimento. En primer lugar se toman los valores basales de los niveles de glucosa en sangre mediante una muestra de sangre de la cola empleando una tira reactiva conectada a un glucómetro (*Glucocard sensor*; A.Menarini diagnostics; España). A continuación, se inyecta en función del peso corporal de cada animal, D-glucosa (*D-glucose*; Sigma-Aldrich; San Luis, MI, EEUU) vía IP a una dosis de 2 g/kg. Los niveles de glucosa circulante se miden a los 10, 20, 30, 60, 90 y 120 minutos tras la inyección, a través de sangre de la cola del mismo modo que se midieron los valores basales. Finalmente, los datos obtenidos se representaron en una curva a partir de la cual se calculó el Área bajo la Curva (AUC) del grupo control y del grupo experimental.

8.6 TEST DE TOLERANCIA A INSULINA (ITT)

También se realizaron tests de tolerancia a insulina (ITT, *insulin tolerance test*) para valorar la sensibilidad a insulina de los animales. Tras la medición de los niveles basales de glucosa circulante en sangre de la cola, se procedió a la inyección por vía IP de insulina (*Actrapid*; Novo Nordisk; Dinamarca) a una dosis de 0.35 U/kg. Posteriormente, se registraron los niveles de glucosa a los 10, 20, 30, 60, 90 y 120 minutos después de la inyección. Los datos obtenidos se representaron en una curva a partir de la cual se calculó el Área bajo la Curva (AUC) del grupo control y del grupo experimental.

8.7 TEST DE TOLERANCIA A PIRUVATO (PTT)

Con el fin de establecer la capacidad gluconeogénica de los animales, se llevó a cabo un test de tolerancia a piruvato (PTT, *pyruvate tolerance test*), que es inductor de la gluconeogénesis (Hughey et al., 2014). Tras un período de ayuno de 12 horas, se procedió a la inyección por vía IP de piruvato (*Sodium pyruvate*; Sigma-Aldrich; San Luis, MI, EEUU) a una dosis de 1.25 g/kg. Tras la medición de los niveles basales de glucosa circulante en la sangre de la cola, se midieron los niveles de glucosa a los 20, 40, 60, 80 y 120 minutos después de la inyección. Por último, se representaron los resultados en una curva y se calculó el Área bajo la Curva (AUC) del grupo control y del grupo experimental.

8.8 MONITORIZACIÓN DEL GASTO ENERGÉTICO, COEFICIENTE RESPIRATORIO Y ACTIVIDAD LOCOMOTORA

Para la monitorización del gasto energético (EE, *energy expenditure*), del coeficiente respiratorio (RQ, *respiratory quotient*) y de la actividad locomotora espontánea (LA, *locomotor activity*), se ha empleado un sistema de calorimetría indirecta, consistente en jaulas metabólicas en las que los animales se estabulan de forma individual. Cada jaula tiene una temperatura controlada de 24°C e incorpora un sistema de sensores que registran cada 30 minutos el gasto energético, la actividad locomotora y el coeficiente respiratorio, a partir de los valores medidos de consumo de O₂ (vO₂) y producción de CO₂ (vCO₂) (*LabMaster*; TSE Systems; Bad Homburg, Alemania). El sistema de calorimetría se calibra a partir de una serie de gases de referencia (20,9% O₂; 0,05% CO₂ y 79,05% N₂). Los animales estuvieron en el sistema en período de adaptación durante 24-48 horas y la tasa metabólica se midió durante las 24-72 horas siguientes.

8.9 DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN CORPORAL

El análisis de la composición corporal se realizó mediante un sistema de resonancia magnética nuclear (NMR, *nuclear magnetic resonance*) (*Whole Body Composition Analyzer*; EchoMRI; Houston, TX, EEUU). Dicho sistema mide la masa grasa, la masa magra y el volumen de fluidos con tiempos de escaneo cortos para asegurar el bienestar animal. Para realizar cada medición, los animales se introdujeron en un adaptador adecuado al tamaño del ratón, sin necesidad de anestesia previa. Se tomaron dos mediciones por animal, empleándose el promedio de ambas mediciones para el cálculo del porcentaje de masa grasa, masa magra y volumen de fluidos por peso total del animal.

8.10 ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD LOCOMOTORA CIRCADIANA

Para la monitorización de la actividad locomotora circadiana, los animales se estabularon individualmente en jaulas equipadas con ruedas de actividad (*ENV-047*; Med Associates Inc; NY, EEUU). Tras un período de adaptación a la rueda durante tres días en condiciones estándar de luz-oscuridad (12 horas: 12 horas) (LD, *light-dark*), se comenzaron los experimentos de monitorización de la actividad locomotora. Éstos siempre se iniciaron por un período de monitoreo de la actividad de 7-10 días en condiciones estándar de luz y oscuridad. Posteriormente, los animales fueron trasladados a un entorno de oscuridad constante durante 24 horas al día (DD, *dark-dark*) durante un período de 3 semanas. Durante esta etapa, fueron alojados en jaulas de color rojo (*Leddy-Red/Black IVC*; Tecniplast; PA, EEUU). Posteriormente, los animales fueron reintroducidos a ciclos regulares de luz-oscuridad (12

horas de luz: 12 horas de oscuridad) (rLD) durante 7-10 días. La actividad locomotora de los animales se registró cada 5 minutos utilizando el software Wheel Manager (*SOF-860*; Med Associates Inc; NY, EEUU). Para su análisis visual, los datos de la actividad se presentaron en forma de actogramas elaborados con el plugin Actogram J del paquete Fiji de ImageJ (Barca-Mayo et al., 2017 ; Barca-Mayo et al., 2020).

8.11 EXPERIMENTOS DE RESTRICCIÓN DE LA INGESTA

Para monitorizar la actividad anticipatoria de las comidas, los animales se alojaron individualmente en jaulas equipadas con ruedas de actividad (*ENV-047*; Med Associates Inc; NY, EEUU). Tras un período de adaptación a la rueda de tres días en condiciones estándar de luz-oscuridad (12 horas: 12 horas) (LD), se comenzaron los experimentos de monitorización de la actividad locomotora. Durante los primeros 7 días bajo condiciones de disponibilidad de comida *ad libitum* (AL), se registró la actividad locomotora de los ratones en el ciclo LD. Luego, se implementó una restricción alimentaria en los siguientes 10 días. Durante este período de restricción alimentaria (RF, *restricted feeding*), se invirtieron los ciclos de alimentación y se limitó el acceso a la comida durante el período inactivo (durante el día). Específicamente, el acceso al alimento se restringió desde ZT4 hasta ZT10 durante 6 días, y desde ZT4 hasta ZT8 durante los 4 días siguientes, mientras se monitorizaba la actividad locomotora. Para medir la ingesta, se pesaron diariamente los pellets de comida de cada ratón antes de proporcionar el acceso a la comida (ZT4) y después del período de acceso restringido (ZT10 o ZT8). La actividad locomotora de los ratones en las ruedas de actividad se registró cada 5 minutos utilizando el software Wheel Manager (*SOF-860*; Med Associates Inc; NY, EEUU). Para su inspección visual, los datos de la actividad se mostraron en forma de actogramas elaboradas con Actogram-J (Barca-Mayo et al., 2017, 2020; Luengo-Mateos et al., 2023).

La FAA se definió como el incremento de la actividad locomotora observado entre 1 y 4 horas antes del momento programado para el acceso a la comida. Para calcular este valor, se dividió la actividad locomotora registrada durante las 4 horas previas al acceso a la comida entre la actividad locomotora total registrada durante un período de 24 horas, expresado como porcentaje total. De manera similar, la actividad nocturna se calcula dividiendo la actividad locomotora registrada durante la noche (ZT12 - ZT24) entre la actividad locomotora total registrada durante 24 horas (incluyendo la FAA) (Luengo-Mateos et al., 2023).

9.2 PERFUSIÓN INTRACARDIACA

El cerebro de los ratones se fija mediante perfusión intracardiaca como paso previo a su estudio con técnicas de inmunofluorescencia. Tras la anestesia general del animal, se introdujo en una cabina de perfusión homologada (*Hoods division*; Flores Valles; Madrid, España) en posición decúbito-dorsal y se realizó una incisión de 5-6 cm a través de la pared abdominal justo debajo de la caja torácica. Con cuidado se separó el hígado del diafragma y se llevó a cabo una incisión en el diafragma a lo largo de toda la caja torácica para exponer la cavidad pleural. A continuación, se cortó la caja torácica hasta la clavícula. Levantando y sujetando el esternón, se realizó una incisión en la aurícula derecha del animal para crear una salida de sangre. Posteriormente, se llevó a cabo una pequeña incisión en el extremo posterior del ventrículo izquierdo, a través de la que se pasó una aguja palometa quirúrgica (*Aguja epicraneal palometa Venoflix 21G 0.8x20 mm*; Braun; Lugo, España), conectada a una jeringa (*Syringe 20 ml*; BD Plastipak; Becton Dickinson; Nueva Jersey, EEUU), hasta llegar a la raíz de la aorta. A través de la vía, se bombeó una solución de suero salino 0.9% NaCl, con el fin de eliminar la sangre del sistema circulatorio. Cuando se observó el aclaramiento del hígado, que es indicador de una buena perfusión, se procedió al bombeo de paraformaldehído (PFA) al 4% a través de la misma vía. Los temblores de fijación se observaron en cuestión de segundos. La eficacia de la perfusión pudo constatararse por la rigidez absoluta del animal. Finalmente, se diseccionaron los tejidos de interés, los cuales se mantuvieron en la solución de fijado durante un máximo de 24 horas a 4°C. A continuación, se cambiaron a una solución de sacarosa al 30% y se congelaron a -80°C.

9.3 DISECCIÓN Y EXTRACCIÓN DE TEJIDOS

Al término de cada procedimiento experimental, se llevó a cabo la eutanasia y disección de tejidos de los animales mediante luxación cervical y posterior decapitación, según lo establecido en las leyes y normas en experimentación animal. Los tejidos extraídos fueron los siguientes: hipotálamo (microdiseccionando los núcleos ARC, VMH y LHA), BAT, tejido adiposo subcutáneo (sWAT, *subcutaneous white adipose tissue*), tejido adiposo blanco gonadal (gWAT, *gonadal white adipose tissue*), tejido adiposo blanco visceral (vWAT, *visceral white adipose tissue*), hígado y músculo esquelético. Los tejidos se conservaron a -80°C hasta su procesamiento y análisis. Para análisis histológicos e inmunohistoquímicos, las muestras fueron fijadas en formalina al 10% (*Formalina 10% neutra tamponada*; Bio-Optica; Italia) y posteriormente parafinadas.

10 DISEÑOS EXPERIMENTALES

10.1 GENERACIÓN DE RATONES KNOCKOUT PARA AMPK γ 2 EN LOS ASTROCITOS GLAST-POSITIVOS Y SU FENOTIPADO METABÓLICO Y CIRCADIANO

Para estudiar de forma específica el efecto de la delección de AMPK γ 2 en los astrocitos positivos para GLAST, se generó el modelo de ratón *knockout* de AMPK γ 2 específico en los astrocitos positivos para GLAST. Se trata de un modelo genético inducible, por lo que para obtener los ratones *knockout* se administró diariamente Tx vía IP (100 mg/kg peso corporal) a las 6 semanas de edad durante 5 días consecutivos. Los ratones *knockout* para AMPK γ 2 son aquellos con el genotipo GLAST-Cre ^{+/-} AMPK γ 2^{flox/flox}, mientras que los ratones del grupo control fueron siempre hermanos de camada con el genotipo GLAST-Cre ^{-/-} AMPK γ 2^{flox/flox}. Por lo tanto, los grupos experimentales fueron los siguientes:

- Ratones control (AMPK γ 2^{flox/flox})
- Ratones *AMPK γ 2cKO* (GLAST-Cre ^{+/-} AMPK γ 2^{flox/flox})

A partir del tratamiento con Tx se inició el fenotipado metabólico. De este modo, entre las 6 y las 37 semanas de edad se realizó el seguimiento del peso corporal de los diferentes ratones y, a partir de las 15 semanas, se llevaron a cabo las distintas pruebas del fenotipado metabólico y circadiano (Figura 16, Tablas 1 y 2).

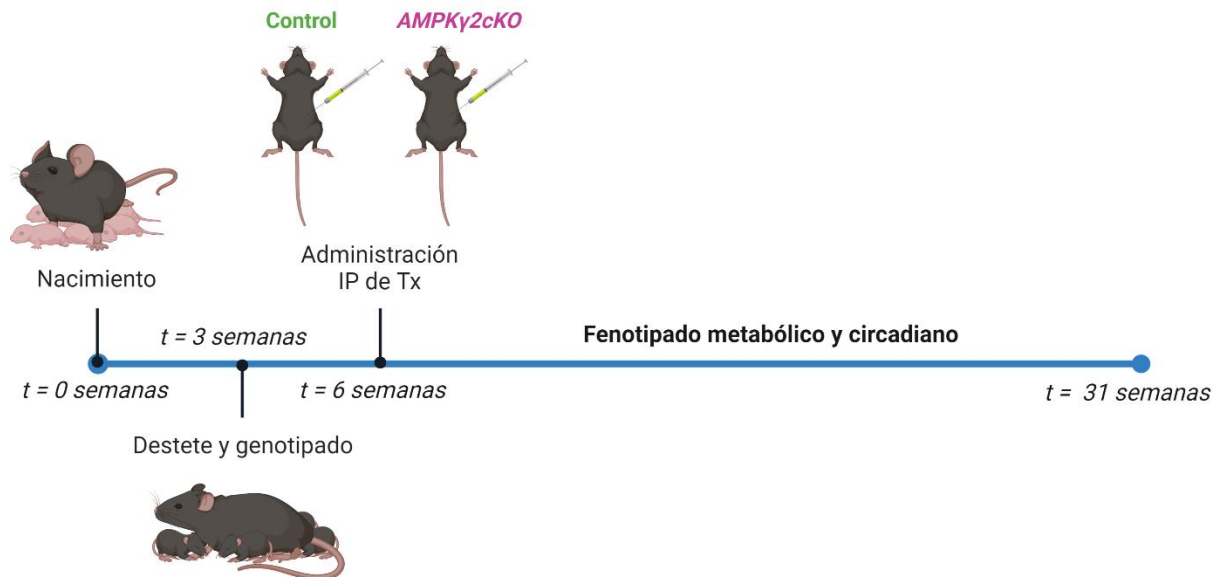


Figura 16. Representación esquemática de la generación de ratones KO para AMPK γ 2 en astrocitos GLAST-positivos y su fenotipado metabólico y circadiano. Creado con Biorender.com.

Tabla 1. Edad a la que se realizaron los procedimientos del fenotipado metabólico en machos y hembras.

Fenotipado metabólico		
Procedimientos	Tiempo (tras nacimiento)	Tiempo (tras Tx)
Peso corporal	Semana 6 - semana 31	Semana 0 - semana 25
Ingesta diaria total	Semana 21-22	Semana 15-16
Ingesta diaria luz-oscuridad	Semana 21	Semana 15
Glucosa	Semana 20	Semana 14
GTT	Semana 21	Semana 15
ITT	Semana 23	Semana 17
Calorimetría	Semana 20-21	Semana 14-15
Resonancia magnética	Semana 21	Semana 15
Temperatura del BAT	Semana 24	Semana 18
Temperatura rectal	Semana 23	Semana 17
Eutanasia y recolección de tejidos	Semana 24	Semana 18

Tabla 2. Edad a la que se realizaron los procedimientos del fenotipado circadiano en machos y hembras.

Fenotipado circadiano			
	Procedimientos	Tiempo (tras nacimiento)	Tiempo (tras Tx)
Machos	Luz-oscuridad (LD)	Semana 22	Semana 16
	Oscuridad constante (DD)	Semana 28	Semana 22
	rLuz-oscuridad (rLD)	Semana 32	Semana 26
	Adaptación metabólica	Semana 35	Semana 29
Hembras	Luz-oscuridad (LD)	Semana 22	Semana 16
	Oscuridad constante (DD)	Semana 27	Semana 21
	rLuz-oscuridad (rLD)	Semana 30	Semana 24
	Adaptación metabólica	Semana 24	Semana 18

10.2 INOCULACIÓN DE ADENOVIRUS ASOCIADOS CRE EN RATONES AMPK γ 2 FLOX EN VMH

Para determinar el efecto de la inhibición de AMPK γ 2 en el VMH, después de una semana de adaptación, los ratones AMPK γ 2^{flox/flox} fueron divididos en dos grupos (n = 7-8) con acceso libre a comida STD. Un grupo fue inoculado con adenovirus asociados (AAV, *adeno-associated virus*) que expresan la recombinasa Cre y el otro con GFP en el VMH. Una vez por semana se monitorizó el peso corporal y la ingesta. Transcurridas cuatro semanas, se estudió la ingesta durante la fase de luz y de oscuridad a lo largo de tres días y tres noches. A las cinco semanas, se procedió a controlar la temperatura corporal y se tomaron imágenes termográficas del BAT. Durante la séptima semana, los animales se estabularon individualmente en jaulas equipadas con ruedas y se iniciaron los experimentos de medición de la actividad locomotora circadiana, tras un período de adaptación a la rueda de tres días en condiciones estándar de luz-oscuridad LD (12 horas: 12 horas). El experimento bajo estas condiciones duró 10 días. Posteriormente, se llevaron a cabo estudios de restricción

alimentaria temporal, durante los cuales los animales se alojaron en condiciones de temperatura y humedad controladas bajo un ciclo de luz-oscuridad LD (12 horas: 12 horas), siendo el encendido de las luces a ZT0. Tras este período de tiempo, se midió el peso corporal y la ingesta de los ratones a ZT6 y, durante los siguientes 10 días, se les invirtió y restringió el acceso a la comida al período inactivo. Bajo estas condiciones de alimentación restringida, el acceso al alimento fue limitado de ZT4 a ZT10 durante 6 días y de ZT4 a ZT8 los cuatro días siguientes, mientras se registraba la actividad locomotora. Para monitorizar la ingesta, se pesó diariamente la comida de cada ratón antes (ZT4) y después del acceso a la comida (ZT10 o ZT8). Durante la undécima semana, se introdujeron los animales en jaulas metabólicas para monitorizar el gasto energético, el cociente respiratorio y la actividad locomotora espontánea mediante el sistema de calorimetría indirecta. Los animales se adaptaron al sistema durante las primeras 24-48 horas y la tasa metabólica se midió durante las 24-72 horas siguientes. A continuación, se analizó la composición corporal mediante un sistema de NMR (*Whole Body Composition Analyzer; EchoMRI; Houston, TX, EEUU*), que mide la masa grasa, la masa magra y el volumen de fluidos con tiempos de escaneo cortos para asegurar el bienestar animal. Para realizar cada medición, los animales se introdujeron en un adaptador adecuado al tamaño del ratón, sin necesidad de anestesia previa. Se tomaron dos mediciones por animal, utilizándose el promedio de ambas mediciones para el cálculo del porcentaje de masa grasa, masa magra y volumen de fluidos por peso total del animal. Finalmente, se procedió a realizar la eutanasia de los animales por luxación cervical y decapitación, según las leyes y normas vigentes de experimentación animal. De cada animal se extrajo el hipotálamo, BAT, scWAT, gWAT, vWAT, hígado y músculo esquelético. Los tejidos se mantuvieron congelados a -80°C para su posterior procesamiento y análisis. Para la extracción de núcleos específicos del hipotálamo se llevó a cabo una microdissección de los mismos (Figura 17).

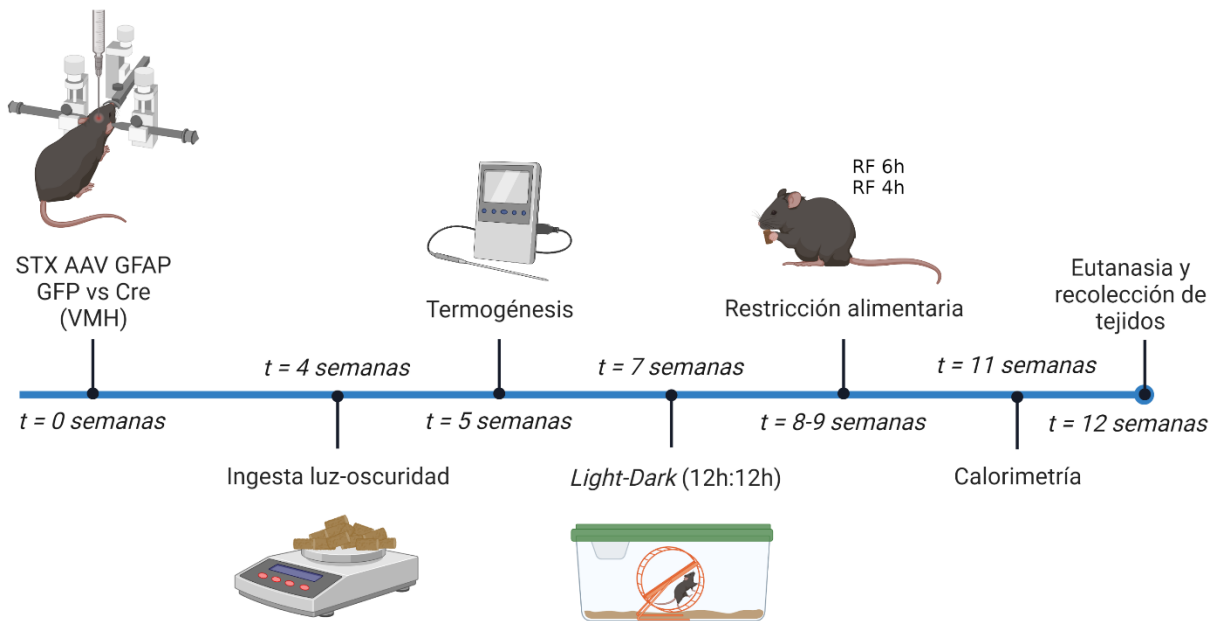


Figura 17. Representación esquemática de la inoculación de Adenovirus Asociados Cre en ratones AMPK γ 2 FLOX en el VMH. Creado con Biorender.com.

Tabla 3. Tiempo al que se realizaron los procedimientos del fenotipado metabólico y circadiano en machos y hembras tras la cirugía estereotáxica en el VMH.

Procedimientos	Tiempo (tras cirugía estereotáxica)
Peso corporal	Semana 0 - semana 6
Ingesta semanal	Semana 0 - semana 6
Ingesta diaria luz-oscuridad	Semana 4
Temperatura del BAT	Semana 5
Temperatura rectal	Semana 5
Luz-oscuridad	Semana 7
Adaptación metabólica	Semanas 8-9
Calorimetría	Semana 11
Resonancia magnética	Semana 11
Eutanasia y recolección de tejidos	Semana 12

11 TÉCNICAS ANALÍTICAS

11.1 ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT

11.1.1. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA

Para la extracción de proteína, se cortó un fragmento del tejido a analizar, manteniéndolo siempre en hielo seco durante su manipulación. El tejido sobrante se volvió a guardar a -80°C . La porción de tejido cortado se introdujo en un tubo eppendorf de 2 ml con cierre de seguridad (*Safe-Lock Tubes 2.0 ml*; Eppendorf; Hamburgo, Alemania). Dicho tubo contenía una bolita de acero y un volumen determinado de tampón de lisis (composición en la Tabla 4) con inhibidor de proteasas (*Complete TM*; Roche; Mannheim, Alemania), según el tejido de interés (volumen entre 100 μl y 1000 μl).

Las muestras se homogeneizaron mediante un proceso de disgregación y rotura celular mecánica utilizando un homogeneizador mecánico (*TissueLyser II*; Quiagen; Germantown, MD, USA). Los valores del tiempo y la frecuencia de la disgregación mecánica variaron según el tejido a estudiar. Posteriormente, se realizó una centrifugación a 13200 rpm durante 30 minutos y se extrajo el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf de 1.5 ml con cierre de seguridad (*Safe-Lock Tubes 1.5 ml*; Eppendorf; Hamburgo, Alemania), descartando el precipitado. Para la extracción de proteína del hígado y del BAT se requirió realizar a mayores dos centrifugaciones de 5 minutos para asegurar la eliminación de la grasa. A lo largo de todo el proceso de extracción, tanto las muestras como el tampón de lisis estuvieron refrigerados a 0°C para evitar la degradación de proteína.

Tabla 4. Composición del tampón de lisis.

Tampón de lisis (pH 7.5)	
Reactivo	Cantidad/Volumen
Tris-HCL pH 7.5	2.5 ml
EGTA 0.2 M (pH 8)	2.5 ml
EDTA 0.2 M (pH 8)	2.5 ml
Tritón X-100	5 ml
Ortovanadato sódico 0.1 M	5 ml
Fluoruro sódico	1 g
Pirofosfato sódico	1.1 g
Sacarosa	46 g
H ₂ O destilada	c.s.p. 500 ml
Cóctel inhibidor de proteasas (ROCHE)	1 pastilla por cada 50 ml

11.1.2. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA

La determinación de la concentración de proteína en las alícuotas obtenidas a partir de los extractos proteicos se realizó mediante el método colorimétrico de Bradford, empleando el kit Bio-Rad Protein Assay (*Protein Assay Dye Reagent*; Bio-Rad; Hercules, CA, USA). Todo el proceso se llevó a cabo en hielo a 4°C para evitar la degradación de la proteína.

En primer lugar, se diluyó cada muestra por un factor de dilución 1:26 en H₂O destilada en tubos eppendorf. En una placa de 96 pocillos, se cargaron 10 µl de cada muestra y, posteriormente, 250 µl de reactivo de Bradford diluido en proporción 1:4 en H₂O destilada y a una temperatura de 37°C. Además, en cada placa se incluyó una recta de calibrado, mediante una dilución seriada de albúmina de suero bovino (BSA, *Albumin from bovine serum*; Sigma-Aldrich; San Luis, MI, EUU) con siete puntos duplicados de concentración conocida (Tabla 5). A continuación, las placas se incubaron en un lector de placas (*Multiskan Go Microplate Spectrophotometer*; Thermo Scientific; Rockford, IL, USA) durante 5 minutos a 37°C y se midió la colorimetría en densidad óptica en cada pocillo a una longitud de onda de $\lambda=595$ nm. Extrapolando los valores de la recta de calibrado se determinó la concentración de proteína de cada muestra.

Tabla 5. Concentraciones de BSA de la recta patrón.

Concentraciones de BSA de la recta patrón	
Punto	Concentración
Punto 1	0.03125 mg/ml
Punto 2	0.0625 mg/ml
Punto 3	0.125 mg/ml
Punto 4	0.25 mg/ml
Punto 5	0.5 mg/ml
Punto 6	0.7 mg/ml
Punto 7	1 mg/ml

11.1.3. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Las proteínas fueron separadas mediante electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE, *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamida Gel Electroforesis*). Esta técnica se fundamenta en la separación de proteínas en función de su masa molecular, en base a su migración en un campo eléctrico, por lo que es necesario neutralizar una serie de características de las proteínas que darían lugar a patrones de migración erróneos e identificaciones incorrectas. Resulta imprescindible eliminar la estructura cuaternaria de la proteína para reproducir una migración en el gel lo más proporcional a su tamaño. Además, dado que las proteínas van a estar sometidas a un campo eléctrico, es preciso eliminar la carga intrínseca de los polipéptidos, desnaturizarlos y otorgarles el mismo signo de carga. Para ello, se prepararon alícuotas de cada muestra, con la misma concentración de proteína total (10-20 μg) en tampón de lisis con inhibidor de proteasas. Además, se añadió tampón de carga 5X para asegurar la eliminación de la estructura cuaternaria de las proteínas (β -mercaptoetanol; Sigma-Aldrich; San Luis, MI, EEUU), uniformizar la carga eléctrica proporcionalmente a su longitud (SDS, *sodium dodecyl sulfate*; Sigma-Aldrich; San Luis, MI, EEUU) e incrementar su densidad para facilitar su carga en el gel. Por último, se agregó el colorante azul de bromofenol (*Azul de bromofenol*; Merk; Darmstadt, Alemania) (Tabla 6). Para cada tejido se empleó la cantidad de proteína más adecuada para los análisis de Western Blot (Tabla 7).

Tabla 6. Composición del tampón de carga 5X.

Tampón de carga 5X (pH 6.8)	
Reactivo	Cantidad/Volumen
SDS	2 g
Trizma-base	8 ml
β -mercaptoetanol	1 ml
Azul de bromofenol	4 mg
Glicerol	10 ml
Ajustar a pH 6.8 y enrasar con H ₂ O miliQ hasta 1L.	

Tabla 7. Concentración de proteína de los distintos tejidos.

Concentración de proteína de los tejidos	
Tejido	Concentración
BAT	8 μg
Hígado	10-20 μg
Hipotálamo	10 μg
Medio basal	10 μg
VMH	10 μg

11.1.4 WESTERN BLOT11.1.4.1 *Preparación de geles*

Las proteínas fueron separadas mediante electroforesis desnaturalizante en geles de poli(acrilamida) (SDS-PAGE). Dichos geles consisten en una estructura tridimensional, en forma de malla, constituida por la polimerización de acrilamida y bis-acrilamida (N, N-metilenobisacrilamida). El proceso de polimerización es catalizado por amonio persulfato (APS) (*Ammonium persulfate*; Sigma-Aldrich; San Luis, MI, EEUU) y TEMED (*N,N,N,N-tetramethylethylenediamina*; Sigma-Aldrich; San Luis, MI, EEUU). La concentración de acrilamida y bis-acrilamida (*30% Acrylamide/Bis Solution 29:1*; Bio-Rad; Hercules, CA, EEUU) en el gel determina el tamaño de los poros de la red tridimensional y el grado de migración de las proteínas en función de su tamaño. Los geles constan de dos fracciones: una fracción separadora y otra concentradora. La parte separadora se encarga de separar las proteínas, por lo que presenta un porcentaje de acrilamida diferente (6%, 8%, 10%, 12% o 15%) en función del peso molecular de la proteína de interés (Tabla 8). Sin embargo, la fracción concentradora, con un porcentaje fijo de acrilamida/bis-acrilamida (4%), tiene la función de agrupar las proteínas, de modo que la separación de las proteínas de las distintas muestras se produce de forma simultánea (Tabla 9).

Tras el montaje del soporte de los geles y la comprobación de que no existe pérdida de líquido, se procedió a añadir en primer lugar la parte separadora del gel. A continuación, se agregó isopropanol (*2-Propanol*; Sigma-Aldrich; San Luis, MI, EEUU) al 60% para nivelar el borde superior del gel y eliminar las burbujas de la superficie. Cuando el gel está polimerizado, se retiró el isopropanol y se lavó con H₂O destilada. Posteriormente, se secó el exceso de agua y se añadió la parte concentradora colocando los peines inmediatamente para formar los pocillos.

Tabla 8. Composición de los geles separadores de electroforesis.

Gel separador	Gel 6%	Gel 8%	Gel 10%	Gel 12%	Gel 15%
Reactivo	Volumen	Volumen	Volumen	Volumen	Volumen
H ₂ O destilada	5.3 ml	4.6 ml	4.0 ml	3.2 ml	2.3 ml
Acrilamida/bisacrilamida (30%)	2 ml	2.7 ml	3.3 ml	4 ml	5.0 ml
1.5 M Tris (pH 8.8)	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml
SDS 10%	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml
APS 10%	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml
TEMED	8 µl	6 µl	4 µl	4 µl	4 µl

Tabla 9. Composición del gel concentrador de electroforesis.

Gel concentrador 4%	
Reactivo	Volumen
H ₂ O destilada	3.4 ml
Acrilamida/bisacrilamida (30%)	830 µl
1.5 M Tris (pH 8.8)	630 µl
SDS 10%	50 µl
APS 10%	50 µl
TEMED	4 µl

11.1.4.2 Electroforesis

Los geles se colocaron en un kit de electroforesis (*Mini-PROTEAN Tetra Cell*; Bio-Rad; Hercules, CA, EEUU) y se sumergieron en tampón de electroforesis 1X (Tabla 10), asegurando que los geles quedasen bien cubiertos por el tampón. Previo paso a la carga de las muestras en los pocillos del gel, éstas se calentaron a 95°C durante 5-10 minutos en agitación suave. A continuación, se cargaron 16 µl de muestra en cada pocillo del gel, excepto en el primer pocillo, en el que se añadieron 3 µl de marcador de peso molecular (*Precision Plus Protein, cat 161-0374*; Bio-Rad; Hercules, CA, EEUU). Cabe mencionar que en todos los geles se cargaron siempre muestras de todos los grupos experimentales. Las muestras se sometieron a un campo eléctrico (voltaje constante de 100-120V y amperaje de 180 mA), conectando el kit de electroforesis a una fuente de energía (*PowerPac HC High Current Power Supply*; Bio-Rad; Hercules, CA, EEUU), induciendo así la migración de las proteínas desde el ánodo hacia el cátodo. La electroforesis se detuvo cuando el frente de migración llegó a una distancia aproximada de 1 cm del borde inferior del gel.

Tabla 10. Composición del tampón de electroforesis.

Tampón de electroforesis 5X	
Reactivo	Volumen/cantidad
Glicina	72 g
Trizima base	15 g
SDS	5 g
H ₂ O destilada	c.s.p. 1l

11.4.1.3 Transferencia

Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a un medio sólido, como una membrana de PVDF (*Polyvinylidene Fluoride Immobilon-P membrane*; Millipore; Burlington, MA, EEUU) para poder analizar la expresión de cada proteína. A tal efecto,

fueron sometidas a un campo eléctrico capaz de movilizar las proteínas hasta la membrana en la cual quedan absorbidas y donde posteriormente se incubarán los diferentes anticuerpos. Se empleó un sistema de transferencia de tipo semi-seca Trans-Blot Semy-dry Transference (*Extra thick BloT Paper*; Bio-Rad; Hercules, CA, EEUU). Las membranas, cortadas con unas dimensiones proporcionales a las del gel (8.5 cm x 6.5 cm), fueron activadas previamente sumergiéndolas en metanol, H₂O destilada y tampón de transferencia al 1X (Tablas 11 y 12) de forma consecutiva y durante 5 minutos en cada uno. Los papeles absorbentes (*Extra Thick Blot Paper*; Bio-Rad; Hercules, CA, EEUU) entre los que se van a situar la membrana y el gel durante la transferencia, se cortaron con las mismas dimensiones que la membrana y se sumergieron en tampón de transferencia para que a través de él pudiera crearse el campo eléctrico necesario para que se produjese la transferencia. Tras la activación de las membranas, tanto el gel como la membrana se colocaron entre dos papeles absorbente húmedos en el Trans-Blot Semy-dry Transference, evitando la formación de burbujas entre ellos con un rodillo para que la transferencia se efectuase correctamente. Ésta se realizó durante 2 horas a un voltaje de 25V y un amperaje constante de 250 mA conectando el sistema de transferencia a una fuente de energía (*PowerPac HC High Current Power Supply*; Bio-Rad; Hercules, CA, EEUU). El correcto funcionamiento de la transferencia se verificó tiñendo las membranas con colorante Rojo de Ponceau (*Ponceau S Red*; Sigma-Aldrich; San Luis, MI, EEUU). Dicha tinción se eliminó fácilmente lavando la membrana con tampón de lavado.

Tabla 11. Composición del tampón de transferencia 25X.

Tampón de transferencia 25X	
Reactivo	Volumen/cantidad
Glicina	36.5 g
Trizima base	72.5 g
SDS	4.5 g
H ₂ O destilada	c.s.p. 500 ml

Tabla 12. Composición del tampón de transferencia 1X.

Tampón de transferencia 1X	
Reactivo	Volumen/cantidad
Tampón de transferencia 25X	40 ml
Metanol	200 ml
H ₂ O destilada	c.s.p. 1 l

11.1.4.4 Inmunodetección de proteínas

Tras la transferencia, las membranas se incubaron en tampón de bloqueo (Tabla 13) durante 1 hora a temperatura ambiente para eliminar las uniones inespecíficas que presenta la membrana en aquellas zonas donde no existe proteína transferida. Posteriormente, se cortó la membrana tomando como referencia el marcador de peso molecular para aislar las diferentes proteínas a analizar. Cada fragmento de la membrana fue incubado con su correspondiente

anticuerpo primario diluido en tampón de bloqueo (Tabla 14) durante 1 hora a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C, en función de las especificaciones de cada anticuerpo. Transcurrido el tiempo de incubación con el anticuerpo primario, se retiró y se realizaron tres lavados de 5 minutos con tampón de lavado (Tablas 16 y 17) a temperatura ambiente. Seguidamente, los fragmentos de la membrana se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente (Tabla 15) diluido 1:5000 en tampón de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente. Para finalizar, se retiró el anticuerpo secundario y se realizaron tres lavados de 5 minutos con tampón de lavado. Cabe destacar que todo el proceso de inmunodetección se llevó a cabo en agitación suave.

Tabla 13. Composición del tampón de bloqueo.

Tampón de bloqueo	
Reactivo	Volumen/cantidad
BSA	3 g
Tampón de lavado	100 ml

Tabla 14. Relación de anticuerpos primarios utilizados y sus diluciones.

Anticuerpo	Casa comercial (Referencia)	Dilución
Mouse Anti- α -tubulin	Sigma-Aldrich (T5168)	1:5000
Mouse Anti- β -actin	Sigma-Aldrich (A5316)	1.5000
Rabbit Anti-ACC	Cell Signaling (3662S)	1:1000
Rabbit Anti-AMPK α	Cell Signaling (2532)	1:1000
Rabbit Anti-AMPK α 1	Millipore (07-350)	1:1000
Rabbit Anti-AMPK α 2	Millipore (07-363)	1:1000
Rabbit Anti-Phospho-ACC (Ser79)	Cell Signaling (3661L)	1:1000
Rabbit Anti-Phospho-AMPK α (Thr172) (40H9)	Cell Signaling (2535L)	1:1000
Rabbit Anti-PER2	ThermoFisher (PA5-89045)	1:1000
Rabbit Anti-VIP	ThermoFisher (PA5-78224)	1:1000
Rabbit Anti-UCP1	Abcam (ab10983)	1:5000

Tabla 15. Relación de anticuerpos secundarios utilizados y sus diluciones.

Anticuerpo	Casa comercial (Referencia)	Dilución
Anti-Mouse IgG, HRP-linked antibody	Cell Signaling (7076S)	1:5000
Anti-Rabbit IgG, HRP-linked antibody	Cell Signaling (7074S)	1.5000

Tabla 16. Composición del tampón de lavado 10X.

Tampón de lavado 10X (pH 7.6)	
Reactivo	Volumen/cantidad
Trizma base	24.2 g
NaCl	80 g
H ₂ O destilada	c.s.p. 1l

Tabla 17. Composición del tampón de lavado 1X.

Tampón de lavado 1X	
Reactivo	Volumen/cantidad
Tampón de lavado 10X	100 ml
Tween 20	1 ml
H ₂ O destilada	c.s.p. 1l

11.1.4.5 Revelado y fijación de la señal

El siguiente paso a seguir consiste en el revelado de la membrana, para lo cual las membranas se incubaron durante 3 minutos en oscuridad en un sustrato de revelado que detecta el Horseradish Peroxidase (*Pierce ECL Western Blotting substrate*; Thermo Scientific; Rockford, IL, EEUU) en una dilución 1:1 de cada uno de los reactivos. Tras el tiempo de incubación, las membranas se colocaron en un casete de revelado (*Hypercassette*; Amersham Biosciences GE Healthcare Life Sciences; Buckinghamshire, Reino Unido) entre dos papeles de acetato, eliminando las burbujas. El proceso de revelado se llevó a cabo en una cámara oscura donde se introdujo encima de la membrana una película de revelado sensible a la luz (*Fuji Medical X-Ray Film*; Fujifilm Corporation; Tokio, Japón), cerrándose el casete a continuación. La película se dejó exponer durante un tiempo determinado en función de la proteína de estudio. Después se retiró la película y se sumergió en una solución de revelado (dilución 1:10) (*Developer/Replenisher G150*; Agfa-Gevaert Group; Dubendorf, Suiza) hasta que se visualizó la señal. Seguidamente, se sumergió en un líquido fijador (dilución 1:5) (*Manual fixing bath G354*; Agfa-Gevaert Group; Dubendorf, Suiza) durante unos segundos para fijar la señal. Por último, se lavó en agua para eliminar los restos de los líquidos y se dejó secar. Una vez secas las películas, se marcaron los pesos moleculares del marcador para identificar las proteínas según su peso molecular. Los fragmentos de la membrana se guardaron en papel Whatman (*3MM Chromatography paper*; GE Healthcare; Chicago, EEUU).

11.1.4.6 Cuantificación

La cuantificación se realizó midiendo la densidad óptica de la señal de cada muestra, a partir de las imágenes escaneadas (resolución 600 ppp, *HP Scanjet G2710*; Hewlett-Packard; CA, EEUU) de las películas autorradiografiadas, con el software informático ImageJ (*ImageJ-1.40g software*; Wayne Rasband; NIH, EEUU). En la imagen escaneada, se seleccionó un área fija rectangular del tamaño adecuado para todas las señales de cada una de las muestras, midiéndose la densidad óptica de cada una de las señales, así como una zona adyacente que fue considerada como fondo. Cada medición de densidad óptica se corrigió por la medición de la densidad óptica del fondo para obtener la señal real. Finalmente, la señal de cada una de las muestras fue representada en relación a la señal obtenida para el control (β -actina o α -tubulina) de esa misma muestra.

11.1.4.7 *Estripado*

En el caso de aquellas proteínas con peso molecular igual o muy similar, las cuales no se pueden separar cortando la membrana, se llevó a cabo el estripado del fragmento de la membrana correspondiente. De este modo, se eliminó el anticuerpo primario y secundario, y se incubó de nuevo con otro anticuerpo primario. Para realizar el estripado, las membranas se incubaron a 55°C durante 40 minutos en una solución de estripado (Tabla 18) en agitación fuerte y a continuación se realizaron 3 lavados de 15 minutos con tampón de lavado. Finalmente, fue necesario bloquear de nuevo la membrana antes de iniciar la incubación con el anticuerpo primario.

Tabla 18. Composición de la solución de estripado.

Solución de estripado pH 2.2	
Reactivo	Volumen/cantidad
Glicina 2 M	150 g
Tween 20	10 ml
SDS 20%	50 ml
H ₂ O destilada	c.s.p. 1 l

11.2 PCR PARA GENOTIPADO

11.2.1 EXTRACCIÓN DE ADN

Para la extracción de ADN se utilizó un pequeño fragmento de la cola del ratón, de aproximadamente 2-3 mm. Se añadieron 600 µl de NaOH a 0.6 M y se calentaron a 100°C durante 15 minutos para conseguir la degradación del tejido. A continuación, se mantuvieron a temperatura ambiente durante 10 minutos y se le añadieron 100 µl de Tris-HCl.

11.2.2 AMPLIFICACIÓN POR PCR CONVENCIONAL

El genotipado requiere la realización del método de PCR estándar, en el cual la región de ADN de interés se amplifica mediante un set específico de cebadores (Tabla 19) y unas condiciones de temperatura y número de ciclos determinados para el alelo objeto de estudio.

Tabla 19. Set de cebadores para el genotipado.

Alelo	Cebador	Secuencia
AMPK γ 2 loxP	Forward 37331	5'-TAG CTT GTT GTG GGT TGC TG-3'
	Reverse 37332	3'-CGG GGA TGT AGA CAA AAC CT-5'
GLAST CreERT2	Forward F8	5'-GAG GCA CTT GGC TAG GCT CTG AGG A-3'
	Reverse R3	3'-GAG GAG ATC CTG ACC GAT CAG TTG G-5'
	Control positivo interno CER1	5'-GGT GTA CGG TCA GTA AAT TGG ACA T-3'

Para el genotipado del alelo AMPK γ 2 floxeado se empleó un volumen final de 25 μ l con los siguientes componentes:

- 12.5 μ l de Kapa2G Fast HotStart Ready Mix a 2X (*Kapa2G Fast HotStart ReadyMix PCR Kit*; Kapa Biosystems; Ciudad del Cabo, Sudáfrica) para una concentración final de 1X.
- 1.25 μ l de cebador *forward* 37331 a 10 μ M (Eurofins Genomics; Ebersberg, Alemania) para una concentración final de 0.5 μ M.
- 1.25 μ l de cebador *reverse* 37332 a 10 μ M (Eurofins Genomics; Ebersberg, Alemania) para una concentración final de 0.5 μ M.
- 2 μ l de ADN.
- 8 μ l de agua ultrapura autoclavada.

Las condiciones de la PCR se detallan en la siguiente tabla (Tabla 20):

Tabla 20. Condiciones de la PCR para el genotipado de los ratones AMPK γ 2 floxeado.

Paso	Temperatura	Duración	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95 °C	3 min	1
Desnaturalización	95 °C	10-15 s	25-40
Alineamiento	60°C	10-15 s	
Extensión	72°C	1-15 s/kb	
Extensión final	72°C	1 min/kb	1

Para el genotipado del alelo GLAST Cre se utilizó un volumen final de 11.4 μ l con los siguientes componentes:

- 1.25 μ l de tampón Dream Taq a 10X (Thermo Scientific; Waltham, MA, EEUU) para una concentración final de 1X.
- 0,25 μ l de dNTPs a 10 mM (Invitrogen; Carlsbad, CA, EEUU) para una concentración final de 0.20 mM.
- 0,25 μ l de cebador *forward* F8 a 20 μ M (Eurofins Genomics; Ebersberg, Alemania).
- 0,25 μ l de cebador *reverse* R3 a 20 μ M (Eurofins Genomics; Ebersberg, Alemania).
- 0.25 μ l de control positivo interno CER1 a 20 μ M (Eurofins Genomics; Ebersberg, Alemania).
- 2.5 μ l de betaína (Sigma-Aldrich; San Luis, MI, EEUU).
- 0,15 μ l de DreamTaq polimerasa a 5 U/ μ l (Thermo Scientific; Waltham, MA, EEUU).
- 1 μ l de ADN.
- 5.5 μ l de H₂O ultrapura autoclavada.

Las condiciones de la PCR se detallan en la siguiente tabla (Tabla 21):

Tabla 21. Condiciones de la PCR para el genotipado de los ratones GLAST Cre.

Paso	Temperatura	Duración	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	94 °C	2 min	1
Desnaturalización	94 °C	20 s	35
Alineamiento	61°C	20 s	
Extensión	72°C	30 s	
Extensión final	72°C	5 min	1

Al finalizar la PCR se añadieron 3 µl de tampón de carga 5 mM (*Loading Dye*; Thermo Scientific; Waltham, MA, EEUU) para una concentración final de 1 mM.

11.2.3 ELECTROFORESIS DE AGAROSA

La separación de los fragmentos amplificados se llevó a cabo a través de geles de agarosa (*Agarose*; Sigma-Aldrich; San Luis, MI, EEUU), cuya concentración varía según el tamaño de los fragmentos amplificados. De este modo, para los fragmentos de AMPK γ_2 se empleó una concentración de 1% de agarosa y para los de GLAST Cre de un 1%. La agarosa se disolvió en 100 ml de tampón de electroforesis TAE (TRIS 40 mM pH 7.6; Ácido acético 20 mM y EDTA 1 mM) aplicando calor en un microondas poco a poco. Una vez disuelta, se añadieron 5 µl de solución de tinción de ácidos nucleicos (*Red Safe*; iNtRON biotechnology; Corea del Sur). Posteriormente, se trasvasó a un molde para geles de agarosa y se colocó un peine para formar los pocillos. Una vez solidificado el gel, se cargaron las muestras y 5 µl de marcador de peso molecular (*DNA Ladder*; Invitrogen; Carlsbad, CA, EEUU). La electroforesis se realizó a un voltaje de 100 V durante 1 hora, sumergido en tampón de electroforesis TAE. La visualización de los fragmentos de ADN requirió la utilización de un transiluminador de luz ultravioleta (*Gel Doc 1000*; Bio-Rad; Hercules, CA, EEUU).

11.3 DOBLE INMUNOFUORESCENCIA

La realización de la doble inmunofluorescencia en hipotálamo requiere la perfusión intracardiaca de los animales con suero fisiológico seguido de PFA 4% (ver en detalle en el apartado “Perfusión intracardiaca” de la sección “Material y métodos”) (Tabla 22). Los cerebros fueron post-fijados en PFA 4% durante un máximo de 24 horas y, a continuación, se cambiaron a una solución de sacarosa al 30%. Tras su congelación a -80°C se cortaron en secciones de 30 µm de ancho en el criostato (*Leica CMI860 cryostat*; Leica biosystems;

Barcelona, España), seleccionando aquellas pertenecientes a la región del hipotálamo (entre -1.34 mm y -1.94 mm respecto al bregma). Los cortes fueron lavados con PBS tres veces durante 10 minutos y luego se realizó el *antigen retrieval* (desenmascaramiento de antígenos) incubándolos en 1X tampón de citrato (1:10) 10 mM pH6 a 95°C durante 10 minutos (Tabla 23). Tras dejarlos enfriar a temperatura ambiente, se volvieron a realizar tres lavados con PBS durante 10 minutos y se permeabilizaron con PBS 1X-Triton X-100 al 0.3% durante 10 minutos. A continuación, se llevaron a cabo dos lavados en PBS 1X-Triton X-100 al 0.1%. Posteriormente, los cortes se bloquearon con solución de bloqueo, constituida por suero de cabra (NGS, *normal goat serum*) al 5% en PBS 1X-Triton X-100 al 0.1%, durante 1 hora a temperatura ambiente.

Una vez bloqueados, los cortes fueron incubados a 4°C durante toda la noche con el anticuerpo primario (Tabla 24). Al día siguiente, los cortes fueron lavados cuatro veces durante 10 minutos con PBS 1X-Triton X-100 al 0.1%, e incubados durante 2 horas a temperatura ambiente en oscuridad con los anticuerpos secundarios (Tabla 25). Finalmente, se realizaron tres lavados de 10 minutos con PBS 1X-Triton X-100 al 0.1% y otro lavado de 10 minutos con PBS 1X, para a continuación incubarlos con solución Hoechst (*Hoeschst solution*; Thermo Scientific; Rockford, IL, EEUU) 1:300 diluido en PBS 1X. Tras lavar una vez con PBS 1X durante 10 minutos, los cortes fueron montados con la solución de montaje (*Prolong Gold*; Thermo Scientific; Rockford, IL, EEUU). Paralelamente, se repitió el mismo proceso, pero sin el anticuerpo primario en los controles negativos para asegurar que no existe señal de los anticuerpos secundarios.

Las imágenes se adquirieron utilizando un microscopio de fluorescencia (*Thunder Imager*; Leica biosystems; Barcelona, España) y un microscopio confocal (*Leica TCS SP-5-X*; Leica biosystems; Barcelona, España) con las mismas condiciones para todas ellas. La cuantificación y el análisis de las imágenes se llevaron a cabo utilizando el software LAS X (*Leica Application Suite X*; Leica biosystems; Barcelona, España).

Tabla 22. Composición del paraformaldehido 4%.

Paraformaldehido 4% pH 7.2	
Reactivo	Volumen/cantidad
PFA	40 g
NaOH 2N	1 gota/ml
PBS 10X	100 ml
H ₂ O destilada	c.s.p. 1 l

Tabla 23. Composición del tampón citrato sódico 10 mM.

Tampón de citrato sódico 10mM pH 6.0	
Reactivo	Volumen/cantidad
Citrato trisódico dihidrato	1.47 g
H ₂ O destilada	c.s.p. 500 ml

Tabla 24. Relación de anticuerpos primarios utilizados y sus diluciones.

Anticuerpo	Casa comercial (Referencia)	Dilución
Rabbit Anti-Phospho-ACC α	ThermoFisher (PA5-17725)	1:100
Mouse Anti-GFAP	Sigma (G3893)	1:1000
Rabbit Anti-PER2	ThermoFisher (PA5-89045)	1:200
Rabbit Anti-VIP	ThermoFisher (PA5-78224)	1:200

Tabla 25. Relación de anticuerpos secundarios utilizados y sus diluciones.

Anticuerpo	Casa comercial (Referencia)	Dilución
Goat Anti-Mouse Alexa-647	ThermoFisher (A21235)	1:1000
Goat Anti-Rabbit Alexa-488	ThermoFisher (A11008)	1:1000

11.4 DETERMINACIONES SÉRICAS

Los niveles de triglicéridos y colesterol en suero se determinaron utilizando kits Spinreact (*Triglicéridos. GPO-POD. Enzimático colorimétrico* y *Colesterol. CHOD-POD. Enzimático colorimétrico*; Spinreact SA, San Esteve de Bas, España).

11.5 ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE LOS TEJIDOS

El análisis histológico de los distintos tejidos requirió un procesamiento diferente de las muestras según la técnica a seguir. Las muestras que iban a ser incluidas en parafina, se introdujeron durante la eutanasia de los animales en casetes de histología, que se embebieron en formalina al 10% para su posterior inclusión en parafina. A continuación, se llevaron a cabo cortes histológicos, distribuidos en portaobjetos.

11.5.1 INMUNOHISTOQUÍMICA

Las secciones del BAT extraídas en el momento de la eutanasia de los animales se fijaron en formaldehído tamponado al 10% y se deshidrataron en concentraciones crecientes de alcohol para su estudio histológico, montaje en xileno e inmersión en parafina. Para la inmunohistoquímica de UCPI, los bloques de parafina se cortaron en secciones de 3 μ m que se desparafinaron en xileno, se rehidrataron y enjuagaron en H₂O destilada. Después las secciones se incubaron durante toda la noche con el anticuerpo primario (anti-UCPI, dilución 1:500; Abcam; Cambridge, Reino Unido), se lavaron e incubaron con el anticuerpo secundario ENVISION (una mezcla de anti-Rabbit y anti-Mouse; Dako; Glostrup, Dinamarca).

11.5.2 ADQUISICIÓN Y ANÁLISIS DE IMÁGENES

Una vez fijadas las histologías, las imágenes se tomaron en un microscopio óptico conectado a una cámara Olympus XC50 (Olympus Corporation; Tokio, Japón) a 20X y a 40X. Para el análisis cuantitativo de las tinciones, se tomaron cinco fotografías de cada corte histológico. Las imágenes obtenidas fueron procesadas mediante el software ImageJ (*ImageJ-1.40g software*; Wayne Rasband; NIH, EEUU). Las imágenes se dividieron en canales separados de color, se ajustaron los límites comprobando las imágenes de todas las muestras y se realizó un análisis de partículas. En el caso de la tinción Oil red O, para calcular la cantidad de lípidos acumulados, se contaron el número de células por imagen. Para la cuantificación del tamaño y del número de adipocitos, se tomaron cinco fotografías representativas de cada sección. Se analizó el área de los adipocitos utilizando el software ImageJ (*ImageJ-1.40g software*; Wayne Rasband; NIH, EEUU).

11.6 ESTADÍSTICA

Los resultados obtenidos en los procedimientos experimentales se representaron en función de su control, donde el valor representado se corresponde con la media (M) y el error con la desviación estándar de la media (SEM) ($\text{media} \pm \text{SEM}$). En aquellos procedimientos en los que se monitorizaron parámetros tales como el peso corporal de los animales y/o la ingesta, se representaron los valores brutos sin realizar ningún tipo de relación porcentual de comparación. El tamaño muestral de las poblaciones de cada experimento se detalla en los pies de figura de los resultados y se representa con la letra “n”.

Los datos obtenidos en todos los experimentos se analizaron mediante el software estadístico Microsoft Excel (Microsoft Office 2021) y GraphPad Instad para Windows (GraphPad Instad® Software. V8), el cual también se empleó para elaborar las figuras para la presente tesis doctoral.

Primeramente, se aplicó un test de normalidad para confirmar la normalidad del conjunto de datos. Como hipótesis nula se planteó que la muestra del conjunto de datos provenía de una población normalmente distribuida, utilizando el test de Shapiro-Wilks (Kao & Green, 2008) para conjuntos de muestras de $n \leq 20$ y ≥ 7 . El test Kolgomorov-Smirnof se empleó cuando el $n \leq 6$. Cuando las poblaciones analizadas mostraron una distribución normal, se realizaron test estadísticos paramétricos como el T-test. Si la población no sigue una distribución normal, se aplican test estadísticos no paramétricos, situación que no se produjo durante el análisis de datos de esta tesis doctoral.

En segundo lugar, se emplearon dos tests paramétricos distintos para el contraste de hipótesis según las muestras y/o grupos experimentales analizados. De este modo, en los procedimientos con dos muestras o grupos experimentales que seguían una distribución normal, se utilizó el t-test que compara las medias de dos poblaciones desapareadas asumiendo que siguen una distribución normal gaussiana. Sin embargo, en los experimentos

con tres o más muestras o grupos experimentales que seguían una distribución normal, se aplicó el análisis de la varianza (ANOVA, *analysis of variance*) para establecer si había diferencia entre las medias de los grupos. Tras la realización del test y aceptada la hipótesis alternativa que indica que sí existen diferencias entre las medias de los grupos, se llevó a cabo un test post-hoc de Bonferroni para determinar qué medias dieron lugar a la significación. Se consideraron significativos todos los resultados con una $P < 0.05$, muy significativos con $P < 0.01$ y extremadamente significativos con $P < 0.001$.

En cuanto a las acrofases, se obtuvieron adecuando la actividad media a una curva cosinor utilizando el período de 24 horas. Brevemente, los datos de actividad locomotora se ajustaron mediante una regresión no lineal por mínimos cuadrados con la siguiente ecuación:

$y = A + B \cos [2\pi \frac{t-C}{\tau}]$, donde A es la media ajustada al ritmo, B es la amplitud del ritmo, C es la fase dada en tiempo circadiano que representa el tiempo de máxima expresión, y t es el tiempo circadiano.

La significación estadística de la expresión rítmica de la actividad locomotora y de los ciclos metabólicos se determinaron mediante análisis Cosinor (Barca Mayo et al., 2019; Barca-Mayo et al., 2017, 2020; Riccitelli et al., 2022).

Por último, con el fin de establecer los animales y/o muestras atípicas se utilizó el *GraphPad Software Outlier calculator*, que utiliza el test de Grubbs para determinar los valores significativamente atípicos. También fueron excluidos de los resultados aquellos animales que presentaban estereotipias, dolor o mal aspecto externo.

RESULTADOS

1 LA DELECIÓN DE AMPK γ 2 EN ASTROCITOS GLAST-POSITIVOS ACTIVA CONSTITUTIVAMENTE AMPK

Con el propósito de llevar a cabo el estudio planteado en esta tesis doctoral, se estableció un modelo de ratón que permitiera la eliminación controlada de AMPK γ 2 en astrocitos. Para lograr esto se implementó un sistema Cre/lox que posibilita la eliminación selectiva de AMPK γ 2 en los astrocitos que expresan la proteína GLAST. Es importante mencionar que los progenitores neuronales, los cuales desempeñan un papel crucial en la generación de nuevas neuronas durante el desarrollo, también expresan la proteína GLAST (Goldman, 2003). Para evitar posibles interferencias durante el desarrollo neuronal, se diseñó este modelo de ratón de manera que la eliminación de AMPK γ 2 pudiera ser inducida en ratones adultos mediante la administración de Tx, sin que ello repercutiera en el desarrollo natural de las neuronas.

Estudios previos han demostrado que la línea GLAST-CreER^{T2} induce recombinación en un gran subconjunto de astrocitos (60-80%), correspondiendo en su frecuencia a los astrocitos que expresan GLAST de forma endógena en la corteza y el estriado (Mori et al., 2006). Además, se ha demostrado que la recombinación mediada por Cre en ratones adultos GLAST:Cre-IRES-hrGFP solo se produce en el 0.1% de las neuronas (Mori et al., 2006), confirmando así la recombinación específica de astrocitos. Además, diferentes estudios de nuestro grupo demuestran que en ratones adultos GLAST-CreER^{T2} se induce recombinación en los astrocitos del SCN y de otros núcleos hipotalámicos (Barca-Mayo et al., 2017, 2020; Luengo-Mateos et al., 2023), de otras áreas cerebrales (Buffo et al., 2008; Götz et al., 2015) y de la retina (Riccitelli et al., 2022).

Estudios previos demostraron que las mutaciones que inactivan AMPK γ 2 provocan la activación constitutiva de AMPK (Yavari et al., 2016). Este fenómeno conlleva una serie de cambios en la célula, como la fosforilación e inhibición de la enzima ACC, una de las principales dianas de AMPK (Yavari et al., 2016). Con el fin de validar la recombinación de AMPK γ 2 en nuestro modelo, evaluamos los niveles de pAMPK y pACC en el hipotálamo de ratones control y mutantes (*AMPK γ 2cKO*) transcurridas 18 semanas desde el tratamiento con Tx. Como era de esperar, se observó un incremento significativo de los niveles de pACC (Figura 18A) y en el ratio pACC/ACC en el hipotálamo de los machos *AMPK γ 2cKO* (Figura 18B). Por otro lado, aunque se detectó un ligero aumento en los niveles de pAMPK en los mutantes no alcanzó diferencias significativas (Figura 18A). No obstante, observamos una disminución significativa de los niveles de AMPK α 1 en el hipotálamo de los ratones *AMPK γ 2cKO* (Figura 18A), dando lugar a un aumento significativo de la ratio pAMPK/AMPK α 1 (Figura 18C). Además, los niveles de AMPK α 2 estaban significativamente incrementados en los mutantes en comparación con los controles (Figura 18A).

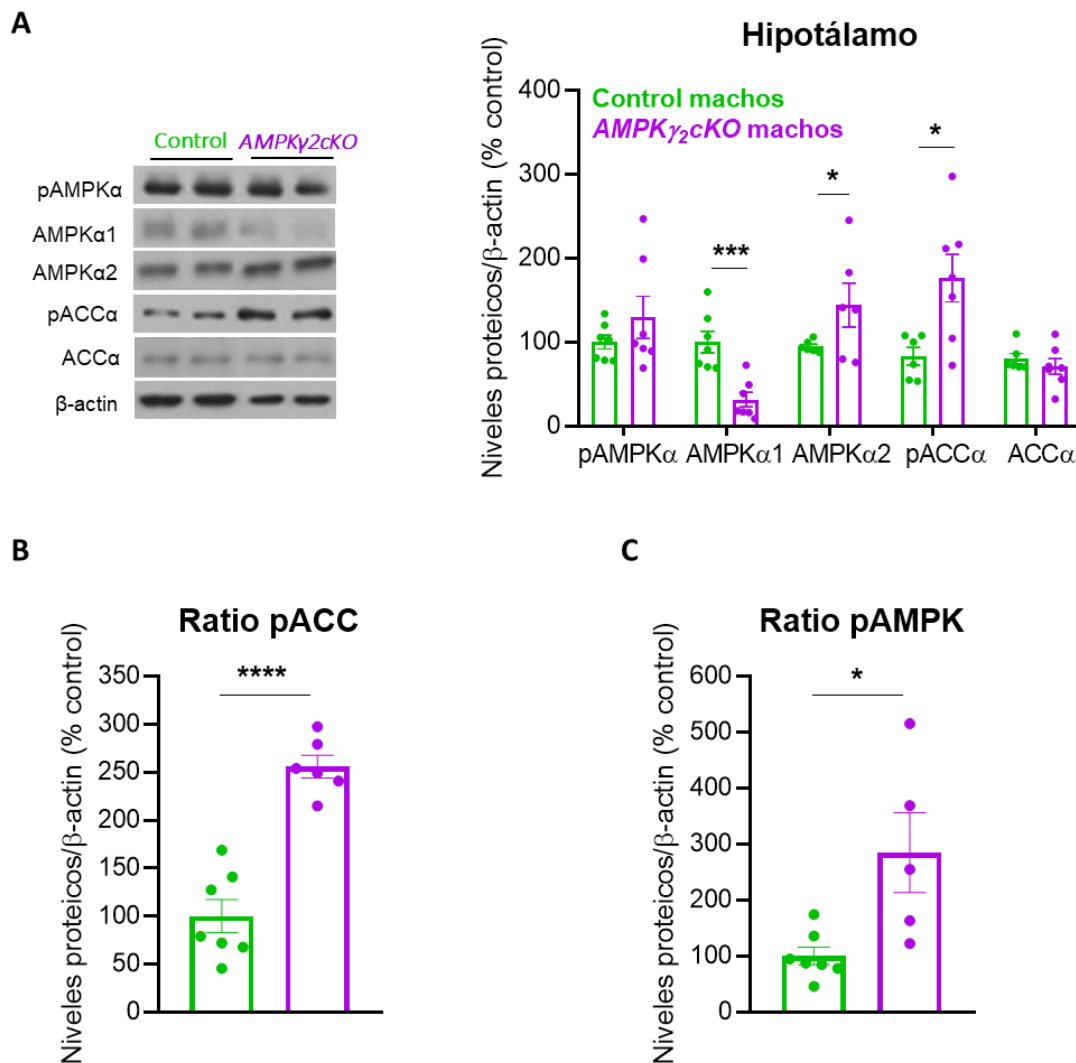


Figura 18. Efecto de la eliminación de AMPK γ 2 en los astrocitos GLAST positivos en la ruta de AMPK en el hipotálamo. (A) Niveles proteicos de la ruta de AMPK en el hipotálamo en machos control y AMPK γ 2cKO (n=7). Los datos están expresados como media \pm SEM (test t-Student, *p<0.05 y ***p<0.001 vs control). (B) Niveles proteicos del ratio pACC/ACC en el hipotálamo en machos control y AMPK γ 2cKO (n=5-7). Los datos están expresados como media \pm SEM (test t-Student, ****p<0.0001 vs control). (C) Niveles proteicos del ratio pAMPK/AMPK α 1 en el hipotálamo en machos control y AMPK γ 2cKO (n=5-7). Los datos están expresados como media \pm SEM (test t-Student, *p<0.05 vs control).

2 LA ELIMINACIÓN DE AMPK γ 2 EN ASTROCITOS ALTERA LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA EN MACHOS Y HEMBRAS

Con el propósito de examinar el impacto de la activación constitutiva de AMPK en los astrocitos sobre el balance energético, evaluamos el peso corporal de ratones control y mutantes en una dieta STD durante 25 semanas desde el tratamiento con Tx. Es bien conocido que existe un marcado dimorfismo sexual en condiciones patológicas como la obesidad, específicamente en relación con la acumulación de grasa, mayormente debido a factores hormonales (Palmer & Clegg, 2015). Además, considerando que los astrocitos muestran diferencias de sexo en el transcriptoma y en sus funciones (Chowen & García-Segura, 2021; Luengo-Mateos et al., 2023), evaluamos la posibilidad de que existan fenotipos distintos en ratones hembra y machos. Nuestros resultados indican que los ratones macho *AMPK γ 2cKO* experimentaban un aumento de peso corporal en comparación con sus hermanos de camada a partir de la undécima semana tras la administración de Tx (Figura 19A). En el caso de las hembras, se observaron diferencias significativas en el peso corporal a partir de la vigésimo primera semana tras la inyección con Tx (Figura 20A). Este aumento de peso corporal en los machos se asoció con un incremento tanto en la masa grasa como en la masa magra (Figura 19B). Por el contrario, en el caso de las hembras, no se evidenciaron diferencias en la adiposidad ni en la masa magra (Figura 20B). Esto posiblemente se deba al momento en que se analizó la composición corporal, que fue en la vigésima semana después del tratamiento con Tx, justo antes de la aparición de los cambios en el peso corporal. Siendo necesario repetir el análisis, en futuros experimentos, en el momento apropiado para estudiar el mecanismo en detalle.

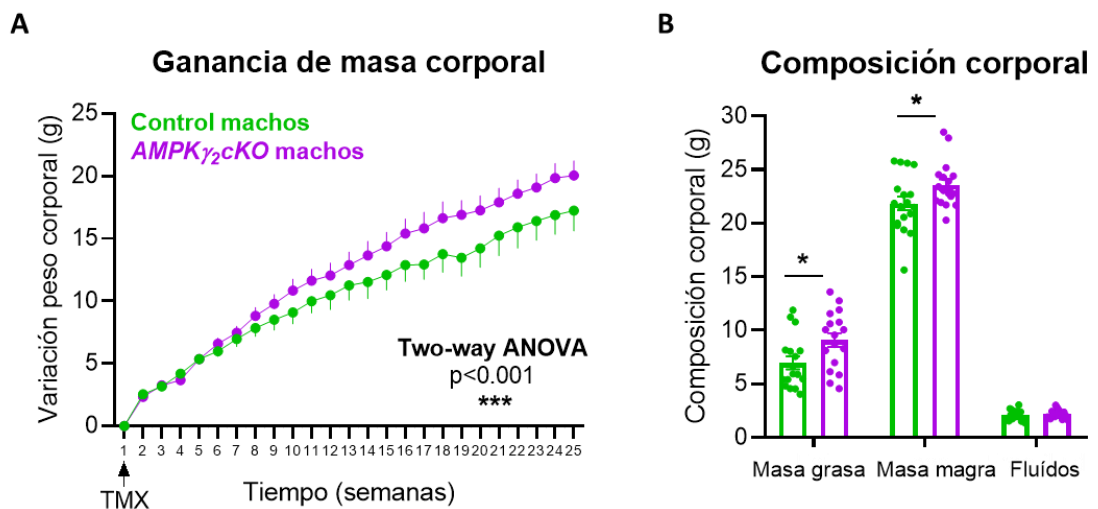


Figura 19. Efecto de la eliminación de AMPK γ 2 en los astrocitos GLAST positivos en el balance energético de los machos. (A) Ganancia de masa corporal de machos control y *AMPK γ 2cKO* (n=9-10). Los datos están expresados como media \pm SEM (Two-way ANOVA, *** $p < 0.001$ vs control). (B) Composición corporal de machos control y *AMPK γ 2cKO* 20 semanas después de la administración de Tx (n=17-19). Los datos están expresados como media \pm SEM (test t-Student, * $p < 0.05$ vs control).

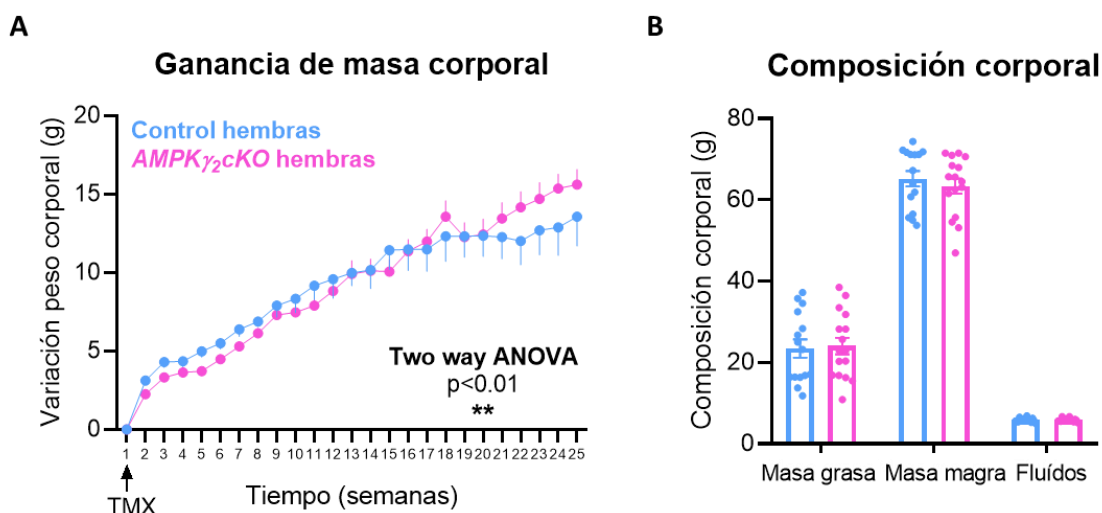


Figura 20. Efecto de la eliminación de AMPK γ_2 en los astrocitos GLAST positivos en el balance energético de las hembras. (A) Ganancia de masa corporal de hembras control y AMPK γ_2 cKO (n=9-15). Los datos están expresados como media \pm SEM (Two-way ANOVA, **p<0.01 vs control). (B) Composición corporal de hembras control y AMPK γ_2 cKO 20 semanas después de la administración de Tx (n=15-16). Los datos están expresados como media \pm SEM.

Dado que existe conocimiento previo sobre el papel regulador de AMPK en el metabolismo del tejido adiposo en ambos sexos (Daval et al., 2006), y considerando el aumento en la adiposidad observado en los ratones macho AMPK γ_2 cKO, se decidió investigar los niveles de triglicéridos y colesterol en el suero de los ratones control y AMPK γ_2 cKO a las 18 semanas después del tratamiento con Tx. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en ninguno de los casos entre los ratones AMPK γ_2 cKO y sus compañeros de camada (Figura 21 y 22).

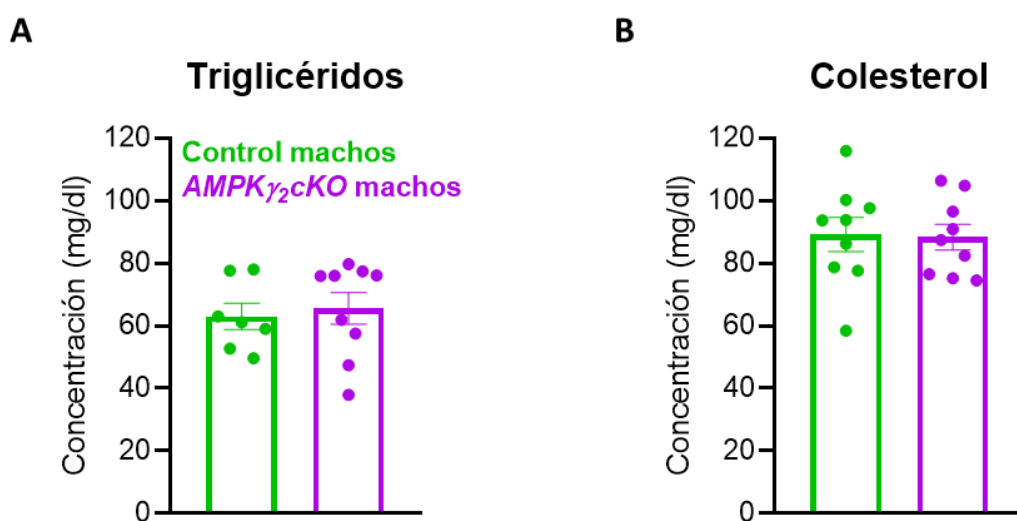


Figura 21. Efecto de la eliminación de AMPK γ_2 en los astrocitos GLAST positivos en los niveles circulantes de triglicéridos y colesterol de los machos. (A) Concentración de triglicéridos y (B) colesterol en el suero de machos control y AMPK γ_2 cKO (n=9). Los datos están expresados como media \pm SEM.

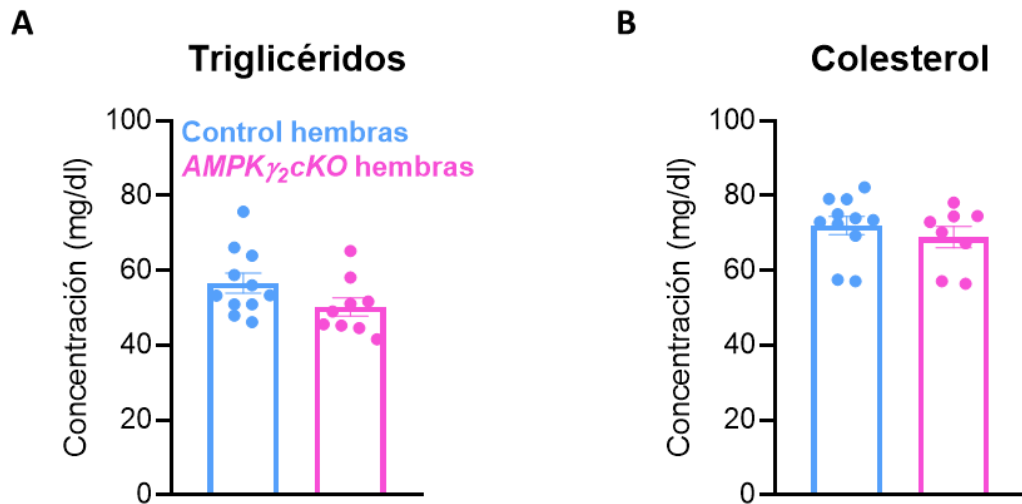


Figura 22. Efecto de la eliminación de AMPK γ_2 en los astrocitos GLAST positivos en los niveles circulantes de triglicéridos y colesterol de las hembras. (A) Concentración de triglicéridos y (B) colesterol en el suero de hembras control y AMPK γ_2 cKO (n=9-11). Los datos están expresados como media \pm SEM.

La ingesta alimentaria se evaluó durante el día y la noche transcurridas 15 semanas del tratamiento con Tx, con el objetivo de establecer si el aumento en el peso corporal de los ratones mutantes estaba vinculado a cambios en la ingesta. Nuestros resultados indican que los ratones macho mutantes consumían una cantidad mayor de alimento durante el período de oscuridad en comparación con los ratones control (Figura 23A). En el caso de las hembras AMPK γ_2 cKO, no se detectaron diferencias significativas en comparación con sus compañeras de camada (Figura 24A). En resumen, los resultados sugieren que el aumento en el peso corporal de los ratones macho mutantes está asociado con una mayor ingesta de alimento durante la noche.

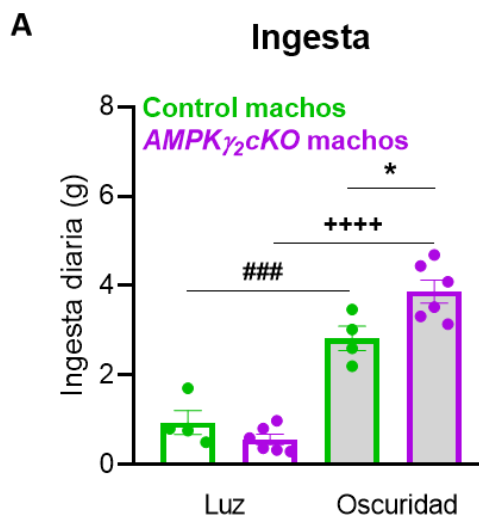


Figura 23. Efecto de la eliminación de AMPK γ_2 en los astrocitos GLAST positivos en la ingesta de los machos. (A) Ingesta en el ciclo de luz y en el ciclo de oscuridad de machos control y AMPK γ_2 cKO (n=4-6). Los datos están expresados como media \pm SEM (One-way ANOVA, *p<0.05 vs control, ###<0.001 control luz vs control oscuridad, ++++p<0.0001 AMPK γ_2 cKO luz vs AMPK γ_2 cKO oscuridad).

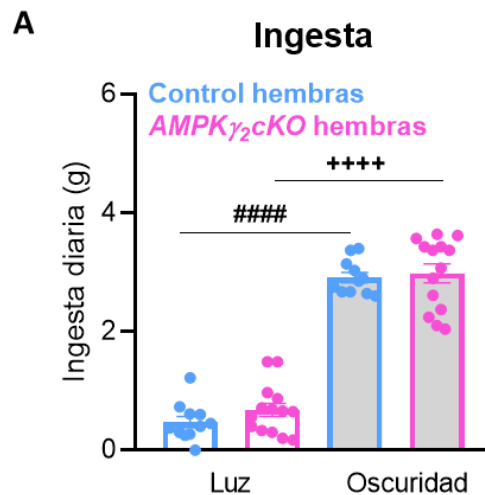


Figura 24. Efecto de la eliminación de AMPK γ 2 en los astrocitos GLAST positivos en la ingesta de las hembras. (A) Ingesta en el ciclo de luz y en el ciclo de oscuridad de machos y hembras control y AMPK γ 2cKO (n=11-14). Los datos están expresados como media \pm SEM (One-way ANOVA, #####<0.001 control luz vs control oscuridad, ++++p<0.0001 AMPK γ 2cKO luz vs AMPK γ 2cKO oscuridad).

A continuación, examinamos detalladamente el impacto de la eliminación de AMPK γ 2 en los astrocitos GLAST-positivos sobre la función del BAT tanto en ratones macho como hembras, 18 semanas después de la administración de Tx. Nuestros resultados revelaron que la delección de AMPK γ 2 en astrocitos GLAST-positivos no provocó cambios significativos en la temperatura rectal ni en la temperatura del BAT en machos (Figura 25 A y 25B). Además, el análisis molecular del BAT no mostró cambios en la expresión de UCP1, un marcador clave de la termogénesis (Figura 25C). En contraste, en las ratonas hembras mutantes se observó un descenso significativo tanto en la temperatura rectal como en la temperatura del BAT (Figura 26A y 26B). Además, se evidenció una disminución de los niveles proteicos de UCP1 en el BAT, determinado por Western Blot, en comparación con sus compañeros de camada (Figura 26C).

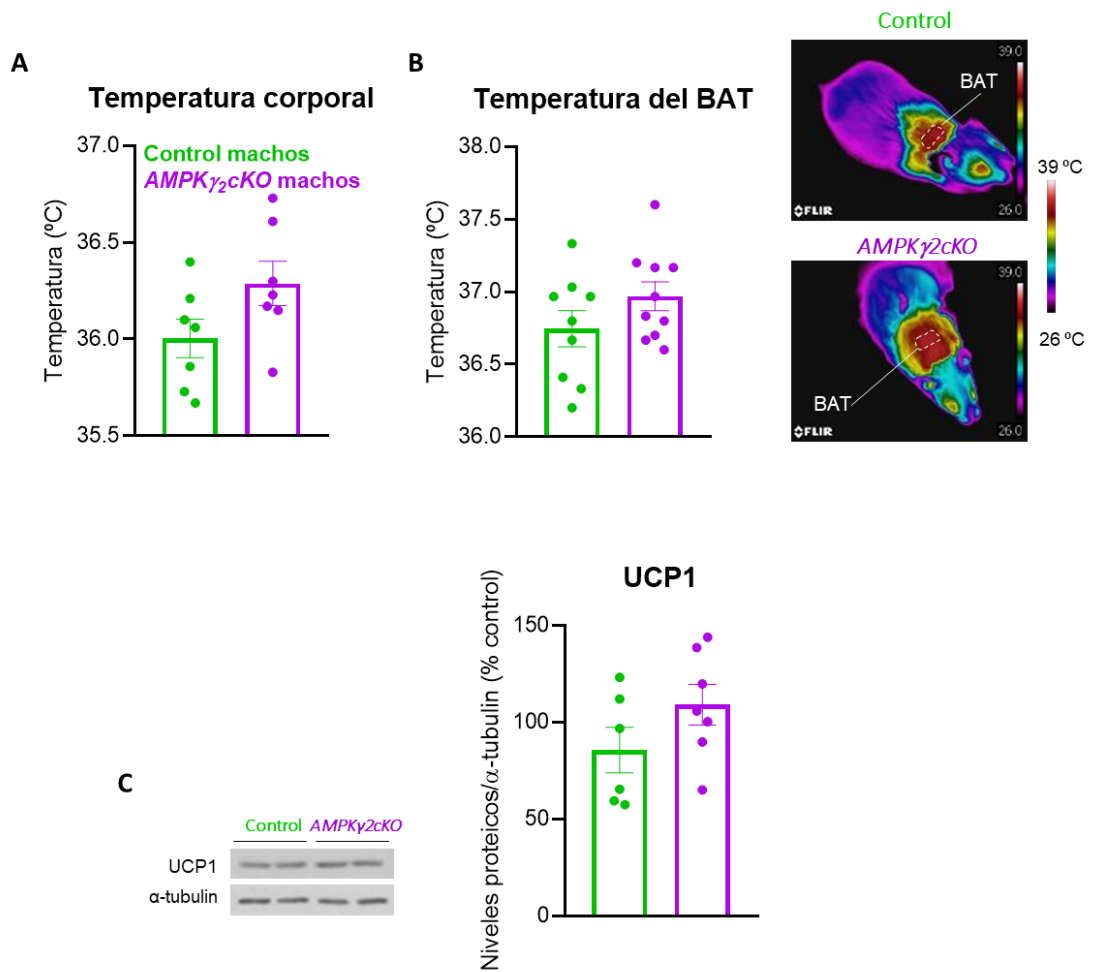


Figura 25. Impacto de la eliminación de AMPK γ 2 en los astrocitos GLAST positivos en la termogénesis de los ratones macho. (A) Temperatura corporal de machos control y AMPK γ 2cKO (n=7). Los datos están expresados como media \pm SEM. (B) Temperatura del área del BAT de machos control y AMPK γ 2cKO (n=10). Los datos están expresados como media \pm SEM. (C) Niveles proteicos de UCP1 en el BAT de machos control y AMPK γ 2cKO (n=7). Los datos están expresados como media \pm SEM.

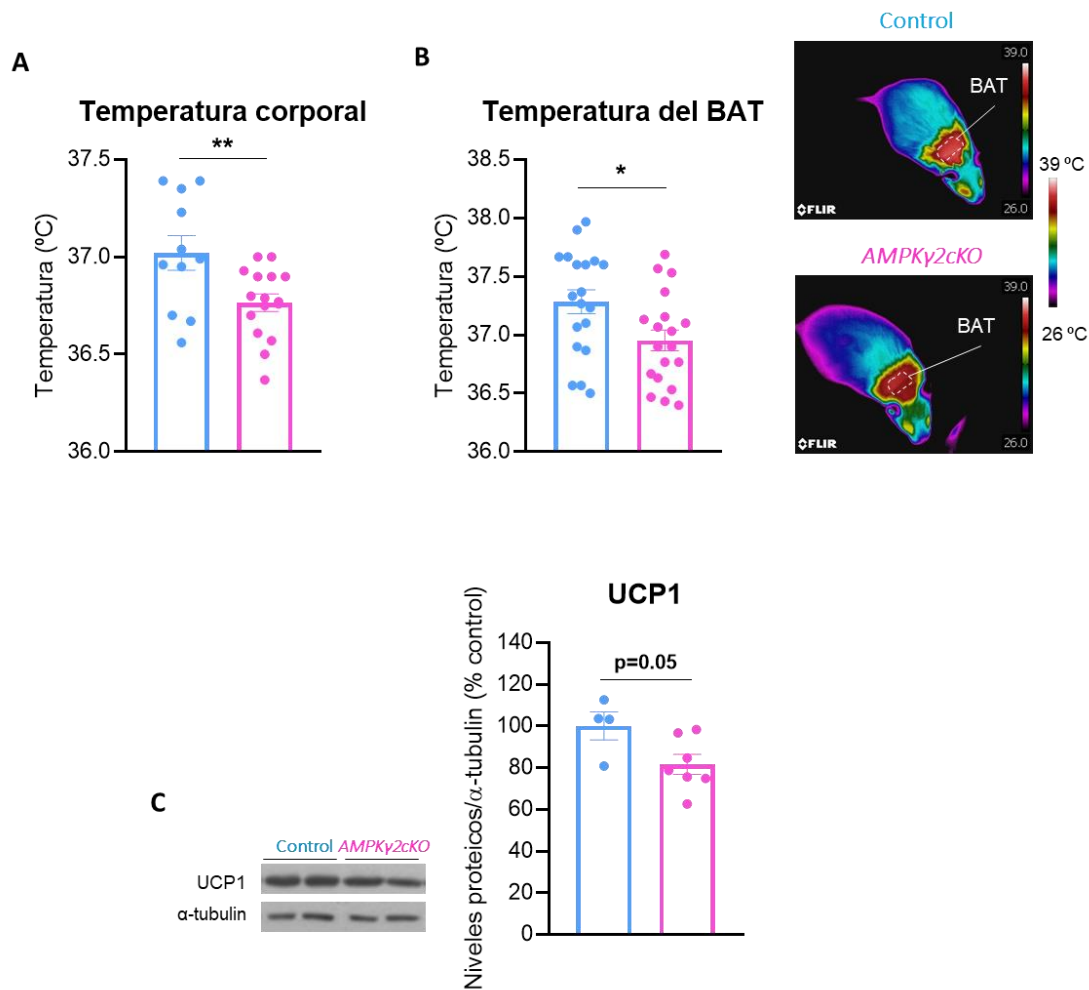


Figura 26. Impacto de la eliminación de AMPK γ 2 en los astrocitos GLAST positivos en la termogénesis de las hembras. (A) Temperatura corporal de hembras control y AMPK γ 2cKO (n=11-16). Los datos están expresados como media \pm SEM (test t-Student, **p<0.01 vs control). (B) Temperatura del área del BAT de hembras control y AMPK γ 2cKO (n=19). Los datos están expresados como media \pm SEM (test t-Student, *p<0.05 vs control). (C) Niveles proteicos de UCP1 en el BAT de machos control y AMPK γ 2cKO (n=4-7). Los datos están expresados como media \pm SEM.

Posteriormente, procedimos a investigar si la ganancia de peso corporal observada en los mutantes podía estar relacionada con alteraciones en el gasto energético y con la actividad locomotora espontánea, 15 semanas después de la administración de Tx. Los datos obtenidos mostraron que tanto los machos como las hembras AMPK γ 2cKO presentaban un menor gasto energético durante la fase de oscuridad (Figura 27A y Figura 28A), mientras que su actividad locomotora era similar a la de sus compañeros de camada (Figura 27B y Figura 28B).

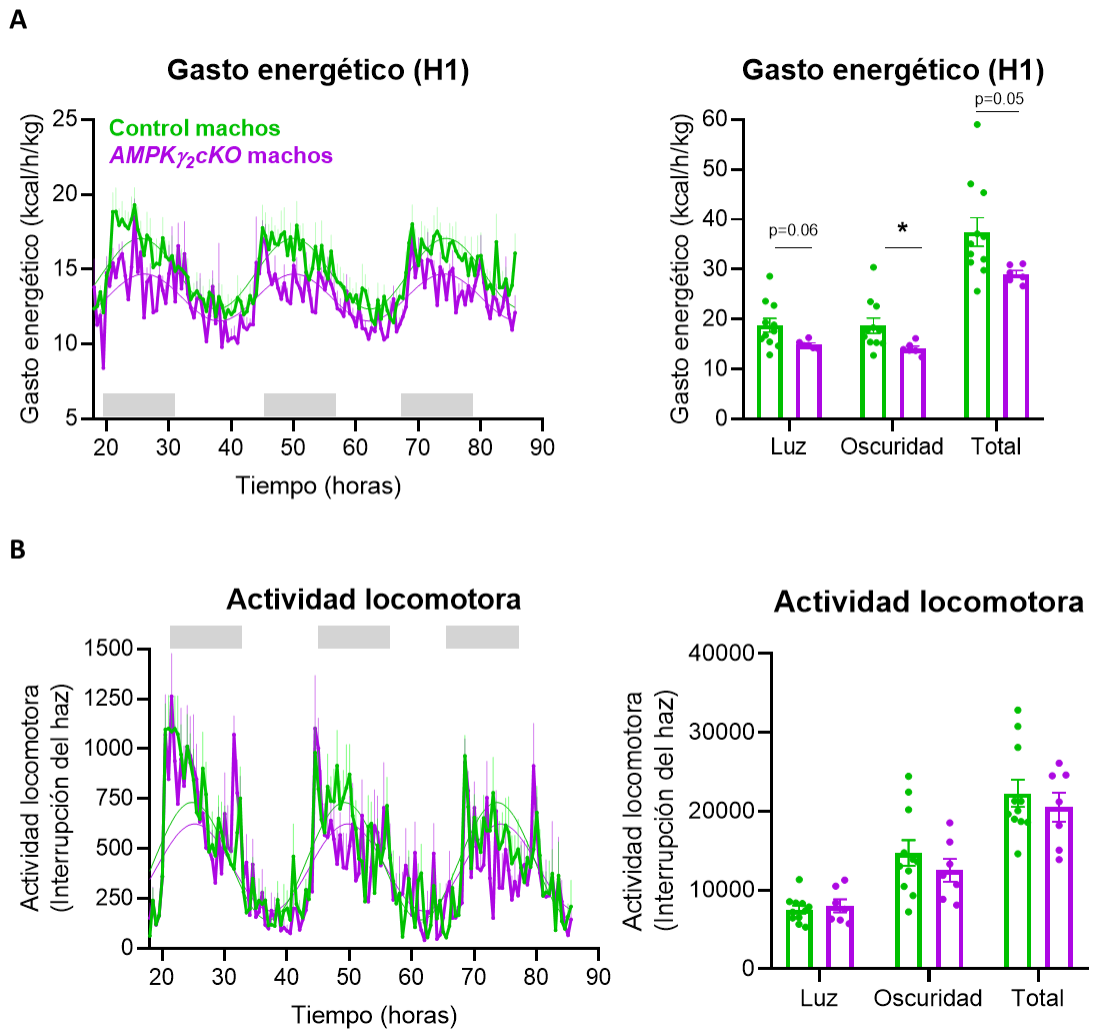


Figura 27. Efecto de la eliminación de AMPK γ 2 en los astrocitos GLAST positivos en el gasto energético y actividad locomotora de los machos. (A) Gasto energético (H1) de machos control y *AMPK γ 2cKO* (n=7-11). Las áreas de color gris en las gráficas indican la fase de oscuridad. Los datos están expresados como media \pm SEM. Los datos experimentales se ajustaron con el modelo cosinor (test t-Student, *p<0.05 vs control). (B) Actividad locomotora de machos control y *AMPK γ 2cKO* (n=7-11). Las áreas de color gris en las gráficas indican la fase de oscuridad. Los datos están expresados como media \pm SEM. Los datos experimentales se ajustaron con el modelo cosinor.

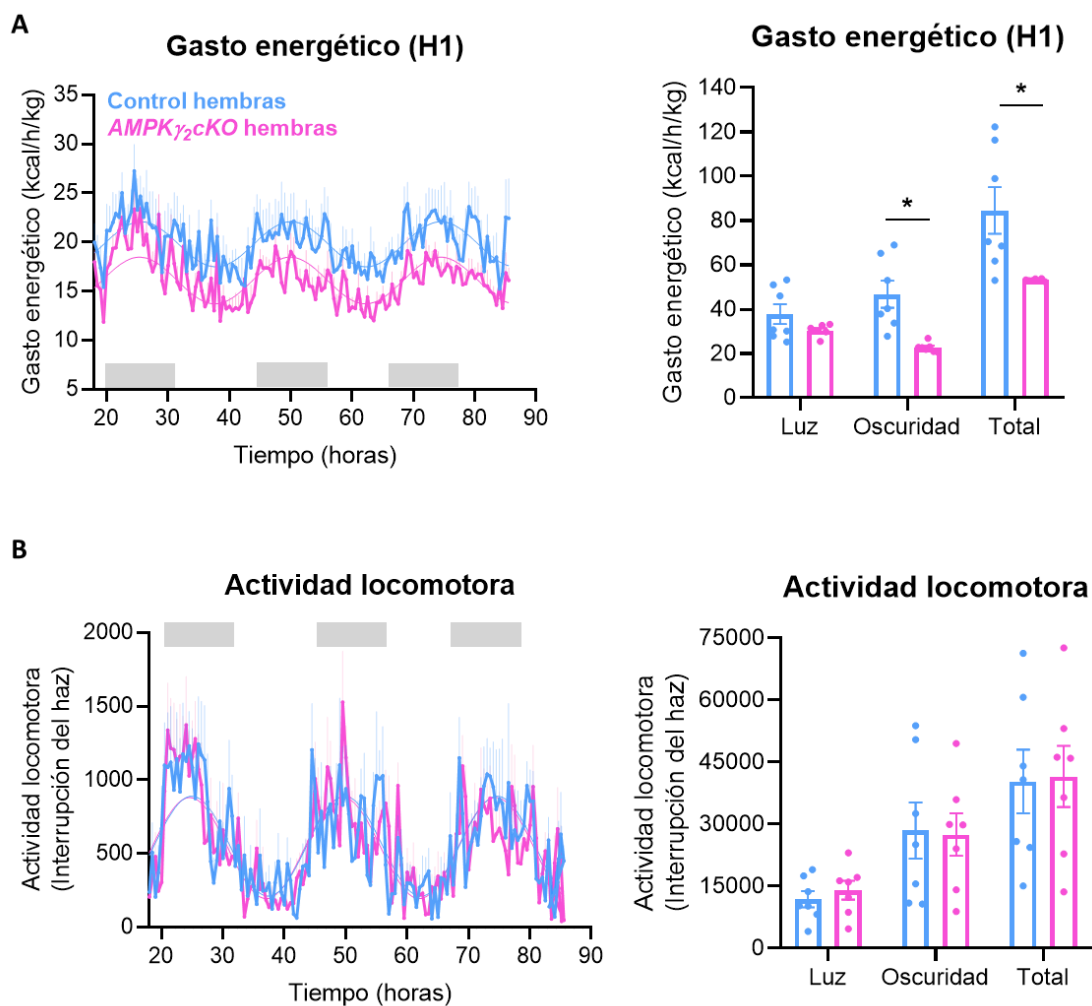


Figura 28. Efecto de la eliminación de AMPK γ 2 en los astrocitos GLAST positivos en el gasto energético y actividad locomotora de las hembras. (A) Gasto energético (H1) de hembras control y AMPK γ 2cKO (n=7). Las áreas de color gris en las gráficas indican la fase de oscuridad. Los datos están expresados como media \pm SEM. Los datos experimentales se ajustaron con el modelo cosinor (test t-Student, *p<0.05 vs control). (B) Actividad locomotora de hembras control y AMPK γ 2cKO (n=7). Las áreas de color gris en las gráficas indican la fase de oscuridad. Los datos están expresados como media \pm SEM. Los datos experimentales se ajustaron con el modelo cosinor.

En resumen, nuestros resultados indican que la eliminación de AMPK γ 2 en astrocitos resulta en un aumento de peso corporal tanto en machos como en hembras, aunque en los machos esta respuesta es más temprana tras el tratamiento con Tx. Además, en los machos mutantes, el aumento de peso corporal parece estar vinculado a un incremento en la ingesta de alimentos y a una disminución en el gasto energético. En el caso de las hembras mutantes, el aumento del peso corporal parece estar asociado principalmente a una menor termogénesis y gasto energético. Estos hallazgos sugieren que la delección de AMPK γ 2 en astrocitos puede afectar de manera diversa a la ingesta y a la termogénesis del BAT en función del sexo.

3 LA ELIMINACIÓN DE AMPK γ 2 EN LOS ASTROCITOS GLAST NO AFECTA A LA HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA

Dado que AMPK en el SNC está relacionada con la homeostasis de la glucosa (Kim et al., 2004; Alquier et al., 2007), se investigó el posible efecto de la eliminación de AMPK γ 2 en astrocitos GLAST positivos en la regulación de la glucosa periférica, en la respuesta a insulina y en la capacidad gluconeogénica a través de tests de tolerancia a glucosa, de tolerancia a insulina y de tolerancia a piruvato, respectivamente. No se observaron diferencias significativas en los niveles de glucosa en ratones alimentados *ad libitum* o en estado de ayuno (Figura 29A) después de 14 semanas de las inyecciones con Tx. Además, no se detectaron cambios en la tolerancia a glucosa (Figura 29B), a la insulina (Figura 30A) ni al piruvato (Figura 30B), entre las semanas 15 y 17 del tratamiento con Tx, en los ratones mutantes en comparación con los controles.

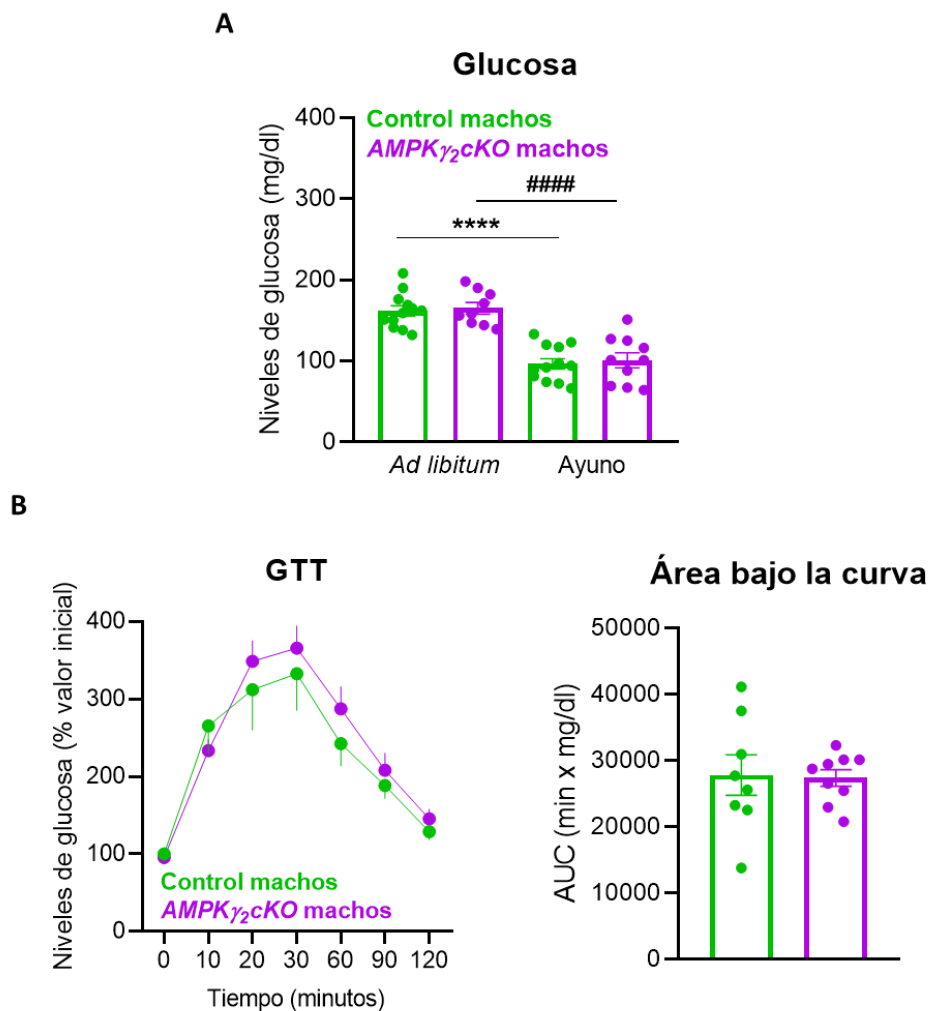


Figura 29. Efecto de la eliminación de AMPK γ 2 en los astrocitos GLAST positivos en la homeostasis de la glucosa. (A) Niveles de glucosa en condiciones de alimentación *ad libitum* y en ayuno en machos control y AMPK γ 2cKO (n=10-12). Los datos están expresados como media \pm SEM (One-way ANOVA, ****p<0.0001 vs control y ####p<0.0001 vs ayuno). (B) Prueba de tolerancia a glucosa (GTT) de machos de los grupos control y AMPK γ 2cKO (n=8-11). Los datos se presentan como media \pm SEM (Two-way ANOVA y test t-Student).

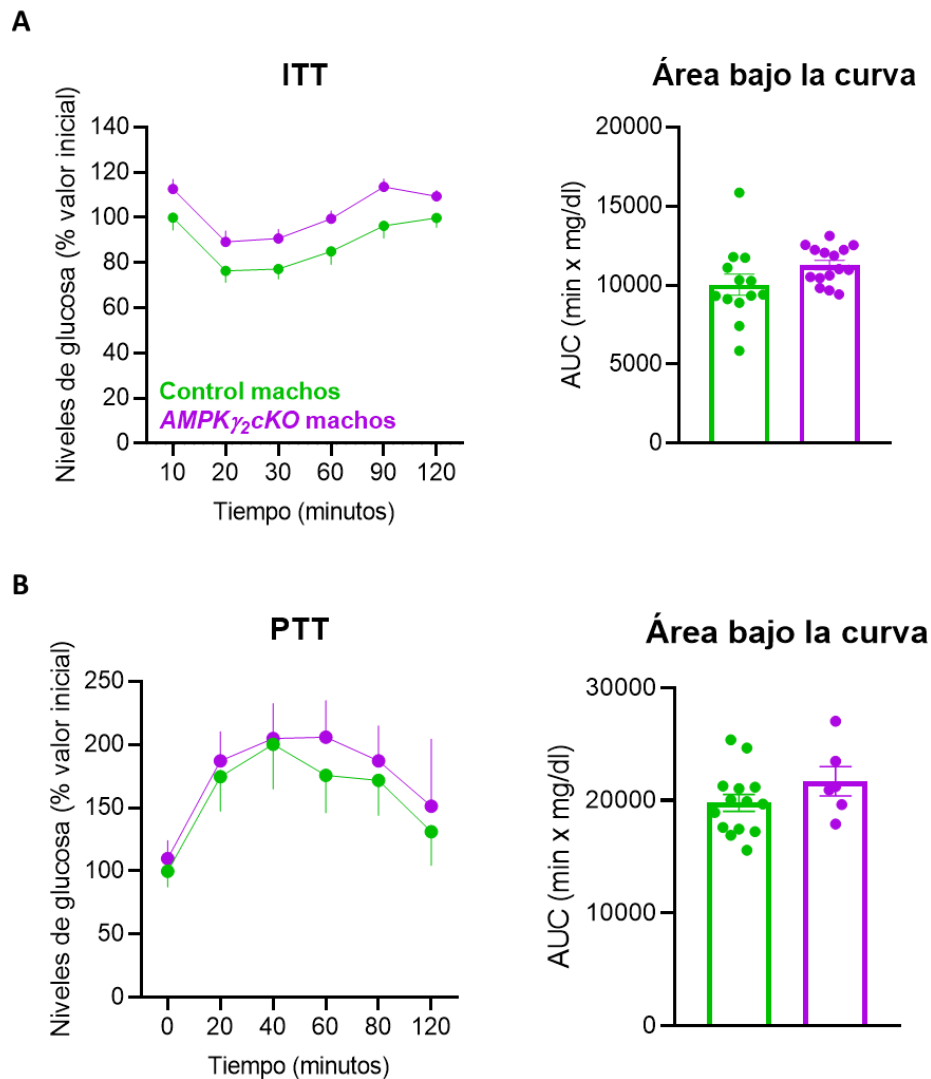


Figura 30. Efecto de la eliminación de AMPK γ 2 en los astrocitos GLAST positivos en la sensibilidad a insulina y piruvato de los machos. (A) Prueba de tolerancia a insulina (ITT) en machos de los grupos control y AMPK γ 2cKO (n=11-14). Los datos están expresados como media \pm SEM (Two-way ANOVA y test t-Student). (C) Prueba de tolerancia a piruvato (PTT) de machos control y AMPK γ 2cKO (n=6-14). Los datos están expresados como media \pm SEM (Two-way ANOVA y test t-Student).

En cuanto a las hembras, no se observaron diferencias en los niveles de glucosa en los ratones alimentados *ad libitum* ni en ayuno (Figura 31A), 14 semanas después de la administración de Tx. No se apreciaron diferencias significativas en los niveles de glucosa en sangre tras la administración IP de glucosa (Figura 31B), de insulina (Figura 32A) ni de piruvato (Figura 32B), después de entre 15 y 17 semanas del tratamiento con Tx. Esto indica que la delección de AMPK γ 2 en astrocitos no afecta a la tolerancia a ninguna de estas tres sustancias.

En resumen, estos resultados sugieren que, a pesar de la influencia de AMPK en la regulación metabólica, la activación constitutiva de AMPK en astrocitos no parece tener un impacto directo en la homeostasis de la glucosa en los modelos de ratones utilizados en esta tesis.

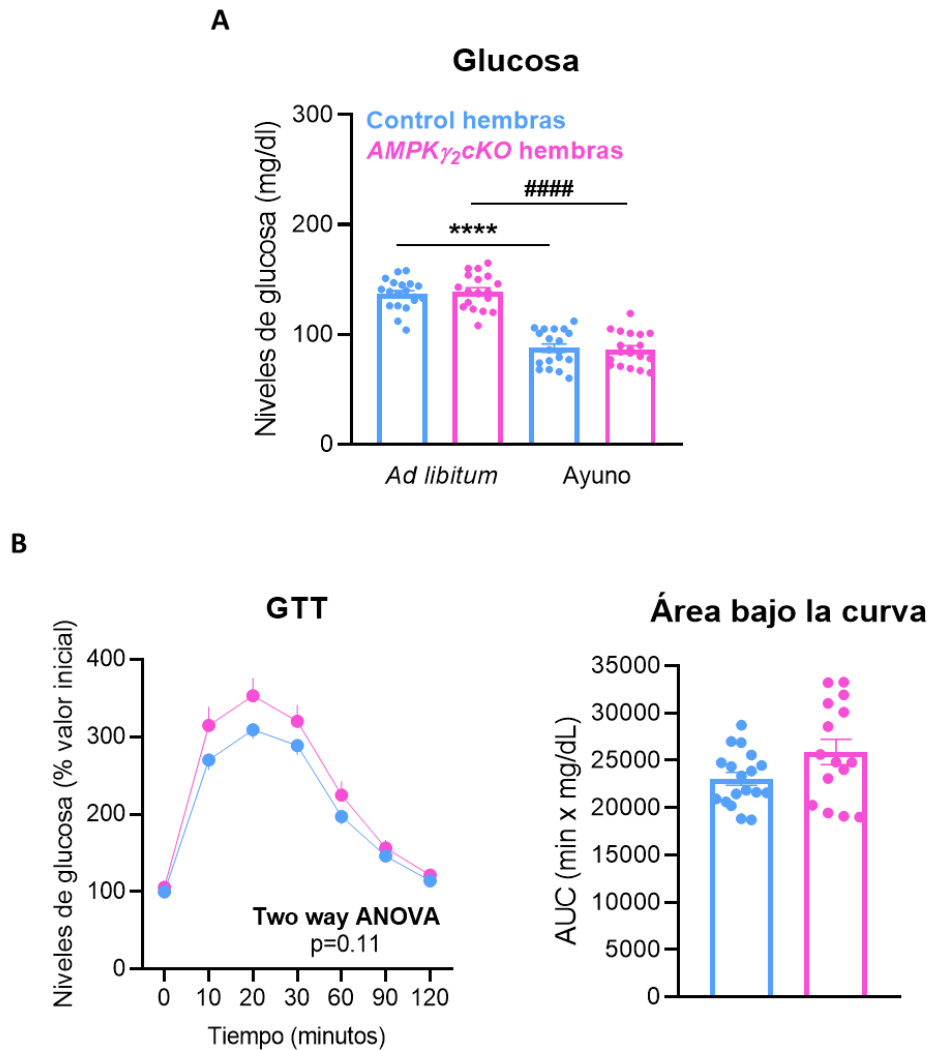


Figura 31. Efecto de la eliminación de AMPK γ_2 en los astrocitos GLAST positivos en la homeostasis de la glucosa. (A) Niveles de glucosa *ad libitum* y en ayuno de hembras control y AMPK γ_2 cKO (n=19-19). Los datos están expresados como media \pm SEM (One-way ANOVA, ****p<0.0001 vs control y ####p<0.0001 vs ayuno). (B) Prueba de tolerancia a glucosa (GTT) de hembras control y AMPK γ_2 cKO (n=16-20). Los datos están expresados como media \pm SEM (Two-way ANOVA y test t-Student).

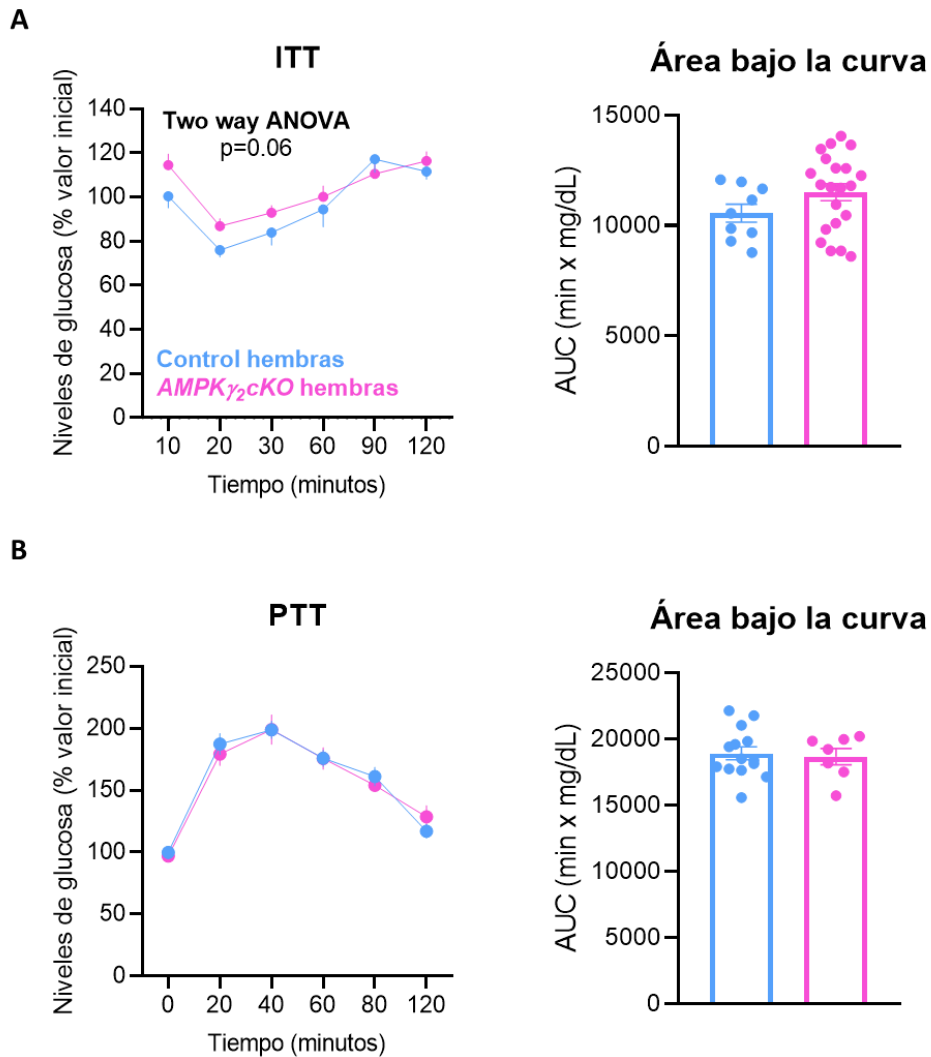


Figura 32. Efecto de la eliminación de AMPK γ 2 en los astrocitos GLAST positivos en la sensibilidad a insulina y piruvato de las hembras. (A) Prueba de tolerancia a insulina (ITT) de hembras control y AMPK γ 2cKO (n=10-22). Los datos están expresados como media \pm SEM (Two-way ANOVA y test t-Student). (B) Prueba de tolerancia a piruvato (PTT) de hembras control y AMPK γ 2cKO (n=7-13). Los datos están expresados como media \pm SEM (Two-way ANOVA y test t-Student).

4 LA ELIMINACIÓN DE AMPK γ 2 EN LOS ASTROCITOS GLAST AUMENTA EL PERÍODO Y ALTERA LA SINCRONIZACIÓN DEL SCN

A continuación, se abordó la cuestión de cómo la activación constitutiva de AMPK en astrocitos afecta a la función del marcapasos endógeno (el SCN). Para abordar esta pregunta, se monitorizó la actividad locomotora en ratones control (AMPK γ 2^{flox/flox}) y ratones *AMPK γ 2cKO* en condiciones normales de luz-oscuridad (LD), alternando ciclos de 12 horas de luz con 12 horas de oscuridad, durante un período de 7-10 días. Posteriormente, los ratones fueron sometidos a un ambiente de oscuridad constante (DD) durante 3-4 semanas. El propósito de esta fase experimental fue entender si la señalización de AMPK en astrocitos podría influir en la capacidad del SCN para mantener sus ritmos endógenos en ausencia de señales de luz y oscuridad. A continuación, se reintrodujo a los ratones en ciclos de luz-oscuridad (rLD) normales durante 7-10 días para observar cómo reajustaban sus ritmos circadianos después del período de oscuridad constante (Barca-Mayo et al., 2017; Luengo-Mateos et al., 2023).

En ratones macho *AMPK γ 2cKO*, se observó una tendencia a una menor actividad durante las primeras horas de la noche en condiciones de LD (entre las 16 y las 26 semanas tras la administración de Tx), siendo significativa en los animales en rLD (Figura 33A). Sin embargo, no hubo cambios en la actividad locomotora total entre los ratones macho control y los ratones *AMPK γ 2cKO* (Figura 33D). En DD, se evidenció un aumento significativo en la periodicidad (Figura 33B), reflejado en un adelanto considerable en el inicio de la actividad locomotora (*onset*) (Figura 33A). Sorprendentemente, los ratones mutantes exhibieron una disminución en la amplitud del periodograma en LD y rLD (Figura 33C). Estos hallazgos sugieren que la activación constante de AMPK en astrocitos desincroniza las células del SCN en presencia de luz, coincidiendo con la tendencia a la reducción de la actividad nocturna en LD y la disminución significativa en rLD.

En resumen, la activación constante de AMPK en astrocitos tiene un impacto significativo en la regulación de los ritmos circadianos, particularmente en el SCN. Los cambios observados en el periodograma en LD y rLD indican que las células del SCN no están respondiendo de manera uniforme a las señales de luz, mientras que el aumento en la periodicidad de los ritmos de actividad locomotora en condiciones de oscuridad constante, muestran una perturbación en la duración natural del ciclo circadiano.

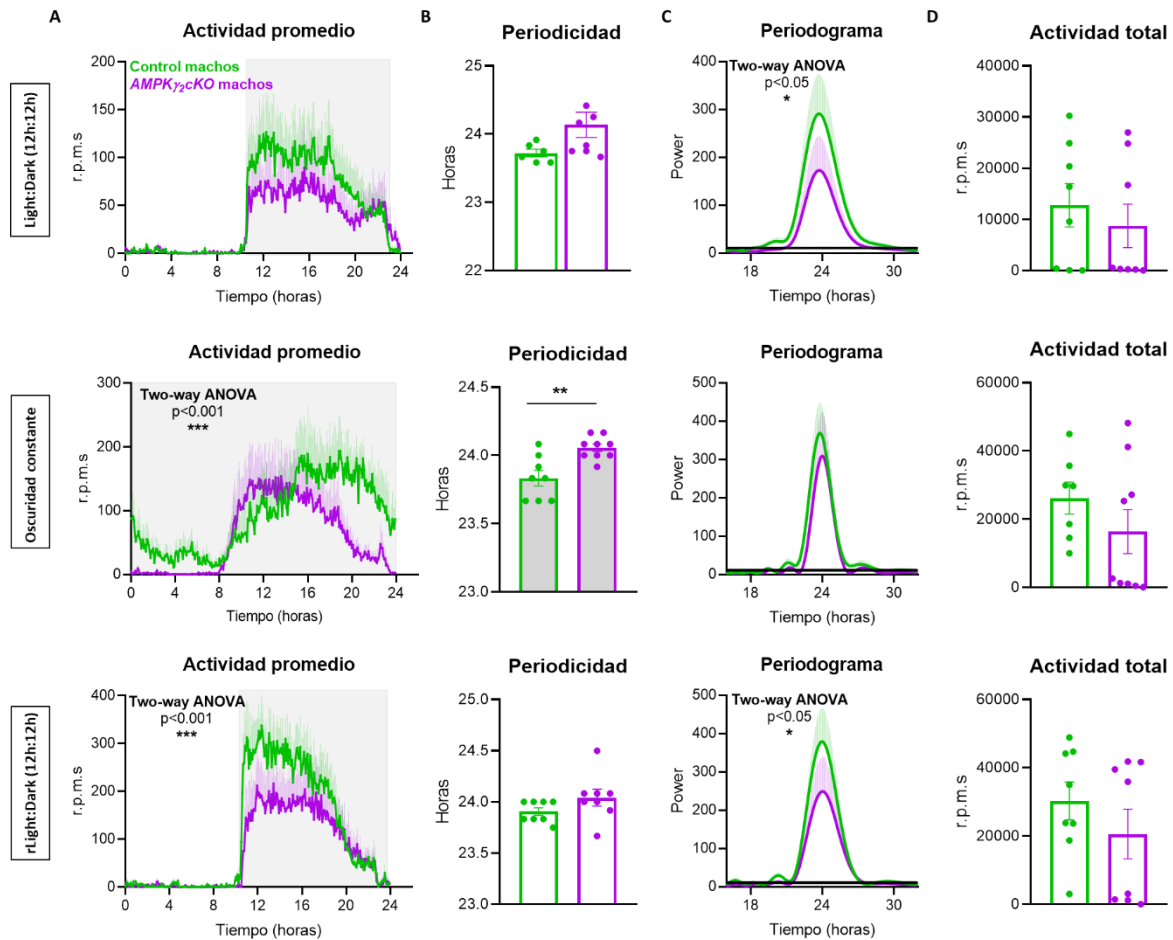


Figura 33. Efecto de la eliminación de AMPK γ 2 en los astrocitos GLAST positivos en la actividad locomotora circadiana de los machos. (A) Actividad promedio durante los ciclos de LD, DD y rLD de los machos control y AMPK γ 2KO (n=8). La actividad se expresa como el promedio de actividad en intervalos de 5 minutos. Para LD y rLD, los datos se representan con horas nocturnas de 8 a 20 y se expresan en horas Zeitgeber (ZT). Para DD, las unidades del eje de abscisas están expresadas en tiempo circadiano (CT), que representa el tiempo biológico interno del organismo en ausencia de señales externas. La actividad se presenta en intervalos de 5 minutos durante el ciclo circadiano de cada animal. Los datos están expresados como media \pm SEM (Two-way ANOVA, ***p<0.001 vs control). (B) Periodicidad y (C) Periodogramas Lomb-Scargle de machos control y AMPK γ 2KO en LD, DD y rLD (n=6-9). Los datos están expresados como media \pm SEM (Two-way ANOVA o test t-student, *p<0.05 y **p<0.01 vs control). (D) Actividad total durante los ciclos de LD, DD y rLD de los machos control y AMPK γ 2KO (n=8). Los datos están expresados como media \pm SEM.

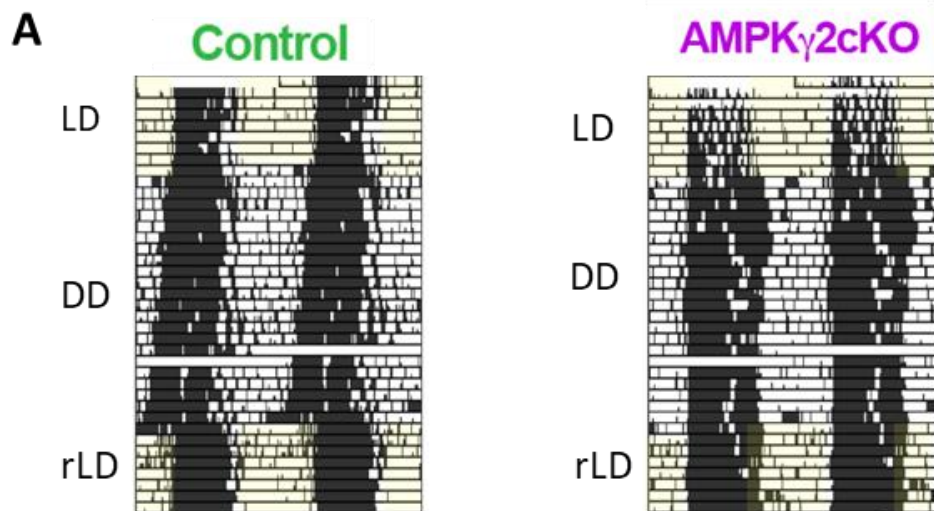


Figura 34. Efecto de la eliminación de AMPK γ 2 en los astrocitos GLAST positivos en la actividad locomotora circadiana de los machos. (A) Actogramas representativos durante los ciclos 12:12 LD, DD y rLD de machos control y AMPK γ 2cKO. Las áreas sombreadas en amarillo representan las fases de luz.

Curiosamente, nuestros resultados demostraron una reducción en los niveles de VIP en el SCN de los ratones AMPK γ 2cKO en comparación con los ratones control, 20 semanas después del tratamiento con Tx en ZT8 (Figura 35C). Dado el papel crucial de VIP en la sincronización de las neuronas del SCN, su reducción en los mutantes se correlaciona con su disminución en la amplitud del periodograma. Adicionalmente, investigaciones previas habían indicado que la activación de AMPK conduce a la degradación de los represores del TTFL PER2 y CRY1 en tejidos periféricos, lo que se asocia con el aumento de la periodicidad en los ciclos del TTFL y en la actividad locomotora (Lamia et al., 2009; Um et al., 2007). En línea con nuestra observación de ciclos más largos en oscuridad constante, encontramos una disminución significativa en los niveles hipotalámicos de PER2 y CRY1 en los ratones AMPK γ 2cKO en comparación con los ratones control, 20 semanas después del tratamiento con Tx a ZT8 (Figura 35A y 35B). Estos resultados respaldan la idea de que AMPK puede desempeñar un papel en el reloj molecular en los astrocitos al regular la expresión de PER2 y CRY1.

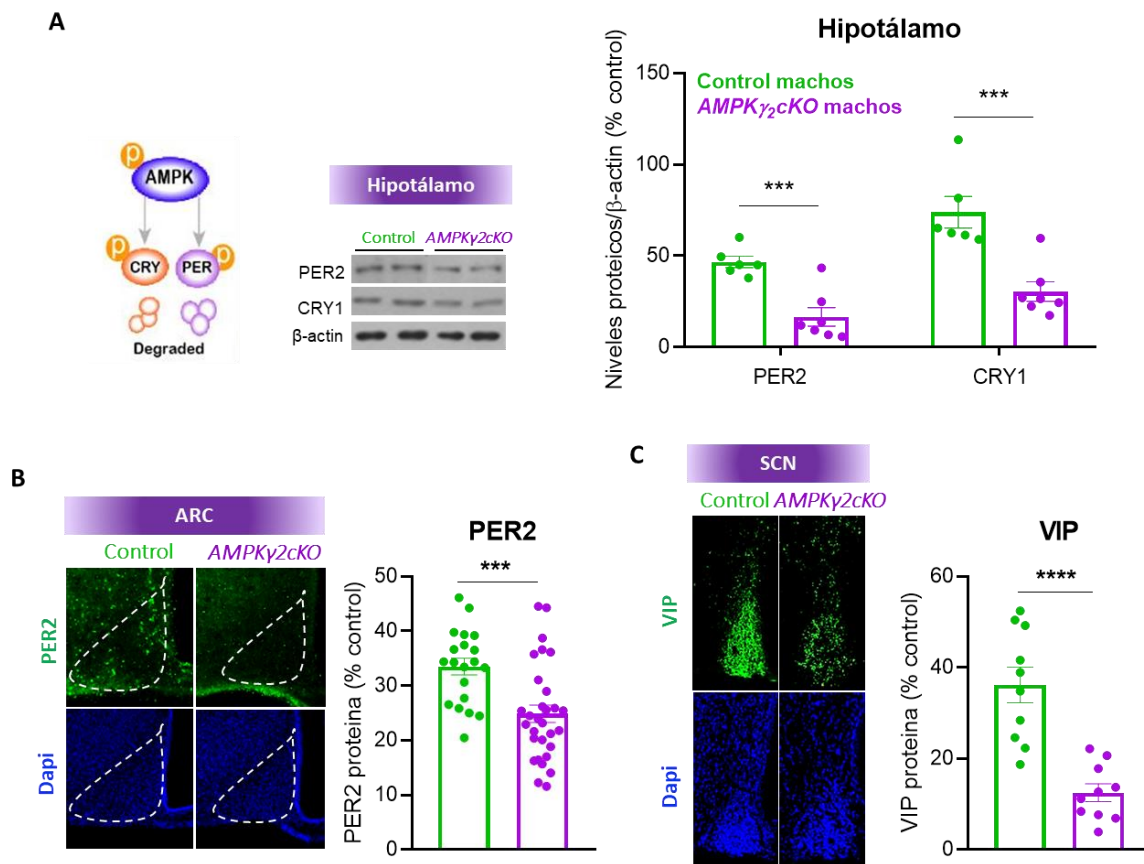


Figura 35. Efecto de la eliminación de AMPK γ 2 en los astrocitos GLAST positivos en los niveles de PER2 y CRY1 en el hipotálamo de los machos. (A) Niveles de proteína hipotalámicos de PER2 y CRY1 de machos control y AMPK γ 2cKO (n=7). Los datos están expresados como media \pm SEM (test t-Student, ***p<0.001 vs control). (B) Inmunofluorescencia de PER2 en el núcleo ARC del hipotálamo (n=20-30). Los datos están expresados como media \pm SEM (test t-Student, ***p<0.001 vs control). (C) Inmunofluorescencia de VIP en el SCN de machos control y AMPK γ 2cKO (n=10). Los datos están expresados como media \pm SEM (test t-Student, ****p<0.0001 vs control).

Las hembras AMPK γ 2cKO reprodujeron los resultados observados en la actividad locomotora promediada de los machos mutantes (entre las 16 y las 24 semanas después del tratamiento con Tx) (Figura 36A). Sin embargo, a diferencia de los machos, en condiciones de oscuridad constante (DD) no se observó un aumento en la periodicidad en las hembras mutantes (Figura 36B). De hecho, las hembras mostraron una tendencia a tener ritmos más cortos en estas condiciones (Figura 36B). Aunque observamos una tendencia a una reducción en la amplitud del periodograma en todas las condiciones de luz en las hembras, no se encontraron diferencias significativas (Figura 36C). Estos resultados sugieren que la activación constitutiva de AMPK en astrocitos tiene un impacto menor en la actividad locomotora circadiana y, por lo tanto, en el SCN en ratones hembra.

RESULTADOS

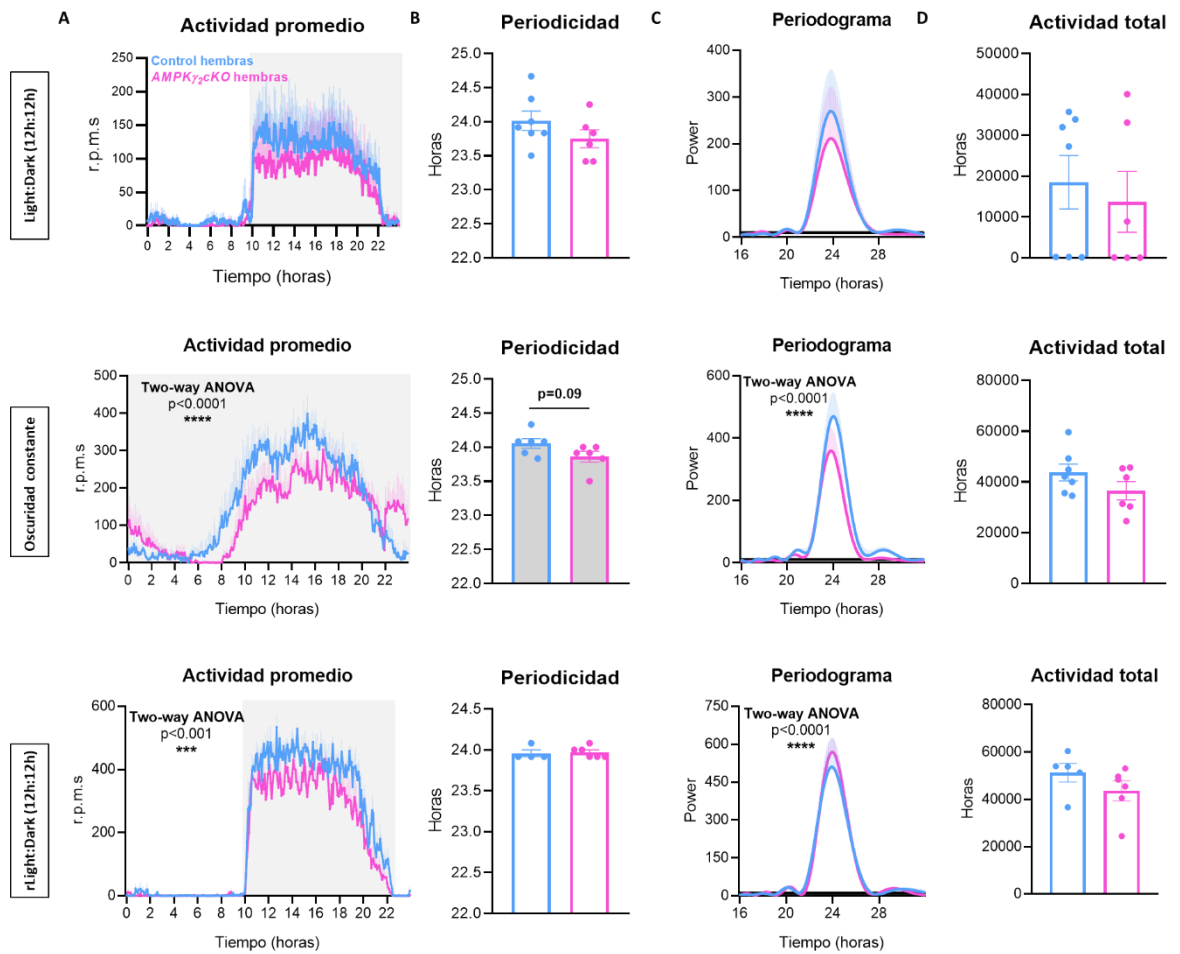


Figura 36. Efecto de la eliminación de AMPK γ 2 en los astrocitos GLAST positivos en la actividad locomotora circadiana de las hembras. (A) Actividad promedio durante los ciclos de LD, DD y rLD de las hembras control y AMPK γ 2cKO (n=4-7). La actividad se expresa como el promedio de actividad en intervalos de 5 minutos. Para LD y rLD, los datos se representan con horas nocturnas de 8 a 20 y se expresan en hora tiempo Zeitgeber (ZT). Para DD, las unidades del eje de abscisas están expresadas en tiempo circadiano (CT), que representa el tiempo biológico interno del organismo en ausencia de señales externas. La actividad se presenta en intervalos de 5 minutos durante el ciclo circadiano de cada animal. Los datos están expresados como media \pm SEM (Two-way ANOVA, ***p<0.001 y ****p<0.0001 vs control). (B) Periodicidad y (C) Periodogramas Lomb-Scargle de hembras control y AMPK γ 2cKO en LD, DD y rLD (n=4-7). Los datos están expresados como media \pm SEM (Two-way ANOVA o test t-student, ****p<0.0001 vs control). (D) Actividad total durante los ciclos de LD, DD y rLD de las hembras control y AMPK γ 2cKO (n=4-7). Los datos están expresados como media \pm SEM.

5 LA ELIMINACIÓN DE AMPK γ 2 EN LOS ASTROCITOS GLAST ALTERA LA ANTICIPACIÓN A LA COMIDA EN LOS MACHOS

Dada la importancia de AMPK como un sensor metabólico esencial y su impacto en la sincronización del SCN a la luz, investigamos si la activación constitutiva de AMPK en astrocitos también podría afectar a la capacidad de los animales para sincronizarse con los patrones de alimentación. Con este propósito, se realizó un estudio utilizando ratones control y ratones con delección de AMPK γ 2 en astrocitos (*AMPK γ 2cKO*), sometidos a un paradigma de restricción alimentaria temporal (RF) transcurridas 29 semanas de la administración de Tx.

Inicialmente, monitorizamos la actividad locomotora de los ratones en ciclos regulares de luz y oscuridad (LD) de 12 horas, con acceso libre a la comida, durante un período de 7 días. Luego, invertimos el tiempo de alimentación a determinadas horas durante el día e implementamos una reducción gradual del tiempo de alimentación. Limitamos la ventana de alimentación a seis horas (ZT4-ZT10, RF 6h) durante 6 días y, posteriormente, la redujimos a 4 horas durante 4 días (ZT4-ZT8, RF 4h) (Figura 37A). Durante estas fases de restricción alimentaria, observamos un aumento en la actividad locomotora entre una y cuatro horas antes de la presentación de la comida, conocido como actividad anticipatoria de la alimentación (FAA) (Figuras 37B y 37C). Además, el porcentaje de FAA aumentó gradualmente a medida que los ratones estaban sometidos al paradigma de restricción alimentaria (Figuras 37B, 37C y 37D). Sorprendentemente, los ratones macho *AMPK γ 2cKO* mostraron una disminución en la FAA tanto durante la primera parte (RF 6h) como en la segunda parte (RF 4h) del paradigma de restricción alimentaria (Figuras 37B, 37C y 37D). Es importante señalar que esta alteración no estuvo relacionada con cambios en la actividad total de los ratones mutantes, ya que mantuvieron niveles de actividad comparables a los controles (Figura 38A). Además, después de adquirir la FAA, el FEO se vuelve dominante sobre la actividad nocturna controlada por el SCN (Holmes & Mistlberger, 2000; Sen et al., 2017). En este sentido, se observó que los ratones mutantes no reducían su actividad nocturna de la misma manera que lo hacían los controles durante el paradigma RF 4h (Figuras 37C, 38B y 38C), confirmando su menor adquisición de la FAA. Este hallazgo resalta que la activación constitutiva de AMPK en astrocitos interfiere con el comportamiento de anticipación a la comida.

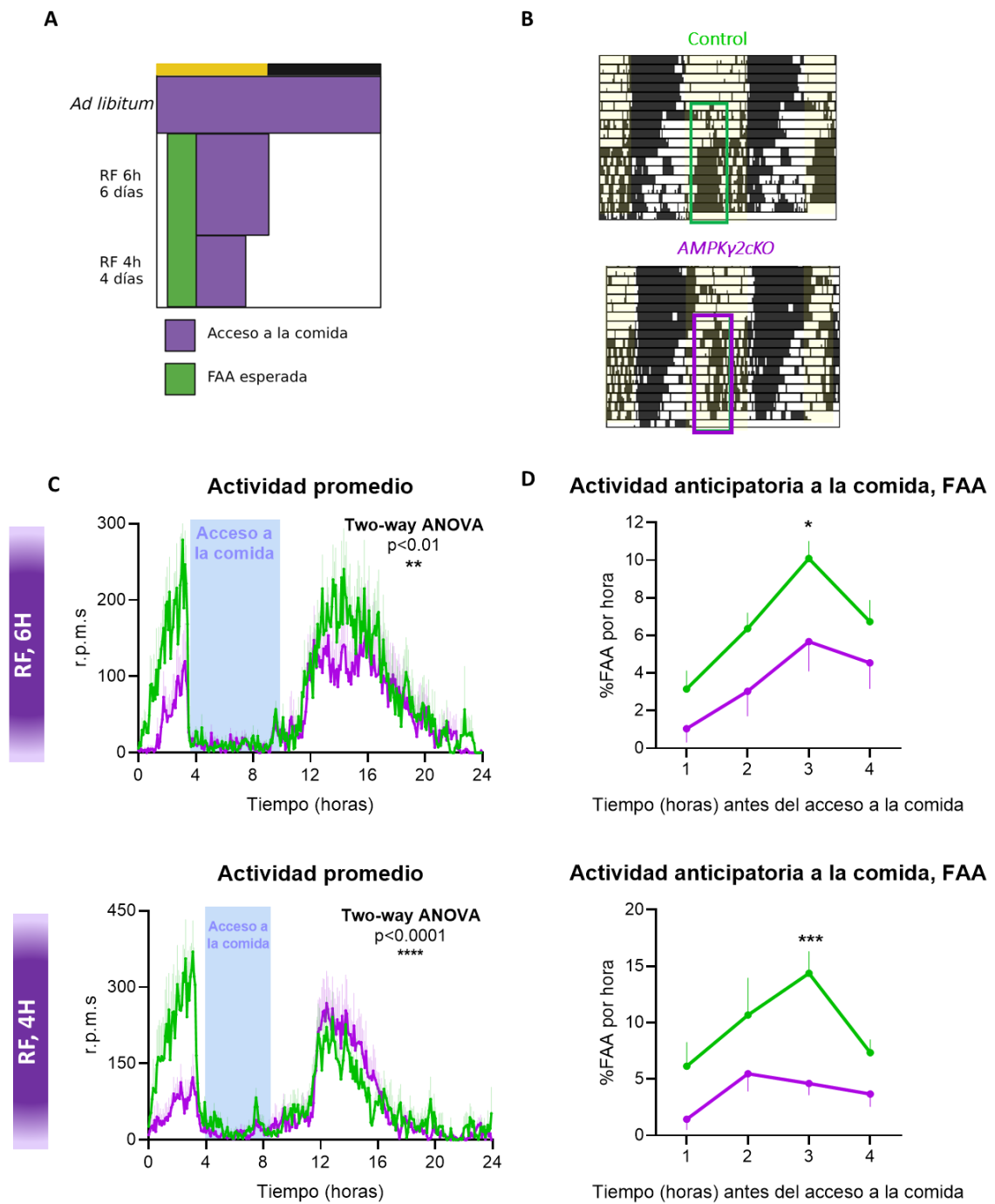


Figura 37. Efecto de la eliminación de AMPK γ 2 en los astrocitos GLAST positivos en la anticipación a la comida de los machos. (A) Diagrama que muestra los paradigmas de restricción de la comida (RF). (B) Actograma representativo durante el paradigma de restricción de la comida (RF). Las áreas sombreadas en amarillo representan las fases de luz. (C) Gráficas de actividad promedio durante el paradigma de restricción de alimentos (RF) desde ZT 4-10 (RF 6h, panel superior) (n=8) y ZT 4-8 (RF 4h, panel inferior) en ratones control y AMPK γ 2cKO (n=6-9). Las áreas de color azul en las gráficas indican el tiempo de alimentación. Los datos están expresados como media \pm SEM (Two-way ANOVA, ** $p < 0.01$ y **** $p < 0.0001$ vs control). (D) Porcentaje de FAA durante el paradigma RF 6h (n=8) (panel superior) y RF 4h (n=6-9) (panel inferior) en machos control y AMPK γ 2cKO. Los datos están expresados como media \pm SEM (Two-way ANOVA, * $p < 0.05$ y *** $p < 0.001$ vs control).

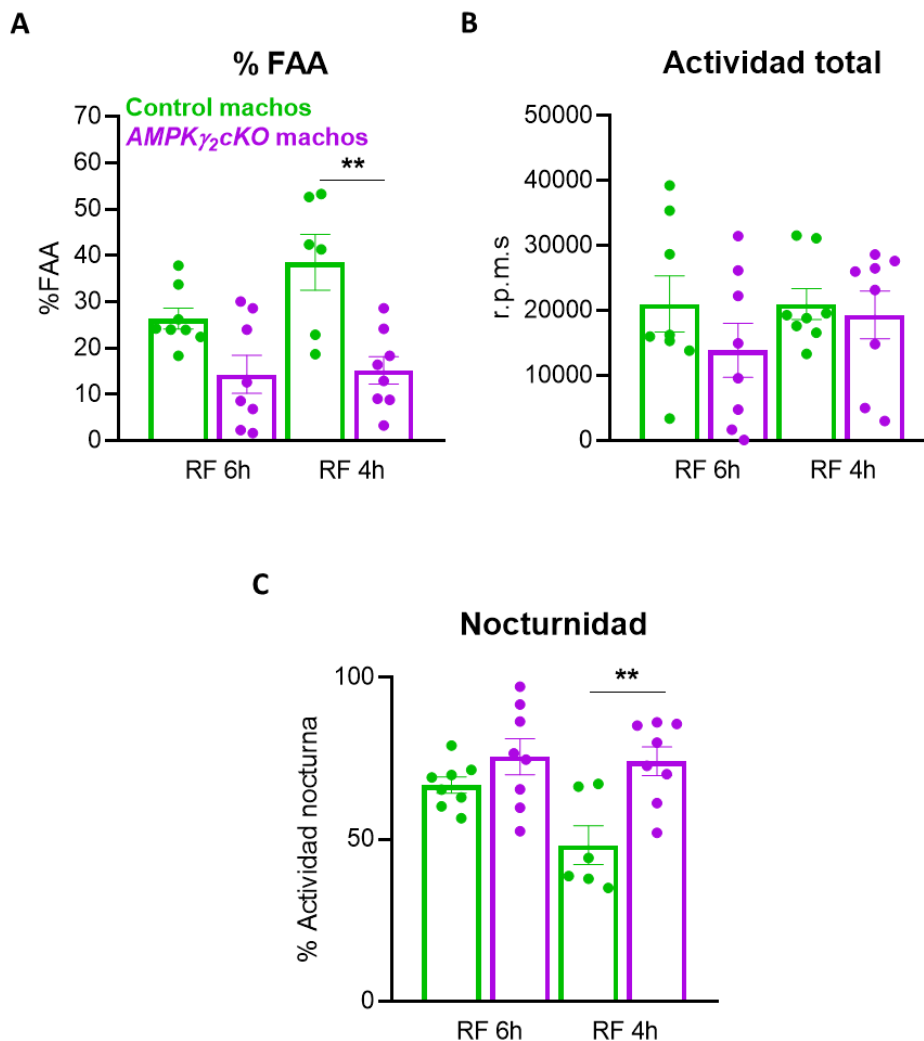


Figura 38. Efecto de la eliminación de AMPK γ 2 en los astrocitos GLAST positivos en la anticipación de la comida de los machos. (A) Porcentaje de FAA durante el paradigma de RF de machos control y AMPK γ 2cKO (n=8). Los datos están expresados como media \pm SEM (One-way ANOVA, **p<0.01 vs control). (B) Actividad total durante el paradigma de RF de machos control y AMPK γ 2cKO (n=8). Los datos están expresados como media \pm SEM. (C) Actividad nocturna durante el paradigma de RF de machos control y AMPK γ 2cKO (n=8). Los datos están expresados como media \pm SEM (One-way ANOVA, **p<0.01 vs control).

Las hembras AMPK γ 2cKO, en cambio, no mostraron cambios con respecto a las hembras control en la FAA en el paradigma RF 6h ni durante el paradigma RF 4h (Figura 39A, 39B y 40A) después de 18 semanas del tratamiento con Tx. Esto sugiere que la delección de AMPK γ 2 en astrocitos no altera la adquisición de la FAA en hembras. A pesar de tener niveles similares de FAA que las hembras control, se observó que las hembras mutantes tenían menor actividad nocturna, especialmente evidente durante la segunda parte del paradigma de RF (RF 4h) (Figuras 39A y 40C).

En resumen, estos hallazgos resaltan la influencia específica del sexo en la respuesta a la anticipación a la comida ante la activación constante de AMPK en astrocitos. Mientras que, en machos, esta activación se traduce en una significativa disminución en la FAA, en las hembras no induce cambios en la adquisición de la FAA, aunque muestran una menor actividad nocturna. Estos resultados sugieren que la respuesta a la activación de AMPK en astrocitos puede variar según el sexo y pueden afectar a la interacción entre el FEO y el SCN, influenciando así los patrones de comportamiento alimentario y la actividad locomotora de manera diferencial entre sexos.

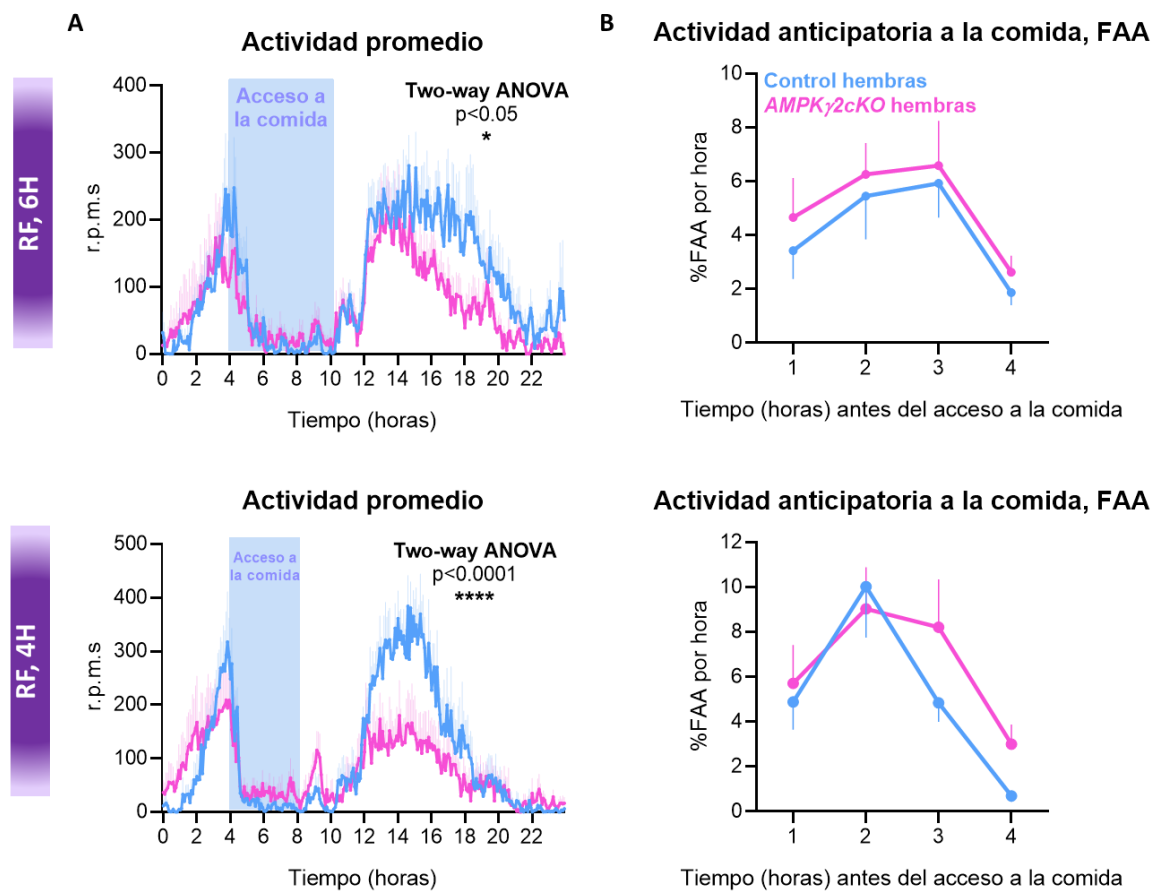


Figura 39. Efecto de la eliminación de AMPK γ 2 en los astrocitos GLAST positivos en la anticipación a la comida de las hembras. (A) Gráficas de actividad promedio durante el paradigma de restricción de alimentos (RF) de ZT 4-10 (RF 6h, panel superior) (n=6-7) y ZT 4-8 (RF 4h, panel inferior) en ratones control y AMPK γ 2cKO (n=6). Las áreas de color azul en las gráficas indican el tiempo de alimentación. Los datos están expresados como media \pm SEM (Two-way ANOVA, * $p < 0.05$ y **** $p < 0.0001$ vs control). (B) Porcentaje de FAA durante el paradigma de RF 6h (n=6-7) (panel superior) y de RF 4h (n=6) (panel inferior) en hembras control y AMPK γ 2cKO (n=6-7). Los datos están expresados como media \pm SEM.

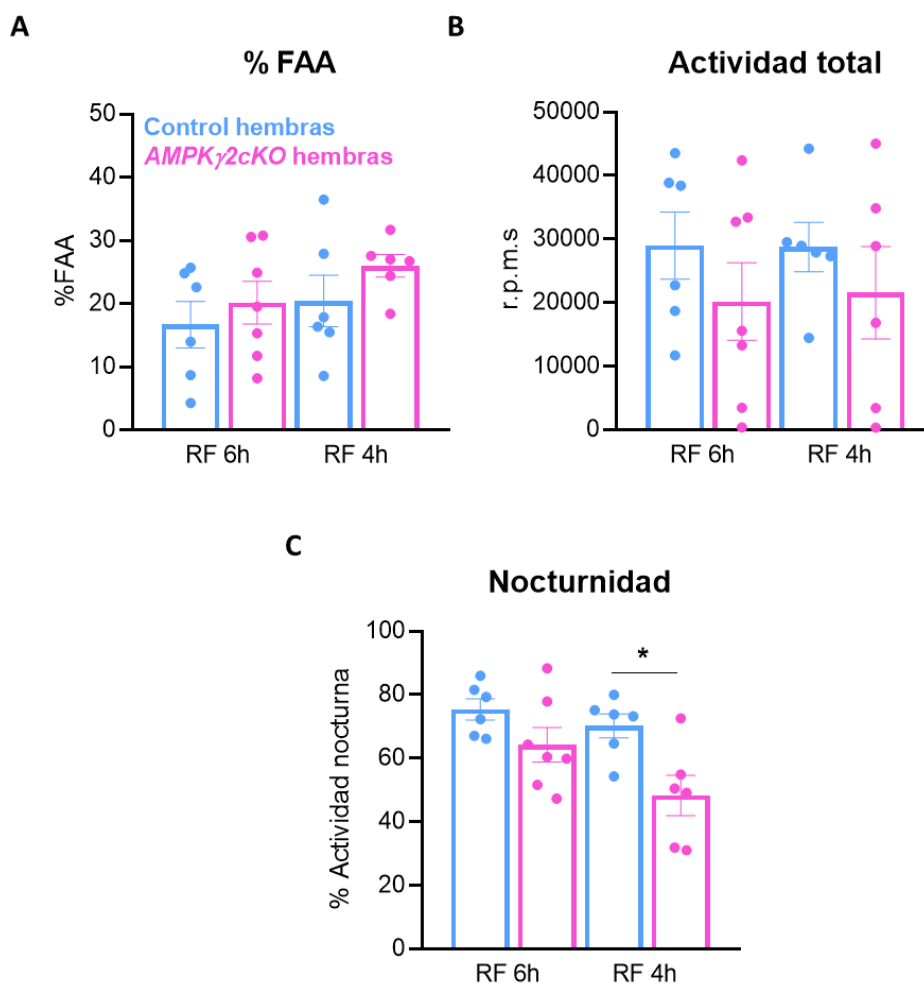


Figura 40. Efecto de la eliminación de AMPK γ 2 en los astrocitos GLAST positivos en la anticipación a la comida de las hembras. (A) Porcentaje de FAA durante el paradigma de RF de hembras control y *AMPK γ 2cKO* (n=6-7). Los datos están expresados como media \pm SEM. (B) Actividad total durante el paradigma de RF de hembras control y *AMPK γ 2cKO* (n=6-7). Los datos están expresados como media \pm SEM. (C) Actividad nocturna durante el paradigma de RF de hembras control y *AMPK γ 2cKO* (n=6-7). Los datos están expresados como media \pm SEM (One-way ANOVA, *p<0.05 vs control).

La adaptación metabólica al paradigma de restricción alimentaria (RF) se evaluó mediante el seguimiento del peso corporal al finalizar los períodos de alimentación *ad libitum* (AL), RF 6h y RF 4h, junto con el análisis de la ingesta diaria. Tanto en los machos como en las hembras *AMPK γ 2cKO*, ambos grupos iniciaron el paradigma de RF con un peso corporal superior al de los controles y, aunque mantuvieron esta diferencia durante todo el experimento, las divergencias con los controles se atenuaron progresivamente (Figura 41A y 42A). Curiosamente, este aumento en el peso corporal podría estar asociado a una reducción en la ingesta acumulada en estos ratones mutantes macho pero no en las hembras (Figuras 41B y 42B). Estos hallazgos sugieren una respuesta metabólica diferencial entre machos y hembras ante la restricción alimentaria, lo que subraya la complejidad de las interacciones

entre AMPK en astrocitos y los patrones de comportamiento alimentario, adaptación metabólica y actividad locomotora en ambos sexos.

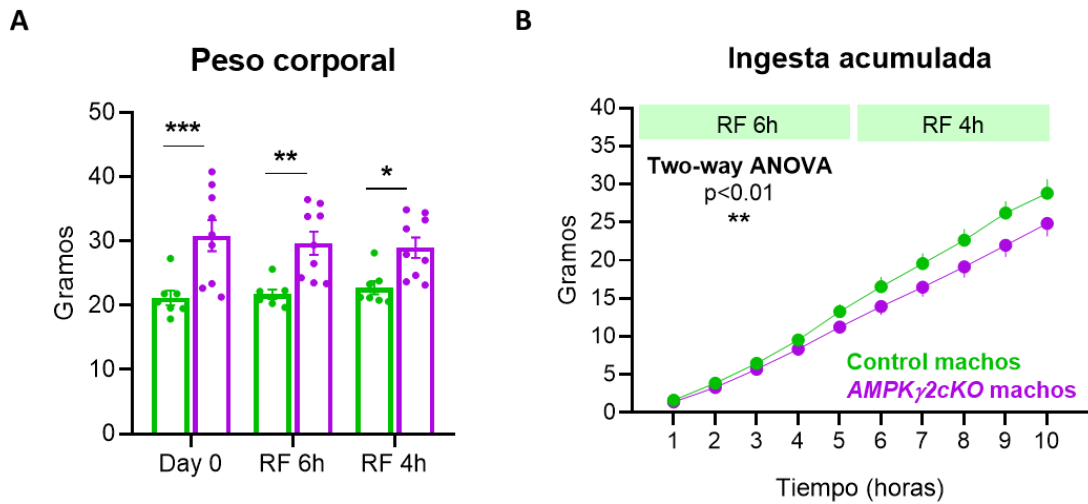


Figura 41. Efecto de la eliminación de AMPK γ 2 en los astrocitos GLAST positivos en la adaptación metabólica de los machos. (A) Peso corporal durante el paradigma de RF de machos control y AMPK γ 2cKO (n=8-9). Los datos están expresados como media \pm SEM (test t-Student, *p<0.05, **p<0.01 y ***p<0.001 vs control). (B) Ingesta durante el paradigma RF de machos control y AMPK γ 2cKO (n=14-16). Los datos están expresados como media \pm SEM (Two-way ANOVA, **p<0.01 vs control).

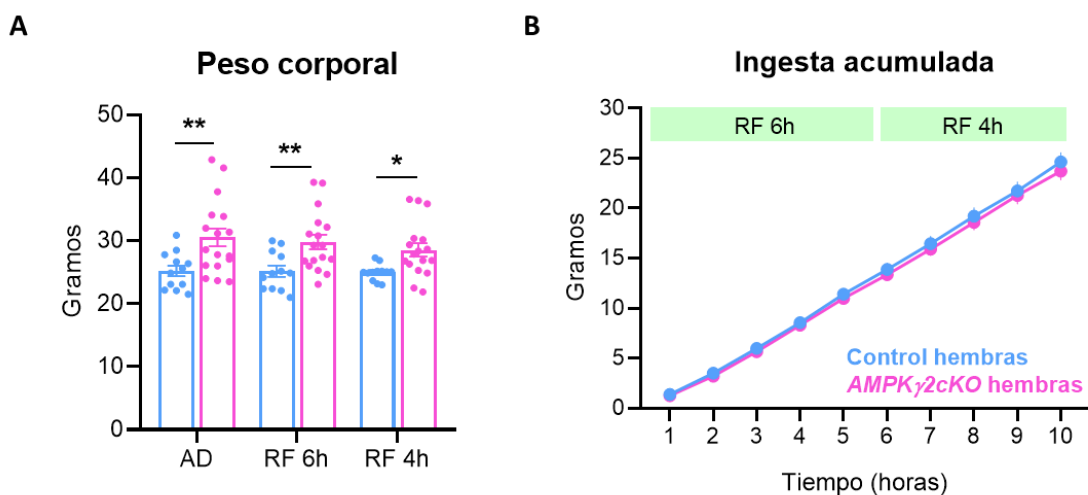


Figura 42. Efecto de la eliminación de AMPK γ 2 en los astrocitos GLAST positivos en la anticipación a la comida. (A) Peso corporal durante el paradigma de RF de hembras control y AMPK γ 2cKO (n=12-17). Los datos están expresados como media \pm SEM (test t-Student, *p<0.05 y **p<0.01 vs control). (B) Ingesta durante el paradigma RF de hembras control y AMPK γ 2cKO (n=14-17). Los datos están expresados como media \pm SEM.

6 LA ELIMINACIÓN DE AMPK γ 2 EN EL VMH DISMINUYE EL PESO CORPORAL Y AUMENTA EL GASTO ENERGÉTICO

El VMH desempeña un papel crucial en la regulación del equilibrio energético al integrar señales relacionadas tanto a la exposición a la luz como a la disponibilidad de nutrientes (Barca-Mayo & López, 2021; Guilding et al., 2009; López, 2022). Se ha observado que la fase del reloj molecular en el VMH es sensible a los estados de alimentación (Guilding et al., 2009), lo que subraya su importancia como núcleo central en la coordinación del equilibrio energético y el comportamiento circadiano. Sin embargo, el papel específico de los astrocitos en el VMH en ambos procesos aún se desconoce.

En este estudio, se investigó el papel de la señalización de AMPK en los astrocitos del VMH con respecto a la regulación del metabolismo periférico y la sincronización circadiana a la luz y a los patrones de alimentación. Se empleó un sistema basado en virus que utiliza la técnica Cre/lox para eliminar selectivamente el gen *Prkag2* en los astrocitos localizados en el VMH de ratones adultos, tanto machos como hembras AMPK γ 2^{flox/flox}. Para ello, se realizaron inyecciones estereotáxicas de partículas de virus adenoasociados (AAV, serotipo 2/5) que expresan la proteína GFP o la proteína Cre bajo el control del promotor hGFAP. Las partículas AAV-hGFAP-GFP (controles) o AAV-hGFAP-Cre (KOs) se inyectaron bilateralmente (2×10^9 partículas virales por cada lado) en el VMH de ratones AMPK γ 2^{flox/flox}, utilizando un dispositivo estereotáxico motorizado.

En primera instancia, se realizó la validación de la correcta inyección de las partículas virales AAV en el VMH, así como la distribución de los virus, siguiendo la señal fluorescente emitida por la proteína GFP (Figura 43A). Asimismo, se evaluó la eficacia de recombinación mediante análisis de Western Blot de la vía de AMPK en el área medio basal del hipotálamo. Los resultados obtenidos confirmaron un aumento en los niveles de la proteína pACC en los machos mutantes, respaldando así la activación constitutiva de AMPK en el VMH (Figura 43B).

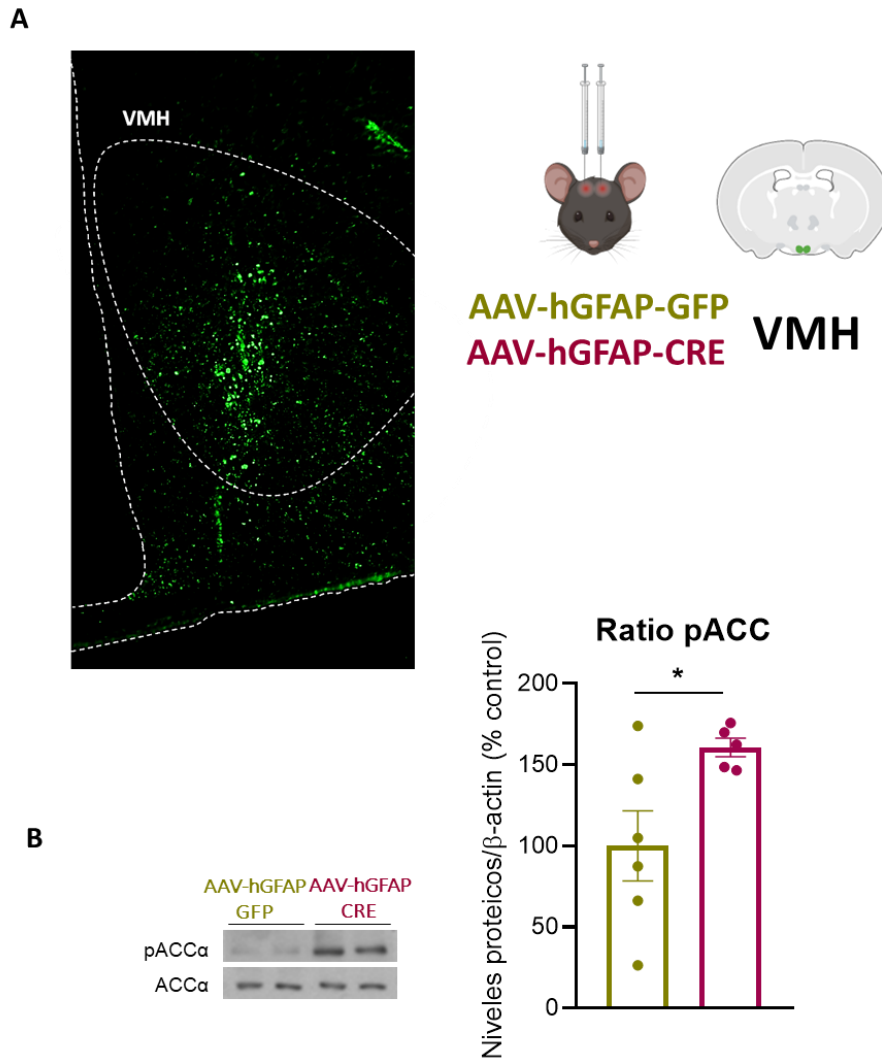


Figura 43. Efecto de la eliminación de AMPK γ 2 en los astrocitos del VMH en los niveles de pACC y ACC de la región medio basal del hipotálamo. (A) Infección del VMH con AAV-GFAP-GFP en ratones AMPK γ 2^{flox/flox}. (B) Niveles proteicos de pACC y ACC en la región medio basal del hipotálamo de machos AMPK γ 2^{flox/flox} inyectados con AAV-hGFAP-GFP (control) o AAV-hGFAP-Cre (mutantes) (n=5-6). Los datos están expresados como media \pm SEM (test t-Student, *p<0.05 vs control).

La eliminación de AMPK γ 2 en los astrocitos del VMH, tanto en machos como en hembras, resultó en cambios en el perfil metabólico, pero éstos no replicaron completamente el fenotipo observado en los ratones *AMPK γ 2cKO*. Concretamente, la delección de AMPK γ 2 en los astrocitos del VMH condujo a una disminución del peso corporal en machos (Figura 44A). Aunque observamos una leve reducción en la grasa magra en los ratones mutantes en comparación con los controles 11 semanas después de la cirugía estereotáxica, esta diferencia no alcanzó significación estadística (Figura 44B). Sin embargo, la disminución del peso corporal sí se asoció con una reducción de los depósitos de grasa subcutánea (Figura 44C). Este fenotipo difiere del observado en los ratones *AMPK γ 2cKO*, quienes experimentaron un aumento del peso corporal (Figura 19A). Es importante destacar que esta disminución en el

peso corporal no estuvo asociada a cambios en la ingesta total de alimentos (Figura 45A), ni a la ingesta diaria durante los ciclos de luz y oscuridad (Figura 45B).

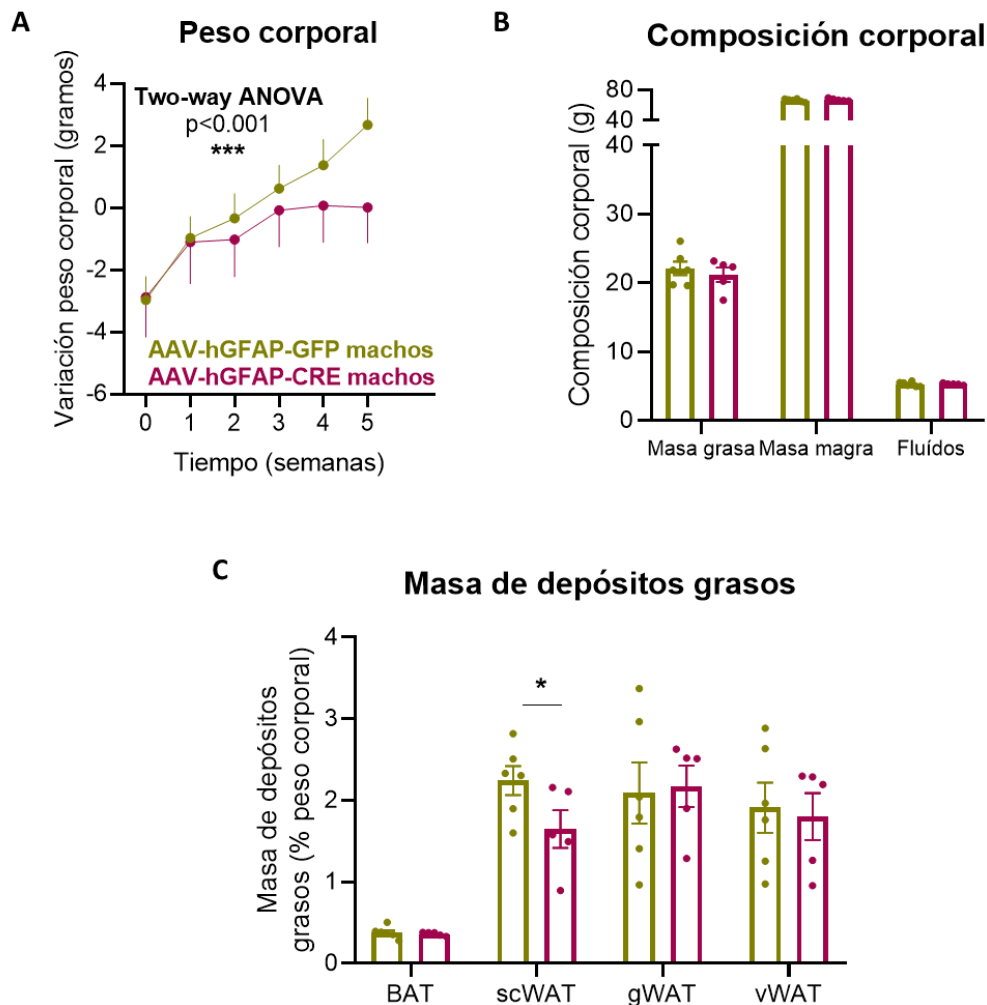


Figura 44. Efecto de la eliminación de AMPK γ 2 en los astrocitos del VMH en el balance energético de los machos. (A) Ganancia de masa corporal de machos control y mutantes (n=7-8). Los datos están expresados como media \pm SEM (Two-way ANOVA, ***p<0.001 vs control). (B) Composición corporal de machos control y mutantes 10 semanas después de la cirugía estereotáxica (n=5-6). Los datos están expresados como media \pm SEM. (C) Masa de los depósitos de grasa de machos y hembras control y mutantes (n=5-6). Los datos están expresados como media \pm SEM (test t-Student, *p<0.05 vs control).

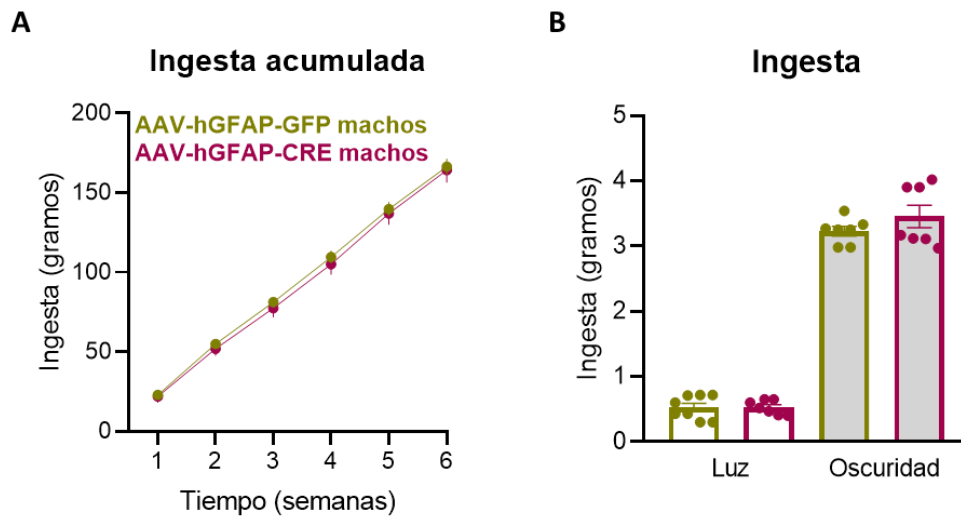


Figura 45. Efecto de la eliminación de AMPK γ 2 en los astrocitos del VMH en la ingesta de los machos. (A) Ingesta acumulada de machos control y mutantes (n=7-8). Los datos están expresados como media \pm SEM. (B) Ingesta en el ciclo de luz y en el ciclo de oscuridad de machos control y mutantes (n=7-8). Los datos están expresados como media \pm SEM.

Curiosamente, observamos una tendencia hacia una temperatura corporal más elevada en los ratones mutantes (Figura 46A), aunque no se observaron diferencias en la temperatura del BAT (Figura 46B) 5 semanas después de la esterotaxia. Esta observación concuerda con la ausencia de cambios significativos en los niveles proteicos de UCP1 en el BAT (Figura 46C).

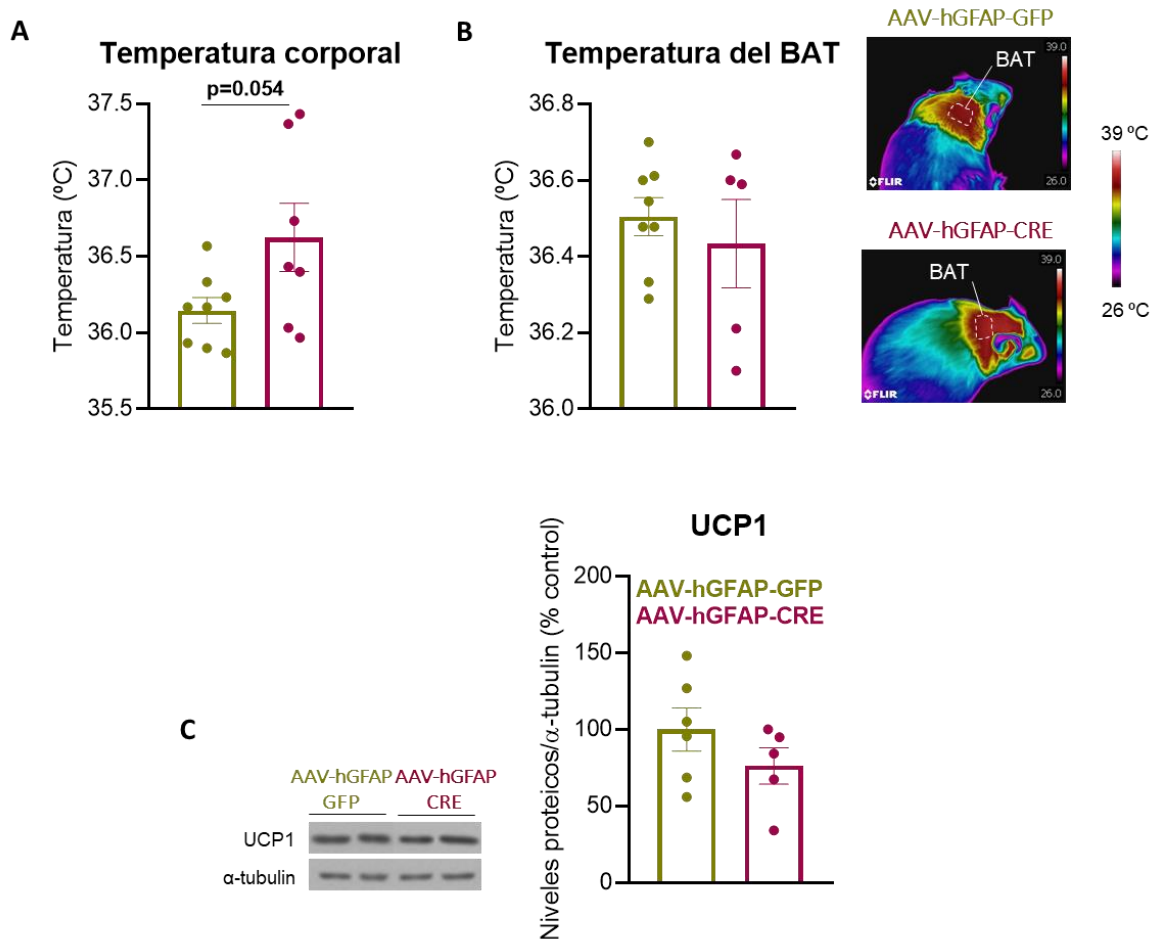


Figura 46. Efecto de la eliminación de AMPK γ 2 en los astrocitos del VMH en la termogénesis de los machos. (A) Temperatura corporal, (B) temperatura del área del BAT y (C) niveles proteicos de UCP1 en BAT de machos control y mutantes (n=5-8). Los datos están expresados como media \pm SEM.

La eliminación de AMPK γ 2 en los astrocitos del VMH en machos provocó un incremento en el gasto energético (Figura 47A) y una disminución en la actividad locomotora (Figura 47B) después de 11 semanas de la inoculación de los adenovirus. Estos resultados sugieren que la activación constitutiva de AMPK desempeña un papel en el control del peso corporal en machos, principalmente a través de la modulación del gasto energético. Sin embargo, se plantea la posibilidad de que otros núcleos hipotalámicos contribuyan al fenotipo metabólico observado en los machos *AMPK γ 2cKO*.

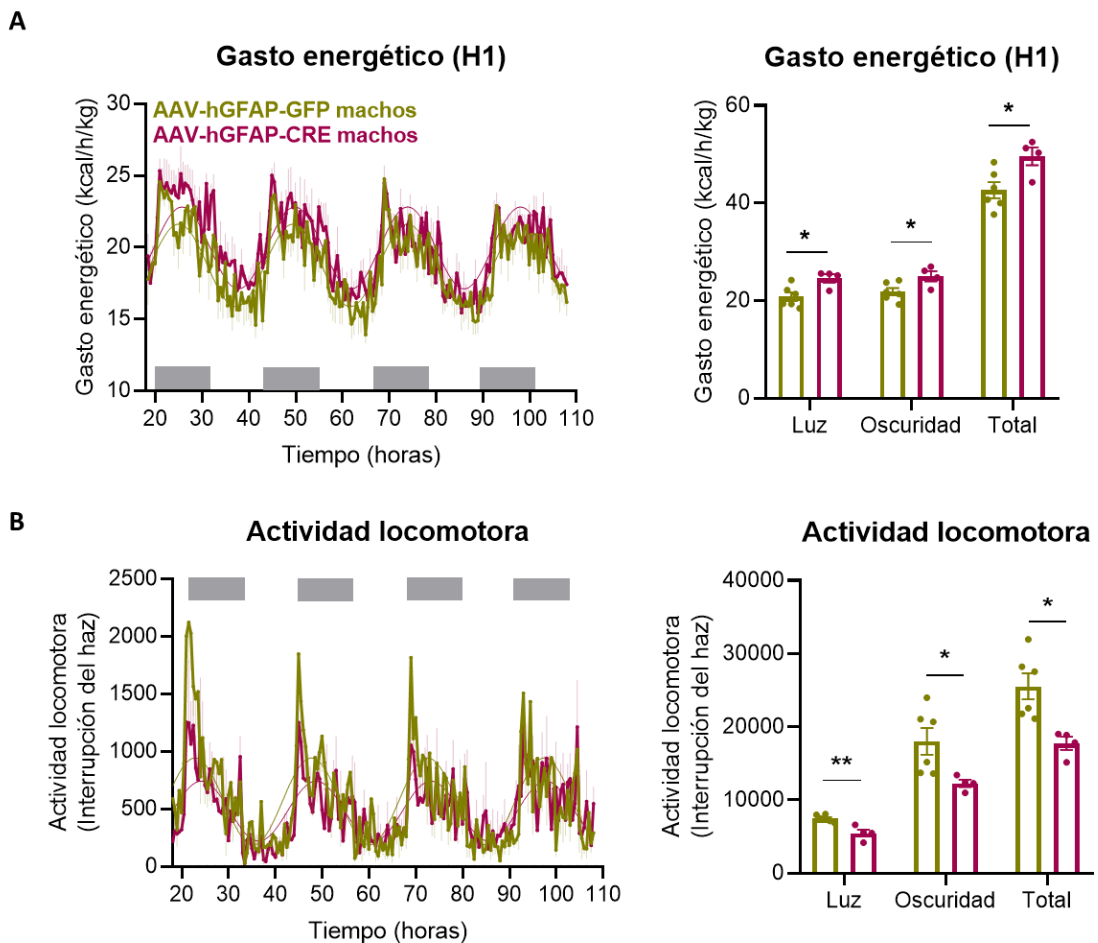


Figura 47. Efecto de la eliminación de AMPK γ 2 en los astrocitos del VMH en el gasto energético y la actividad locomotora de los machos. (A) Gasto energético (H1) de machos control y mutantes (n=5-6). Las áreas de color gris en las gráficas indican la fase de oscuridad. Los datos están expresados como media \pm SEM. Los datos experimentales se ajustaron al cosinor (test t-Student, *p<0.05 vs control). (B) Actividad locomotora de machos control y mutantes (n=5-6). Los datos están expresados como media \pm SEM. Los datos experimentales se ajustaron al modelo cosinor (test t-Student, *p<0.05 y **p<0.01 vs control).

Las hembras que fueron sometidas a la inyección estereotáxica de AAV-hGFAP-CRE, también mostraron una reducción en el peso corporal en comparación con las hembras control (Figura 48A). Esta disminución del peso corporal estuvo acompañada por una reducción en la masa grasa (Figura 48B) y en los depósitos de grasa subcutánea, gonadal y visceral (Figura 48C), a diferencia de lo observado en las hembras *AMPK γ 2cKO* (Figura 20A). Aunque no se observaron cambios significativos en la ingesta acumulada de alimentos (Figura 49A), hubo una tendencia hacia una menor ingesta durante los ciclos de luz (Figura 49B) durante la semana 4 del experimento.

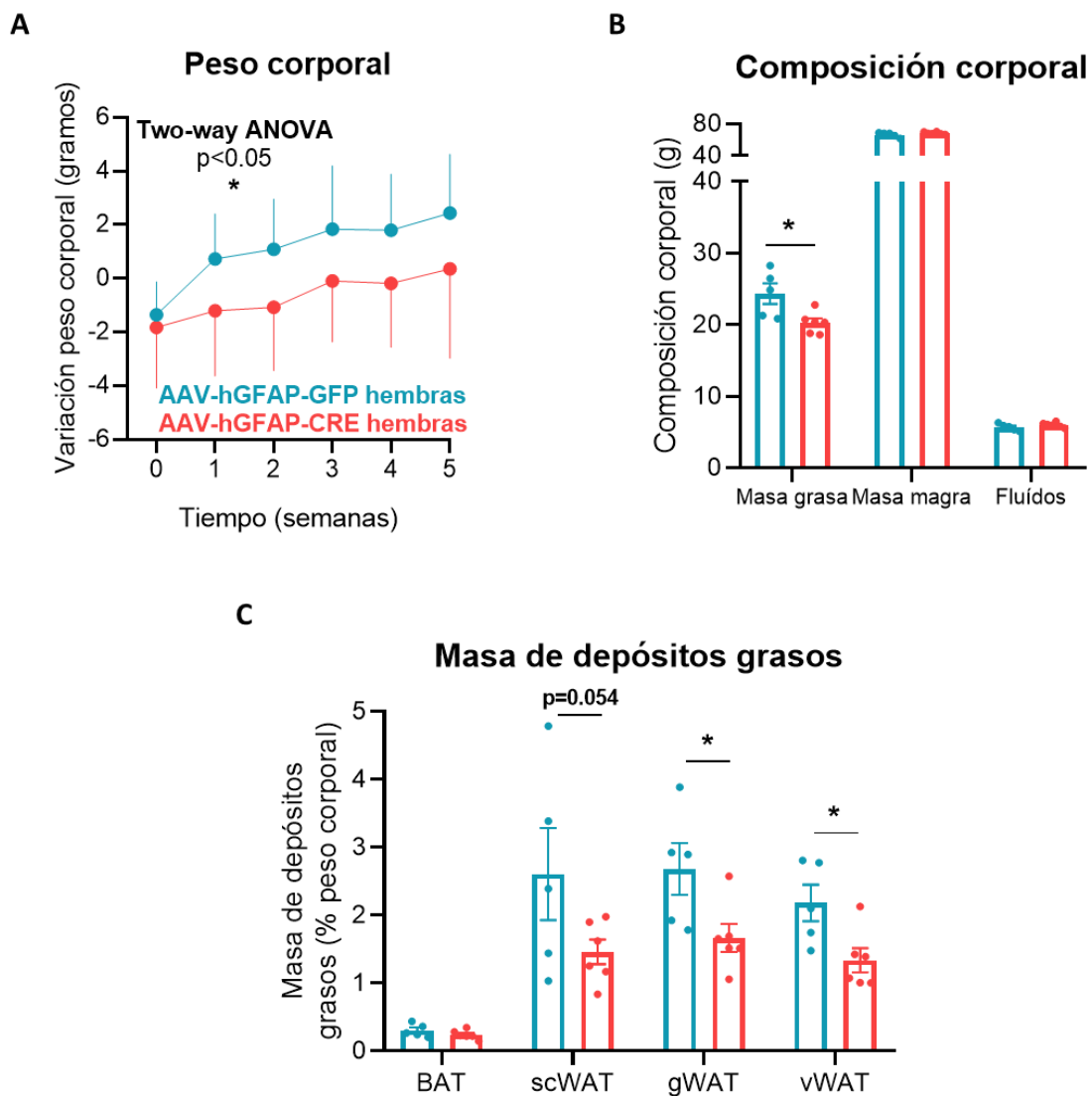


Figura 48. Efecto de la eliminación de AMPK2 en los astrocitos del VMH en el balance energético de las hembras. (A) Ganancia de masa corporal de hembras control y mutantes (n=5-7). Los datos están expresados como media \pm SEM (Two-way ANOVA, *p<0.05 vs control). (B) Composición corporal de hembras control y mutantes 10 semanas después de la cirugía estereotáxica (n=5-6). Los datos están expresados como media \pm SEM (test t-Student, *p<0.05 vs control). (C) Masa de los depósitos de grasa de hembras control y mutantes (n=5-6). Los datos están expresados como media \pm SEM (test t-Student, *p<0.05 vs control).

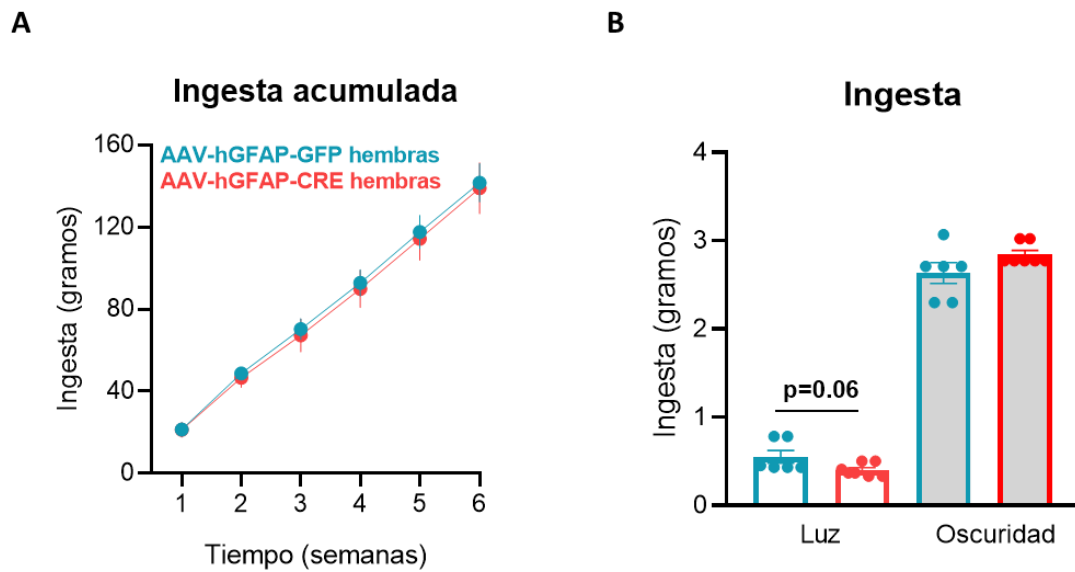


Figura 49. Efecto de la eliminación de AMPK γ 2 en los astrocitos del VMH en la ingesta de las hembras. (A) Ingesta acumulada de hembras control y mutantes (n=7-8). Los datos están expresados como media \pm SEM. (B) Ingesta en el ciclo de luz y en el ciclo de oscuridad de hembras control y mutantes (n=7-8). Los datos están expresados como media \pm SEM.

Además, se observó que las hembras mutantes, no presentaban variaciones en su temperatura corporal (Figura 50A), pero sí mostraban un aumento en la temperatura del BAT (Figura 50B) en la semana 5 tras la realización de la cirugía estereotáxica, lo cual estaba en consonancia con el incremento significativo en los niveles proteicos de UCP1 en BAT (Figura 50C). La eliminación de AMPK γ 2 en los astrocitos del VMH en hembras resultó en un aumento tanto del gasto energético (Figura 51A), como de la actividad locomotora, (Figura 51B) 11 semanas después de la administración de los adenovirus. Estos resultados, junto con el aumento en la termogénesis, proporcionan una explicación para la reducción en el peso corporal de las hembras que presentan la delección de AMPK γ 2 en los astrocitos del VMH.

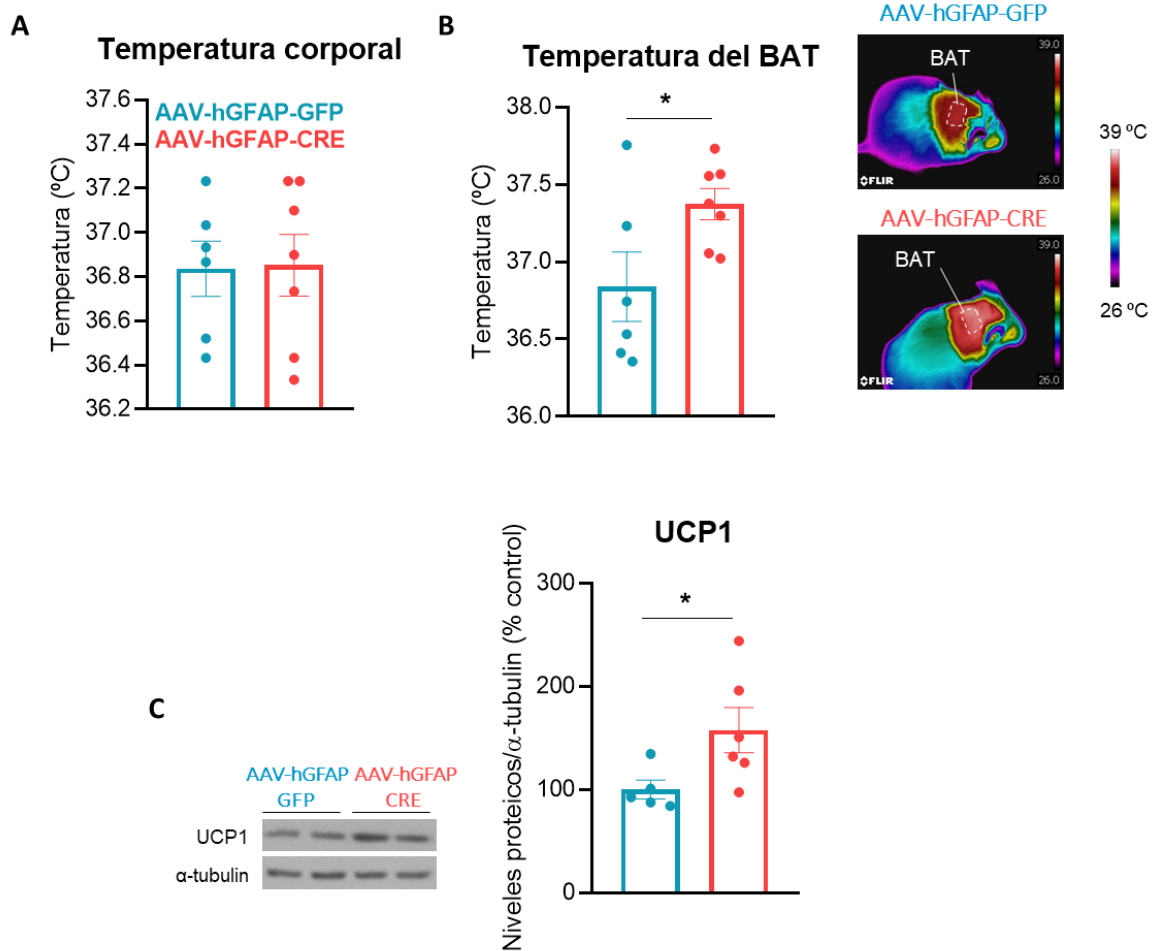


Figura 50. Efecto de la eliminación de AMPK γ 2 en los astrocitos del VMH en la termogénesis de las hembras. (A) Temperatura corporal, (B) temperatura del área del BAT y (C) niveles proteicos de UCP1 en BAT de hembras control y mutantes (n=6-7). Los datos están expresados como media \pm SEM (test t-Student, *p<0.05 vs control).

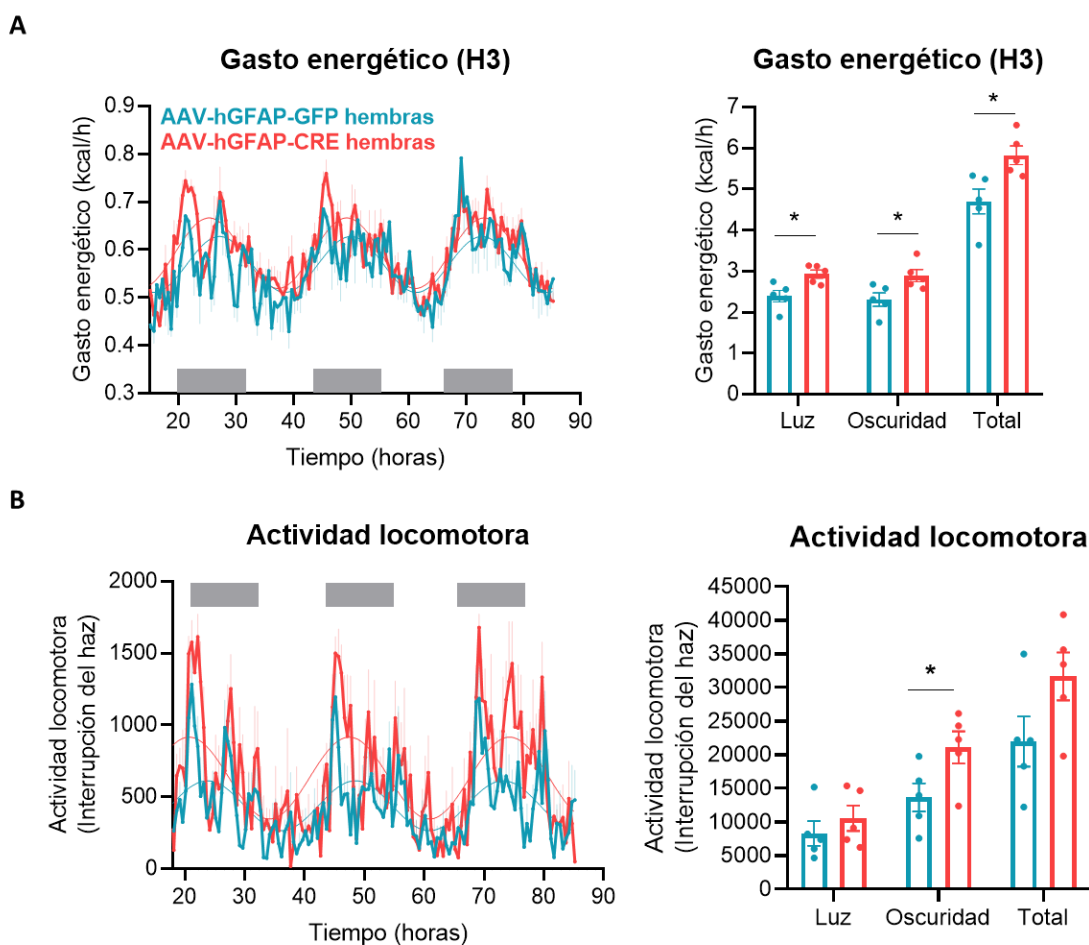


Figura 51. Efecto de la eliminación de AMPK γ 2 en los astrocitos del VMH en el gasto energético y la actividad locomotora de las hembras. (A) Gasto energético (H1) de hembras control y mutantes (n=5-6). Las áreas de color gris en las gráficas indican la fase de oscuridad. Los datos están expresados como media \pm SEM. Los datos experimentales se ajustaron al cosinor (test t-Student, *p<0.05 vs control). (B) Actividad locomotora de machos control y mutantes (n=5-6). Los datos están expresados como media \pm SEM. Los datos experimentales se ajustaron al cosinor (test t-Student, *p<0.05 vs control vs control).

En resumen, la eliminación de AMPK γ 2 en los astrocitos del VMH tuvo efectos metabólicos distintos en machos y hembras. En machos, se redujo el peso corporal y los depósitos de grasa subcutánea, mientras que se incrementó el gasto energético y se redujo la actividad locomotora. En hembras, también disminuyó el peso corporal, junto con la masa grasa y los depósitos de grasa subcutánea, gonadal y visceral. Además, se observó un aumento en la temperatura del BAT, acompañado de un aumento en el gasto energético y la actividad locomotora. Estos resultados demuestran un dimorfismo en la respuesta metabólica a la eliminación de AMPK γ 2 en astrocitos del VMH entre machos y hembras. Asimismo, destacar que la respuesta en los ratones *AMPK γ 2cKO* difiere notablemente, indicando la influencia de otros núcleos hipotalámicos en la regulación metabólica. Estos hallazgos resaltan la complejidad de la homeostasis energética y la interacción entre diferentes regiones hipotalámicas en la modulación de los efectos metabólicos.

En el análisis del efecto de la eliminación de AMPK γ 2 en los astrocitos del VMH sobre el sistema circadiano, evaluamos su posible influencia en la sincronización del SCN a la luz y al FEO al patrón de alimentación a través de estudios de la actividad locomotora. Los machos mutantes no mostraron diferencias significativas en la actividad locomotora (Figura 52A) 7 semanas después de la inoculación de los adenovirus. Además, no se observaron cambios en la periodicidad (Figura 52B). Aunque se apreció una tendencia a una menor amplitud en el periodograma de los mutantes (Figura 52C), esta tendencia no alcanzó resultados significativos. En conjunto, esto sugiere que la señalización de AMPK en los astrocitos del VMH no reproduce los resultados observados en los *AMPK γ 2cKO*.

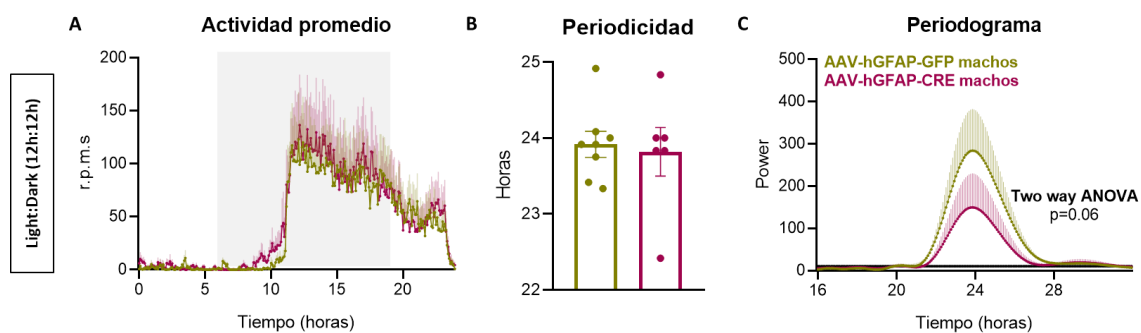


Figura 52. Efecto de la eliminación de AMPK γ 2 en los astrocitos del VMH en la actividad locomotora circadiana de los machos. (A) Actividad promedio durante los ciclos de LD de machos AMPK γ 2^{flox/flox} inyectados con AAV-hGFAP-GFP (control) o AAV-hGFAP-Cre (mutantes) (n=7-8). La actividad se expresa como el promedio de actividad en intervalos de 5 minutos. Los datos se representan con horas nocturnas de 8 a 20 y se expresan en hora tiempo Zeitgeber (ZT). Los datos están expresados como media \pm SEM (Two-way ANOVA). (B) Periodicidad de machos control y mutantes en LD (n=6-8). Los datos están expresados como media \pm SEM (test t-Student). (C) Periodogramas Lomb-Scargle de machos control y mutantes en LD (n=5-6). Los datos están expresados como media \pm SEM (Two-way ANOVA).

Después de administrar AAV-hGFAP-CRE a los machos y someterlos al paradigma de restricción alimentaria (RF), se observó que la eliminación de AMPK γ 2 en los astrocitos del VMH no afectó la anticipación a la alimentación durante el paradigma RF 6h (Figura 53A). Sin embargo, durante el paradigma RF 4h, se detectaron dos picos de actividad: uno dos horas antes del acceso a la comida (ZT2) y otro justo antes del acceso a la comida (ZT4) (Figura 53B). Pese a esta supresión temporal de la FAA en los mutantes, no se observaron diferencias significativas en la FAA o en la actividad total con respecto a los controles (Figura 53C y 53D).

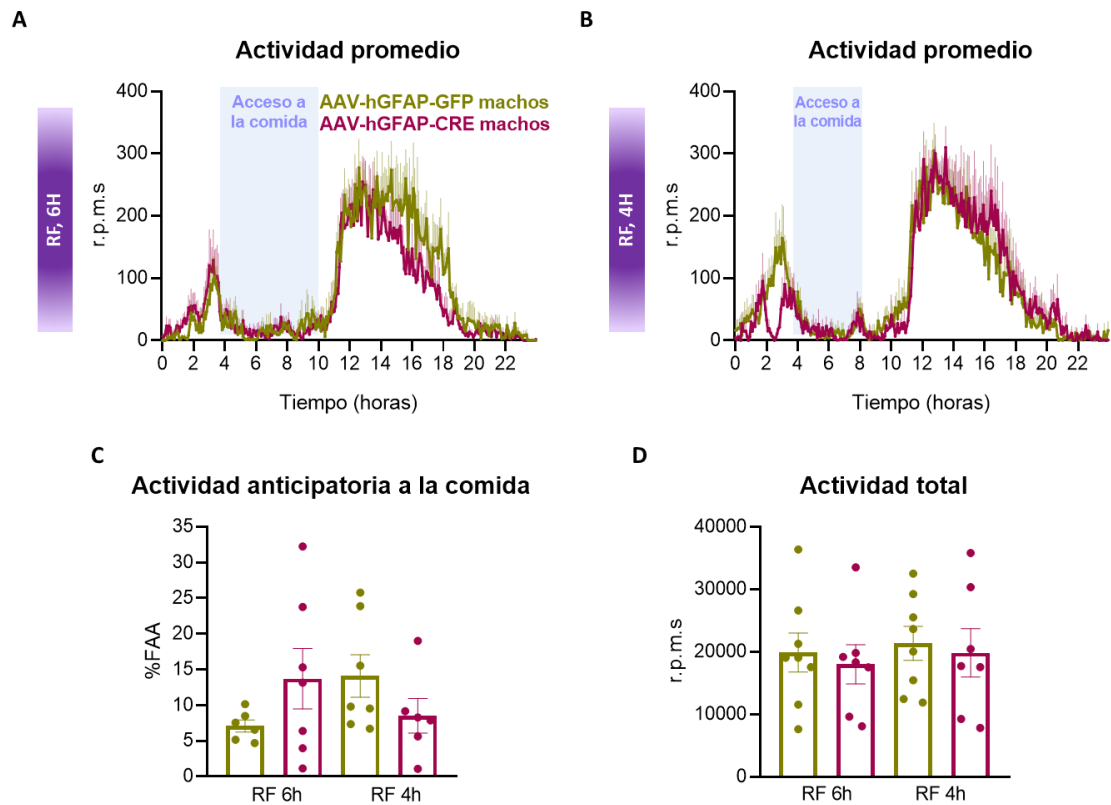


Figura 53. Efecto de la eliminación de AMPK γ 2 en los astrocitos del VMH en la anticipación a la comida de los machos. (A) Gráficas de actividad promedio durante el paradigma de restricción de alimentos (RF) desde ZT 4-10 (RF 6h) (n=6-7) y (B) ZT 4-8 (RF 4h) de machos control y mutantes (n=6-7). Las áreas de color azul en las gráficas indican el tiempo de alimentación. Los datos están expresados como media \pm SEM. (C) Porcentaje de FAA durante el paradigma de RF en machos control y mutantes (n=6-7). Los datos están expresados como media \pm SEM. (D) Actividad total durante el paradigma RF en machos control y mutantes (n=7-8). Los datos están expresados como media \pm SEM.

En relación con las hembras que recibieron la inyección estereotáxica de AAV-hGFAP-CRE en el VMH, después de 7 semanas no se observaron cambios en la actividad locomotora circadiana (Figura 54A). Específicamente, no se evidenciaron variaciones en la periodicidad (Figura 54B) ni en la amplitud del periodograma (Figura 54C), en consonancia con lo observado en las hembras *AMPK γ 2cKO*. También en concordancia con los resultados de las hembras *AMPK γ 2cKO* sometidas al paradigma de RF, la eliminación de AMPK γ 2 en el VMH no tuvo efecto en la adquisición de la anticipación a la alimentación durante el paradigma RF de 6 horas (Figura 55A) ni en el mantenimiento de la anticipación a la alimentación durante el paradigma RF de 4 horas (Figura 55B).

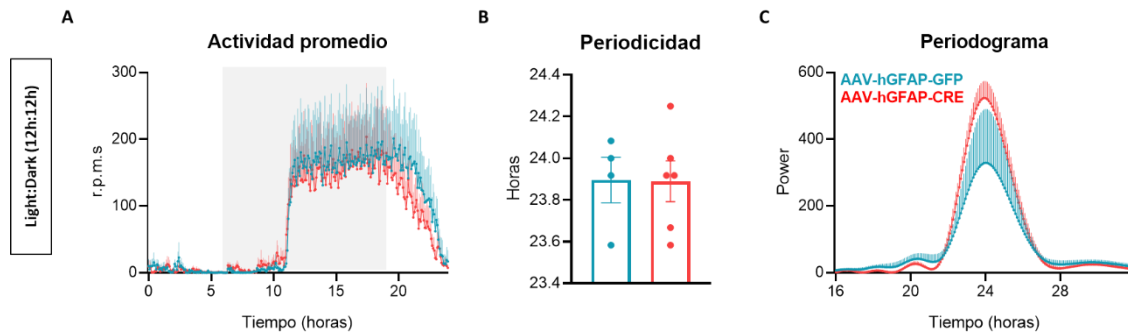


Figura 54. Efecto de la eliminación de AMPK γ 2 en los astrocitos del VMH en la actividad locomotora circadiana de las hembras. (A) Actividad promedio durante los ciclos de LD de hembras AMPK γ 2^{fl α /fl α} inyectadas con AAV-hGFAP-GFP (control) o AAV-hGFAP-Cre (mutantes) (n=6-7). La actividad se expresa como el promedio de actividad en intervalos de 5 minutos. Los datos se representan con horas nocturnas de 8 a 20 y se expresan en hora tiempo Zeitgeber (ZT). Los datos están expresados como media \pm SEM. (B) Periodicidad de hembras control y mutantes en LD (n=5-6). Los datos están expresados como media \pm SEM. (C) Periodogramas Lomb-Scargle de hembras control y mutantes en LD (n=4). Los datos están expresados como media \pm SEM.

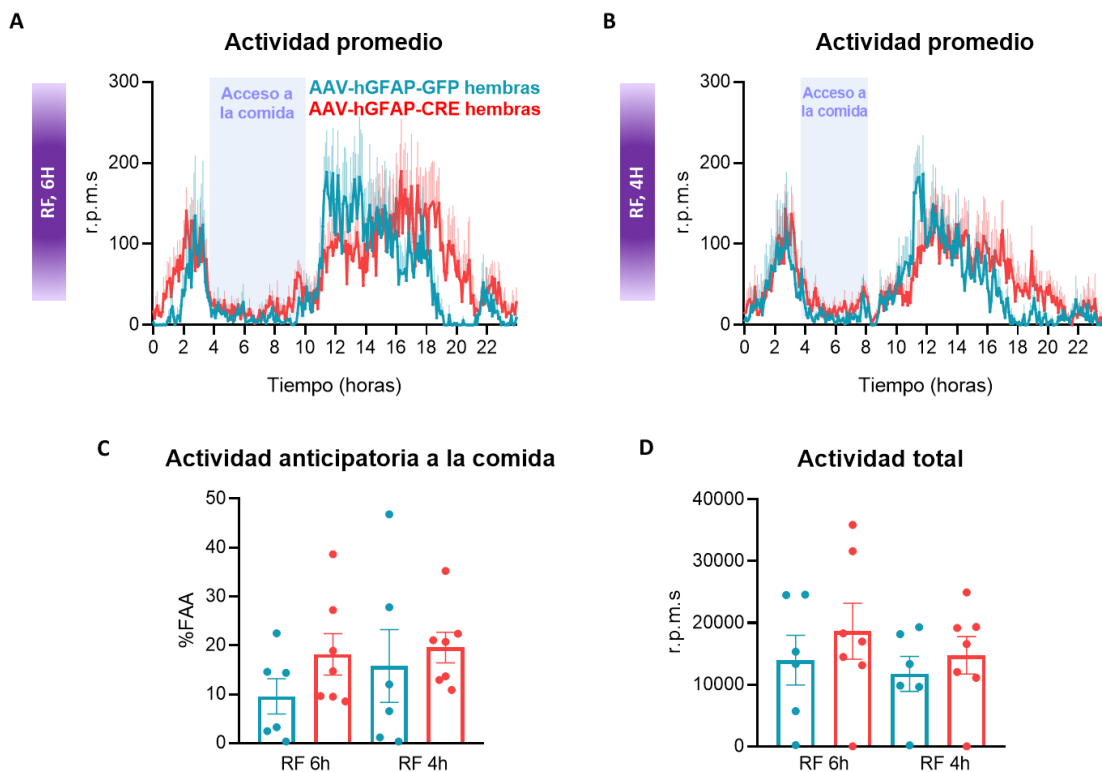


Figura 55. Efecto de la eliminación de AMPK γ 2 en los astrocitos del VMH en la anticipación a la comida de las hembras. (A) Gráficas de actividad promedio durante el paradigma de restricción de alimentos (RF) desde ZT 4-10 (RF 6h) (n=5-7) y (B) ZT 4-8 (RF 4h) de hembras control y mutantes (n=5-7). Las áreas de color azul en las gráficas indican el tiempo de alimentación. Los datos están expresados como media \pm SEM (Two-way ANOVA). (C) Porcentaje de FAA y (D) actividad total durante el paradigma RF en hembras control y mutantes (n=6-7). Los datos están expresados como media \pm SEM.

DISCUSIÓN

En los mamíferos, los ritmos circadianos, controlados principalmente por el SCN hipotalámico, rigen procesos fisiológicos y conductuales rítmicos como la oscilación diaria del metabolismo de la glucosa, la ingesta de alimentos, el gasto energético y la sensibilidad a la insulina de todo el organismo (Barca-Mayo & López, 2021; Eckel-Mahan & Sassone-Corsi, 2013). Las alteraciones en el ciclo circadiano, ya sea por factores ambientales o genéticos, están estrechamente vinculadas a enfermedades metabólicas tanto en humanos como en roedores (Barca-Mayo & López, 2021). Dada la prevalencia alarmante de la obesidad y su conexión con alteraciones circadianas, comprender mejor la interrelación entre la perturbación del ritmo circadiano y el equilibrio energético podría arrojar luz sobre los mecanismos fisiopatológicos subyacentes al aumento de peso. Este conocimiento, a largo plazo, podría contribuir al diseño de estrategias efectivas para abordar la pandemia de la obesidad (Basolo et al., 2021).

El hipotálamo desempeña un papel fundamental en la regulación de la homeostasis energética, integrando señales periféricas como hormonas y metabolitos para generar respuestas neuronales (Saper & Lowell, 2014). Esta regulación afecta tanto a la ingesta de alimentos como al gasto energético, especialmente a través de la modulación de la termogénesis en el BAT. A nivel molecular, la enzima AMPK juega un papel crucial en la integración de señales periféricas y es una vía central en la regulación del balance energético (López et al., 2016). Por otro lado, se ha establecido que AMPK es un importante sensor metabólico que transmite señales dependientes de la energía al reloj circadiano de los mamíferos, participando en la fosforilación y desestabilización de las proteínas CRY y PER. La composición de subunidades de AMPK, su localización subcelular y la fosforilación de sus sustratos están influenciadas por la hora del reloj (Jordan & Lamia, 2013). Dado el papel bien establecido de AMPK en diversos aspectos de la fisiología metabólica, la interacción recíproca entre AMPK y los relojes circadianos probablemente desempeña un papel esencial en la regulación metabólica circadiana (Jordan & Lamia, 2013). Aunque se ha estudiado ampliamente la función de AMPK en las neuronas de varios núcleos hipotalámicos (Claret et al., 2007; Martínez-Sánchez et al., 2017; Seoane-Collazo et al., 2018), queda por determinar si esta enzima puede ejercer funciones similares en otros tipos celulares del hipotálamo.

Aunque tradicionalmente se consideraban solo como células de soporte en el cerebro, los astrocitos han emergido como actores clave en la regulación de la fisiología y el comportamiento circadianos. Tanto las neuronas como los astrocitos del SCN coordinan los ritmos circadianos generados por osciladores autónomos presentes en todas las células del cuerpo. Esta coordinación es esencial para sincronizar los ritmos circadianos a nivel sistémico (Barca Mayo et al., 2019; Barca-Mayo et al., 2017; Brancaccio et al., 2017, 2019; Moore & Eichler, 1972; Stephan & Zucker, 1972; Tso et al., 2017). Además de su función en la coordinación circadiana, los astrocitos juegan un papel importante en la señalización y detección de ciertos metabolitos y hormonas, como leptina e insulina. Estas interacciones afectan al metabolismo y a la actividad neuronal, participando así en la regulación de la homeostasis energética (Fuente-Martín et al., 2012; García-Cáceres et al., 2016; Kim et al., 2014).

En este estudio, nos propusimos investigar los efectos de la delección de AMPK γ 2 en los astrocitos sobre el balance energético y la actividad circadiana. Para ello, se empleó un sistema Cre-lox inducible por Tx, específico para astrocitos positivos para GLAST. Nuestros resultados muestran que la delección de AMPK γ 2 en astrocitos provoca un aumento del peso corporal tanto en machos como en hembras. Asimismo, en los machos mutantes, el incremento de peso corporal se asocia con un aumento en la ingesta de alimentos y una disminución en el gasto energético. Por su parte, en las hembras mutantes se observó un aumento en el peso corporal que parece estar relacionado con un menor gasto energético y menor termogénesis del BAT. Estos hallazgos indican que la delección de AMPK γ 2 en astrocitos puede afectar de diferentes formas al gasto energético en función del sexo. Además, estos datos son especialmente relevantes al mostrar una respuesta específica en función del tipo celular ya que, por ejemplo, la delección de AMPK α 1 en las neuronas SF1 del VMH, protege contra la ganancia de peso en dietas normales y ricas en grasas (Martínez-Sánchez et al., 2017; Seoane-Collazo et al., 2018).

Dada la participación de los astrocitos en la detección y homeostasis de la glucosa (Chari et al., 2011), y la implicación de AMPK en la detección de la hipoglucemia y generación de respuestas contrarreguladoras (Fan et al., 2009; McCrimmon et al., 2008), exploramos la posibilidad de una desregulación en la homeostasis de la glucosa en nuestro modelo animal *AMPK γ 2cKO*. Sin embargo, no se observaron diferencias en los niveles de glucosa *ad libitum* ni en ayuno de los ratones *AMPK γ 2cKO* machos o hembras y tampoco se reflejaron diferencias en la tolerancia a glucosa, a piruvato o a la sensibilidad a insulina en ninguno de los dos sexos. Estos resultados sugieren que, a pesar de la influencia de AMPK en el cerebro en la regulación metabólica, la activación constitutiva de AMPK en astrocitos no tiene un impacto directo en la homeostasis de la glucosa. Es crucial tener en cuenta que estas pruebas de tolerancia se llevaron a cabo cuando los ratones mutantes machos comenzaban a aumentar de peso, lo que sugiere que en este momento no se manifiesta un cierto grado de resistencia a la insulina.

Además, se exploró cómo la activación constitutiva de AMPK en astrocitos impacta en el SCN y los ritmos circadianos en machos y hembras. Nuestros resultados indicaron que la activación constitutiva de AMPK en astrocitos machos altera la sincronización del SCN a la luz y aumenta la periodicidad de los ritmos de actividad locomotora en un entorno sin señales temporales externas de luz y oscuridad. En concordancia con este hallazgo, observamos una reducción en los niveles de VIP en el SCN de los ratones mutantes en comparación con los ratones control. Es relevante destacar que investigaciones previas habían sugerido que la activación de AMPK conduce a la degradación de las proteínas PER2 y CRY1, componentes esenciales del reloj circadiano (Lamia et al., 2009; Um et al., 2007). En línea con esta observación, nuestros resultados mostraron una disminución en los niveles hipotalámicos de PER2 y CRY1 en los ratones *AMPK γ 2cKO* en comparación con los ratones control. Estos hallazgos respaldan la hipótesis de que AMPK podría formar parte del reloj molecular en los astrocitos, influyendo en la regulación de los ritmos circadianos de PER2 y CRY1. Curiosamente, se observó que las hembras presentaban menos alteraciones en el patrón de actividad locomotora en condiciones constantes de oscuridad (DD), sugiriendo que la respuesta de los astrocitos al cambio en la señalización de AMPK puede variar según el sexo. Estos hallazgos resaltan la complejidad de la interacción entre la activación de AMPK en

astrocitos y la regulación de los ritmos circadianos, señalando la necesidad de investigaciones adicionales para comprender completamente las diferencias de sexo en esta dinámica.

Dada la importancia de AMPK como sensor metabólico esencial en las células y su influencia en la sincronización del SCN a la luz, exploramos si la activación constitutiva de AMPK en astrocitos podría afectar a la capacidad de los animales para sincronizarse con los patrones de alimentación. Sorprendentemente, los ratones macho *AMPK γ 2cKO* mostraron una disminución en la anticipación a la alimentación en comparación con los ratones control. Además, se observó que los ratones mutantes no reducían su actividad nocturna de la misma manera que lo hacían los controles durante el paradigma RF 4h, sugiriendo una menor adquisición de la FAA en los ratones mutantes. Este hallazgo resalta que la activación constitutiva de AMPK en astrocitos interfiere con el comportamiento de anticipación a la comida. Sin embargo, la delección de AMPK γ 2 en astrocitos no altera la adquisición de la FAA en hembras. Aunque se ha descrito la existencia de dimorfismo sexual en el momento de la adquisición y la amplitud de la FAA (Aguayo et al., 2018), todavía se desconoce la causa subyacente de dicha diferencia de sexo, pero no está relacionada con las hormonas sexuales gonadales (Aguayo et al., 2018).

La FAA o anticipación a la alimentación, está regulada por un oscilador (conocido como FEO) cuya ubicación exacta es aún desconocida y que opera de manera independiente al SCN (Mistlberger, 2020). Se ha propuesto recientemente que la señalización de la insulina desencadenada después de la alimentación es esencial para sincronizar el FEO con el patrón de alimentación, y esto se logra mediante la regulación de la proteína PER2 (Crosby et al., 2019). Este mecanismo permite que el FEO se ajuste y sincronice con los horarios de alimentación, contribuyendo así a la anticipación a la hora de comer. Diversos estudios, junto con nuestros resultados, sugieren que los astrocitos forman parte integral del FEO. En primer lugar, los astrocitos no solo son capaces de generar oscilaciones circadianas autónomas, sino que también pueden modular la expresión génica del reloj de otros tipos de células como las neuronas (Barca Mayo et al., 2019; Barca-Mayo et al., 2017, 2020). En segundo lugar, la reducción significativa en la expresión de PER2 en el hipotálamo de los ratones macho *AMPK γ 2cKO*, quienes también presentan alteraciones en la FAA, respalda la hipótesis de que los astrocitos podrían formar parte esencial del FEO. Dado que PER2 es esencial para la FAA (Feillet et al., 2006), y la preservación de este comportamiento en ratones con delección de PER2 en neuronas preservan la FAA (Chavan et al., 2016), se sugiere que los astrocitos pueden desempeñar un papel crucial en el FEO.

Por otra parte, abordamos el papel del VMH en la regulación del equilibrio energético y circadiano. A pesar de la comprensión de la importancia del VMH en estos procesos (Guilding et al., 2009; López, 2022; López et al., 2016; Orozco-Solis et al., 2016), aún no se había explorado completamente la función específica de los astrocitos en el VMH en relación con la homeostasis energética y el comportamiento circadiano. La eliminación de AMPK γ 2 en los astrocitos del VMH provocó cambios en el perfil metabólico, pero éstos no reprodujeron completamente el fenotipo observado en los ratones *AMPK γ 2cKO*. En machos, la eliminación de AMPK γ 2 en los astrocitos del VMH resultó en una disminución del peso corporal y de los depósitos de grasa subcutánea, acompañada de un aumento en el gasto energético y una reducción en la actividad locomotora. Por otro lado, en hembras, se observó

una disminución del peso corporal, de la masa grasa y de los depósitos de grasa subcutánea, gonadal y visceral. Además, se registró un aumento en la temperatura del BAT, junto con un incremento en el gasto energético y la actividad locomotora. Estos resultados evidencian un dimorfismo sexual en la respuesta metabólica a la eliminación de AMPK γ 2 en astrocitos del VMH. Es importante señalar que la respuesta en los ratones *AMPK γ 2cKO* fue notablemente diferente, indicando la influencia de otros núcleos hipotalámicos en la regulación metabólica. Estos hallazgos destacan la complejidad de la homeostasis energética y la interacción entre diferentes regiones hipotalámicas en la regulación de los efectos metabólicos.

Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en la actividad locomotora circadiana, la periodicidad ni la amplitud del periodograma en los machos con delección de AMPK γ 2 en el VMH. Esto sugiere que las alteraciones observadas en los ratones *AMPK γ 2cKO* eran debidas a la activación constitutiva de AMPK en el SCN. Sin embargo, al someter a ratones con delección de AMPK γ 2 en astrocitos del VMH al paradigma de restricción alimentaria (RF), se observaron dos picos de actividad: uno 2 horas antes del acceso a la comida (ZT2) y otro justo antes del acceso (ZT4) durante la segunda fase del paradigma RF 4h. Es fundamental destacar que las señales externas, como la luz o el patrón de alimentación, que sincronizan los marcapasos circadianos (SCN y FEO), tienen un impacto en la actividad locomotora del día siguiente. En este contexto, una activación constitutiva de AMPK en el VMH podría estar suprimiendo la anticipación a la alimentación dos horas antes de la administración de la comida. Así, la activación de AMPK en astrocitos en el VMH operaría como una señal anticipatoria que suprime la anticipación a la alimentación. En caso de ser demostrada esta hipótesis, los astrocitos del VMH podrían formar parte del FEO y regular la sincronización al patrón de alimentación mediante la activación de AMPK. En hembras con la delección de AMPK γ 2 en astrocitos del VMH, no se evidenciaron cambios en la actividad locomotora circadiana, sugiriendo que la señalización de AMPK en estos astrocitos no afecta a la estabilidad del reloj circadiano en hembras. En cuanto a la anticipación a la alimentación en el paradigma RF, no se observaron impactos en la adquisición durante RF 6h ni en el mantenimiento durante RF 4h en hembras mutantes. Estos hallazgos resaltan la complejidad de la relación entre la señalización de AMPK en astrocitos del VMH, la anticipación a la alimentación y la respuesta circadiana, revelando diferencias notables entre machos y hembras.

Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral revelan una alteración en el balance energético tras la eliminación de AMPK γ 2 en astrocitos. La disrupción en el cambio de la FAA en ratones *AMPK γ 2cKO* sugiere posibles alteraciones en la sincronización del oscilador circadiano o en la homeostasis metabólica. La interconexión entre el metabolismo y el reloj circadiano es bidireccional, y modelos animales con defectos genéticos en el reloj de los astrocitos muestran anomalías metabólicas. Nuestros hallazgos sobre la significativa contribución de los astrocitos a la sincronización dependiente de la luz y la alimentación, que asegura la precisión ciclo a ciclo de la ritmicidad circadiana, podrían abrir nuevas perspectivas para abordar trastornos metabólicos asociados a desajustes circadianos.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos durante la realización de la presente tesis doctoral basados en la generación de dos nuevos modelos animales mediante la modificación genética o virogenética nos permiten establecer las siguientes conclusiones:

- La delección de AMPK γ 2 en los astrocitos GLAST-positivos en ratones macho provoca un aumento del peso corporal, un incremento de la ingesta y la disminución del gasto energético, un fenotipo que no está mediado por los astrocitos del VMH.
- La delección de AMPK γ 2 en los astrocitos GLAST-positivos en ratones hembra provoca un incremento del peso corporal, una disminución del gasto energético y de la termogénesis del BAT, un fenotipo que no está mediado por los astrocitos del VMH. Estos resultados indican que la delección de AMPK γ 2 en astrocitos puede afectar de diferentes formas al gasto energético en función del sexo.
- La delección de AMPK γ 2 en los astrocitos GLAST-positivos en ratones macho aumenta el período, afecta al acoplamiento del SCN y altera la anticipación al tiempo de las comidas, probablemente mediante la supresión de PER2 y VIP.
- La delección de AMPK γ 2 en los astrocitos GLAST-positivos tiene un impacto menor en la actividad locomotora circadiana y no altera la adquisición de la actividad anticipatoria a las comidas en ratones hembra.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, N. J., Patabendige, A. A. K., Dolman, D. E. M., Yusof, S. R., & Begley, D. J. (2010). Structure and function of the blood–brain barrier. *Neurobiology of Disease*, *37*(1), 13-25. <https://doi.org/10.1016/J.NBD.2009.07.030>
- Abe, Y. O., Yoshitane, H., Kim, D. W., Kawakami, S., Koebis, M., Nakao, K., Aiba, A., Kim, J. K., & Fukada, Y. (2022). Rhythmic transcription of *Bmal1* stabilizes the circadian timekeeping system in mammals. *Nature Communications*, *13*(4652), 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32326-9>
- Abrahamson, E. E., & Moore, R. Y. (2001). Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. *Brain Research*, *916*(1-2), 172-191. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(01\)02890-6](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)02890-6)
- Acosta-Rodríguez, V., Rijo-Ferreira, F., Izumo, M., Xu, P., Wight-Carter, M., Green, C. B., & Takahashi, J. S. (2022). Circadian alignment of early onset caloric restriction promotes longevity in male C57BL/6J mice. *Science*, *376*(6598), 1192-1202. <https://doi.org/10.1126/science.abk0297>
- Aguayo, A., Martin, C. S., Huddy, T. F., Ogawa-Okada, M., Adkins, J. L., & Steele, A. D. (2018). Sex differences in circadian food anticipatory activity are not altered by individual manipulations of sex hormones or sex chromosome copy number in mice. *PLOS ONE*, *13*(1), e0191373. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191373>
- Akieda-Asai, S., Poleni, P. E., & Date, Y. (2014). Coinjection of CCK and leptin reduces food intake via increased CART/TRH and reduced AMPK phosphorylation in the hypothalamus. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, *306*(11), 1284-1291. <https://doi.org/10.1152/AJPENDO.00664.2013/ASSET/IMAGES/LARGE/ZH10111471410005.JPE>
- Al Massadi, O., López, M., Tschöp, M., Diéguez, C., & Nogueiras, R. (2017). Current Understanding of the Hypothalamic Ghrelin Pathways Inducing Appetite and Adiposity. *Neurosciences*, *40*(3), 167-180. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2016.12.003>
- Al Massadi, O., Nogueiras, R., Dieguez, C., & Girault, J. A. (2019). Ghrelin and food reward. *Neuropharmacology*, *148*, 131-138. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2019.01.001>
- Albrecht, U. (2017). The circadian clock, metabolism and obesity. *Obesity Reviews*, *18*, 25-33. <https://doi.org/10.1111/OBR.12502>
- Albrecht, U., & Ripperger, J. A. (2018). Circadian Clocks and Sleep: Impact of Rhythmic Metabolism and Waste Clearance on the Brain. *Trends in Neurosciences*, *41*(10), 677-688. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2018.07.007>
- Allen, N. J., & Barres, B. A. (2009). Glia — more than just brain glue. *Nature*, *457*(7230), 675-677. <https://doi.org/10.1038/457675a>
- Allen, N. J., & Eroglu, C. (2017). Cell Biology of Astrocyte-Synapse Interactions. *Neuron*, *96*(3), 697-708. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2017.09.056>

- Al-Massadi, O., Dieguez, C., Schneeberger, M., López, M., Schwaninger, M., Prevot, V., & Nogueiras, R. (2021). Multifaceted actions of melanin-concentrating hormone on mammalian energy homeostasis. *Nature reviews. Endocrinology*, *17*(12), 745-755.
<https://doi.org/10.1038/S41574-021-00559-1>
- Alquier, T., Kawashima, J., Tsuji, Y., & Kahn, B. B. (2007). Role of Hypothalamic Adenosine 5-Monophosphate-Activated Protein Kinase in the Impaired Counterregulatory Response Induced by Repetitive Neuroglucopenia. *Endocrinology*, *148*(3), 1367-1375.
<https://doi.org/10.1210/en.2006-1039>
- Álvarez-Crespo, M., Csikasz, R. I., Martínez-Sánchez, N., Diéguez, C., Cannon, B., Nedergaard, J., & López, M. (2016). Essential role of UCP1 modulating the central effects of thyroid hormones on energy balance. *Molecular Metabolism*, *5*(4), 271-282.
<https://doi.org/10.1016/j.molmet.2016.01.008>
- Andersson, U., Filipsson, K., Abbott, C. R., Woods, A., Smith, K., Bloom, S. R., Carling, D., & Small, C. J. (2004). AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake. *The Journal of biological chemistry*, *279*(13), 12005-12008.
<https://doi.org/10.1074/JBC.C300557200>
- Anlauf, E., & Derouiche, A. (2013). Glutamine Synthetase as an Astrocytic Marker: Its Cell Type and Vesicle Localization. *Frontiers in Endocrinology*, *4*.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00144>
- Arad, M., Benson, D. W., Perez-Atayde, A. R., McKenna, W. J., Sparks, E. A., Kanter, R. J., McGarry, K., Seidman, J. G., & Seidman, C. E. (2002). Constitutively active AMP kinase mutations cause glycogen storage disease mimicking hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of Clinical Investigation*, *109*(3), 357-362. <https://doi.org/10.1172/JCI14571>
- Arad, M., Moskowitz, I. P., Patel, V. V., Ahmad, F., Perez-Atayde, A. R., Sawyer, D. B., Walter, M., Li, G. H., Burgon, P. G., Maguire, C. T., Stapleton, D., Schmitt, J. P., Guo, X. X., Pizard, A., Kupersmidt, S., Roden, D. M., Berul, C. I., Seidman, C. E., & Seidman, J. G. (2003). Transgenic Mice Overexpressing Mutant *PRKAG2* Define the Cause of Wolff-Parkinson-White Syndrome in Glycogen Storage Cardiomyopathy. *Circulation*, *107*(22), 2850-2856.
<https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000075270.13497.2B>
- Arble, D. M., Bass, J., Laposky, A. D., Vitaterna, M. H., & Turek, F. W. (2009). Circadian timing of food intake contributes to weight gain. *Obesity*, *17*(11), 2100-2102.
<https://doi.org/10.1038/OBY.2009.264>
- Argente-Arizón, P., Guerra-Cantera, S., Garcia-Segura, L. M., Argente, J., & Chowen, J. A. (2017). Glial cells and energy balance. *Journal of molecular endocrinology*, *58*(1), R59-R71.
<https://doi.org/10.1530/JME-16-0182>
- Arluison, M., Quignon, M., Nguyen, P., Thorens, B., Leloup, C., & Penicaud, L. (2004). Distribution and anatomical localization of the glucose transporter 2 (GLUT2) in the adult rat brain - An immunohistochemical study. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, *28*(3), 117-136.
<https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2004.05.009>

- Arluison, M., Quignon, M., Thorens, B., Leloup, C., & Penicaud, L. (2004). Immunocytochemical localization of the glucose transporter 2 (GLUT2) in the adult rat brain. II. Electron microscopic study. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 28(3), 137-146. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2004.06.002>
- Asher, G., Reinke, H., Altmeyer, M., Gutierrez-Arcelus, M., Hottiger, M. O., & Schibler, U. (2010). Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1 Participates in the Phase Entrainment of Circadian Clocks to Feeding. *Cell*, 142(6), 943-953. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.08.016>
- Aton, S. J., Colwell, C. S., Harmar, A. J., Waschek, J., & Herzog, E. D. (2005). Vasoactive intestinal polypeptide mediates circadian rhythmicity and synchrony in mammalian clock neurons. *Nature neuroscience*, 8(4), 476-483. <https://doi.org/10.1038/NN1419>
- Balieiro, L. C. T., Rossato, L. T., Waterhouse, J., Paim, S. L., Mota, M. C., & Crispim, C. A. (2014). Nutritional status and eating habits of bus drivers during the day and night. *Chronobiology International*, 31(10), 1123-1129. <https://doi.org/10.3109/07420528.2014.957299>
- Baquedano, E., Chowen, J. A., Argente, J., & Frago, L. M. (2013). Differential effects of GH and GH-releasing peptide-6 on astrocytes. *Journal of Endocrinology*, 218(3), 263-274. <https://doi.org/10.1530/JOE-13-0053>
- Barca Mayo, O., Berdondini, L., & De Pietri Tonelli, D. (2019). Astrocytes and circadian rhythms: An emerging astrocyte–neuron synergy in the timekeeping system. *Methods in Molecular Biology*, 1938, 131-154. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9068-9_10/COVER
- Barca-Mayo, O., Boender, A. J., Armirotti, A., & De Pietri Tonelli, D. (2020). Deletion of astrocytic BMAL1 results in metabolic imbalance and shorter lifespan in mice. *GLIA*, 68(6), 1131-1147. <https://doi.org/10.1002/GLIA.23764>
- Barca-Mayo, O., & López, M. (2021). Astrocyte Clocks and Glucose Homeostasis. *Frontiers in Endocrinology*, 12, 1-16. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.662017>
- Barca-Mayo, O., Pons-Espinal, M., Follert, P., Armirotti, A., Berdondini, L., De, D., & Tonelli, P. (2017). Astrocyte deletion of Bmal1 alters daily locomotor activity and cognitive functions via GABA signalling. *Nature Communications*, 8(14336), 1-14. <https://doi.org/10.1038/ncomms14336>
- Barker, A., Sharp, S. J., Timpson, N. J., Bouatia-Naji, N., Warrington, N. M., Kanoni, S., Beilin, L. J., Brage, S., Deloukas, P., Evans, D. M., Grontved, A., Hassanali, N., Lawlor, D. A., Lecoeur, C., Loos, R. J. F., Lye, S. J., McCarthy, M. I., Mori, T. A., Ndiaye, N. C., ... Langenberg, C. (2011). Association of genetic Loci with glucose levels in childhood and adolescence: a meta-analysis of over 6,000 children. *Diabetes*, 60(6), 1805-1812. <https://doi.org/10.2337/DB10-1575>
- Barres, B. A. (2008). The Mystery and Magic of Glia: A Perspective on Their Roles in Health and Disease. *Neuron*, 60(3), 430-440. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.10.013>

- Basolo, A., Bechi Genzano, S., Piaggi, P., Krakoff, J., & Santini, F. (2021). Energy Balance and Control of Body Weight: Possible Effects of Meal Timing and Circadian Rhythm Dysregulation. *Nutrients*, *13*(9), 3276. <https://doi.org/10.3390/nu13093276>
- Batiuk, M. Y., Martirosyan, A., Wahis, J., de Vin, F., Marneffe, C., Kusserow, C., Koeppen, J., Viana, J. F., Oliveira, J. F., Voet, T., Ponting, C. P., Belgard, T. G., & Holt, M. G. (2020). Identification of region-specific astrocyte subtypes at single cell resolution. *Nature Communications*, *11*(1), 1220. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-14198-8>
- Baumgart, E. V., Barbosa, J. S., Bally-cuif, L., Götz, M., & Ninkovic, J. (2012). Stab wound injury of the zebrafish telencephalon: A model for comparative analysis of reactive gliosis. *Glia*, *60*(3), 343-357. <https://doi.org/10.1002/glia.22269>
- Bayraktar, O. A., Bartels, T., Holmqvist, S., Kleshchevnikov, V., Martirosyan, A., Polioudakis, D., Ben Haim, L., Young, A. M. H., Batiuk, M. Y., Prakash, K., Brown, A., Roberts, K., Paredes, M. F., Kawaguchi, R., Stockley, J. H., Sabeur, K., Chang, S. M., Huang, E., Hutchinson, P., ... Rowitch, D. H. (2020). Astrocyte layers in the mammalian cerebral cortex revealed by a single-cell in situ transcriptomic map. *Nature Neuroscience*, *23*(4), 500-509. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-0602-1>
- Becquet, D., Girardet, C., Guillaumond, F., François-Bellan, A. M., & Bosler, O. (2008). Ultrastructural plasticity in the rat suprachiasmatic nucleus. Possible involvement in clock entrainment. *Glia*, *56*(3), 294-305. <https://doi.org/10.1002/GLIA.20613>
- Beiroa, D., Imbernon, M., Gallego, R., Senra, A., Herranz, D., Villarroya, F., Serrano, M., Fernø, J., Salvador, J., Escalada, J., Dieguez, C., Lopez, M., Frühbeck, G., & Nogueiras, R. (2014). GLP-1 agonism stimulates brown adipose tissue thermogenesis and browning through hypothalamic AMPK. *Diabetes*, *63*(10), 3346-3358. <https://doi.org/10.2337/DB14-0302>
- Bergersen, L. H. (2007). Is lactate food for neurons? Comparison of monocarboxylate transporter subtypes in brain and muscle. *Neuroscience*, *145*(1), 11-19. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2006.11.062>
- Bergersen, L. H., & Gjedde, A. (2012). Is lactate a volume transmitter of metabolic states of the brain? *Frontiers in Neuroenergetics*, *4*(5), 1-6. <https://doi.org/10.3389/FNENE.2012.00005>
- Bernstein, J. J., & Bernstein, M. E. (1967). Effect of glial-ependymal scar and Teflon arrest on the regenerative capacity of goldfish spinal cord. *Experimental Neurology*, *19*(1), 25-32. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(67\)90004-0](https://doi.org/10.1016/0014-4886(67)90004-0)
- Bhatnagar, A. (2017). Environmental Determinants of Cardiovascular Disease. *Circulation Research*, *121*(2), 162-180. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.306458>
- Bignami, A., & Dahl, D. (1976). The astroglial response to stabbing. Immunofluorescence studies with antibodies to astrocyte-specific protein (GFA) in mammalian and submammalian vertebrates. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, *2*(2), 99-110. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.1976.tb00488.x>
- Blair, E. (2001). Mutations in the gamma2 subunit of AMP-activated protein kinase cause familial hypertrophic cardiomyopathy: evidence for the central role of energy compromise in disease

- pathogenesis. *Human Molecular Genetics*, 10(11), 1215-1220.
<https://doi.org/10.1093/hmg/10.11.1215>
- Bonham, M. P., Bonnell, E. K., & Huggins, C. E. (2016). Energy intake of shift workers compared to fixed day workers: A systematic review and meta-analysis. *Chronobiology International*, 33(8), 1086-1100. <https://doi.org/10.1080/07420528.2016.1192188>
- Bosy-Westphal, A., Hinrichs, S., Jauch-Chara, K., Hitze, B., Later, W., Wilms, B., Settler, U., Peters, A., Kiosz, D., & Müller, M. J. (2008). Influence of partial sleep deprivation on energy balance and insulin sensitivity in healthy women. *Obesity facts*, 1(5), 266-273. <https://doi.org/10.1159/000158874>
- Brancaccio, M., Edwards, M. D., Patton, A. P., Smyllie, N. J., Chesham, J. E., Maywood, E. S., & Hastings, M. H. (2019). Cell-autonomous clock of astrocytes drives circadian behavior in mammals. *Science*, 363(6423), 187-192. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAT4104>
- Brancaccio, M., Patton, A. P., Chesham, J. E., Maywood, E. S., & Hastings, M. H. (2017). Astrocytes Control Circadian Timekeeping in the Suprachiasmatic Nucleus via Glutamatergic Signaling. *Neuron*, 93(6), 1420-1435.e5. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2017.02.030>
- Buckman, L. B., Thompson, M. M., Lippert, R. N., Blackwell, T. S., Yull, F. E., & Ellacott, K. L. J. (2015). Evidence for a novel functional role of astrocytes in the acute homeostatic response to high-fat diet intake in mice. *Molecular Metabolism*, 4(1), 58-63. <https://doi.org/10.1016/J.MOLMET.2014.10.001>
- Buckman, L. B., Thompson, M. M., Moreno, H. N., & Ellacott, K. L. J. (2013). Regional astrogliosis in the mouse hypothalamus in response to obesity. *Journal of Comparative Neurology*, 521(6), 1322-1333. <https://doi.org/10.1002/cne.23233>
- Buffo, A., Rite, I., Tripathi, P., Lepier, A., Colak, D., Horn, A.-P., Mori, T., & Götz, M. (2008). Origin and progeny of reactive gliosis: A source of multipotent cells in the injured brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(9), 3581-3586. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709002105>
- Burwinkel, B., Scott, J. W., Bühner, C., van Landeghem, F. K. H., Cox, G. F., Wilson, C. J., Grahame Hardie, D., & Kilimann, M. W. (2005). Fatal Congenital Heart Glycogenosis Caused by a Recurrent Activating R531Q Mutation in the γ 2-Subunit of AMP-Activated Protein Kinase (PRKAG2), Not by Phosphorylase Kinase Deficiency. *The American Journal of Human Genetics*, 76(6), 1034-1049. <https://doi.org/10.1086/430840>
- Bush, T. G., Puvanachandra, N., Horner, C. H., Polito, A., Ostenfeld, T., Svendsen, C. N., Mucke, L., Johnson, M. H., & Sofroniew, M. V. (1999). Leukocyte Infiltration, Neuronal Degeneration, and Neurite Outgrowth after Ablation of Scar-Forming, Reactive Astrocytes in Adult Transgenic Mice. *Neuron*, 23(2), 297-308. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80781-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80781-3)
- Buxton, O. M., Cain, S. W., O'Connor, S. P., Porter, J. H., Duffy, J. F., Wang, W., Czeisler, C. A., & Shea, S. A. (2012). Adverse metabolic consequences in humans of prolonged sleep

- restriction combined with circadian disruption. *Science translational medicine*, 4(129), 1-19. <https://doi.org/10.1126/SCITRANSLMED.3003200>
- Cahoy, J. D., Emery, B., Kaushal, A., Foo, L. C., Zamanian, J. L., Christopherson, K. S., Xing, Y., Lubischer, J. L., Krieg, P. A., Krupenko, S. A., Thompson, W. J., & Barres, B. A. (2008). A Transcriptome Database for Astrocytes, Neurons, and Oligodendrocytes: A New Resource for Understanding Brain Development and Function. *The Journal of Neuroscience*, 28(1), 264-278. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4178-07.2008>
- Canabal, D. D., Song, Z., Potian, J. G., Beuve, A., Mcardle, J. J., Routh, V. H., & Routh, V. H. (2007). Glucose, insulin, and leptin signaling pathways modulate nitric oxide synthesis in glucose-inhibited neurons in the ventromedial hypothalamus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 292, 1418-1428. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00216.2006>
- Cannon, B., & Nedergaard, J. (2004). Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. *Physiological Reviews*, 84(1), 277-359. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00015.2003>
- Cansell, C., Stobbe, K., Sanchez, C., Le Thuc, O., Mosser, C., Ben-Fradj, S., Leredde, J., Lebeauvin, C., Debayle, D., Fleuriot, L., Brau, F., Devaux, N., Benani, A., Audinat, E., Blondeau, N., Nahon, J., & Rovère, C. (2021). Dietary fat exacerbates postprandial hypothalamic inflammation involving glial fibrillary acidic protein-positive cells and microglia in male mice. *Glia*, 69(1), 42-60. <https://doi.org/10.1002/glia.23882>
- Cappuccio, F. P., D'Elia, L., Strazzullo, P., & Miller, M. A. (2010). Quantity and quality of sleep and incidence of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes care*, 33(2), 414-420. <https://doi.org/10.2337/DC09-1124>
- Carling, D. (2004). The AMP-activated protein kinase cascade – a unifying system for energy control. *Trends in Biochemical Sciences*, 29(1), 18-24. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2003.11.005>
- Carling, D., Mayer, F. V., & Sanders, M. J. (2011). amp-activated protein kinase: nature's energy sensor. *Nature Chemical Biology*, 7, 512-518. <https://doi.org/10.1038/nchembio.610>
- Carling, D., Zammit, V. A., & Hardie, D. G. (1987). A common bicyclic protein kinase cascade inactivates the regulatory enzymes of fatty acid and cholesterol biosynthesis. *FEBS Letters*, 223(2), 217-222. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(87\)80292-2](https://doi.org/10.1016/0014-5793(87)80292-2)
- Cha, S. H., & Daniel Lane, M. (2009). Central lactate metabolism suppresses food intake via the hypothalamic AMP kinase/malonyl-CoA signaling pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 386, 212-216. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.06.017>
- Chaix, A., Manoogian, E. N. C., Melkani, G. C., & Panda, S. (2019). Time-Restricted Eating to Prevent and Manage Chronic Metabolic Diseases. *Annual Review of Nutrition*, 39(1), 291-315. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-082018-124320>
- Chaput, J. P., McHill, A. W., Cox, R. C., Broussard, J. L., Dutil, C., da Costa, B. G. G., Sampasa-Kanyinga, H., & Wright, K. P. (2023). The role of insufficient sleep and circadian

- misalignment in obesity. *Nature Reviews Endocrinology*, 19(2), 82-97. <https://doi.org/10.1038/S41574-022-00747-7>
- Chari, M., Yang, C. S., Lam, C. K. L., Lee, K., Mighiu, P., Kokorovic, A., G. W. C., Lai, T. Y. Y., Wang, P. Y. T., & Lam, T. K. T. (2011). Glucose transporter-1 in the hypothalamic glial cells mediates glucose sensing to regulate glucose production in vivo. *Diabetes*, 60(7), 1901-1906. <https://doi.org/10.2337/DB11-0120/-/DC1>
- Chaurasia, B., & Summers, S. A. (2015). Ceramides-Lipotoxic Inducers of Metabolic Disorders. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 26(10), 538-550. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2015.07.006>
- Chavan, R., Feillet, C., Costa, S. S. F., Delorme, J. E., Okabe, T., Ripperger, J. A., & Albrecht, U. (2016). Liver-derived ketone bodies are necessary for food anticipation. *Nature communications*, 7(10580), 1-10. <https://doi.org/10.1038/NCOMMS10580>
- Chellappa, S. L., Vujovic, N., Williams, J. S., & Scheer, F. A. J. L. (2019). Impact of Circadian Disruption on Cardiovascular Function and Disease Why Is Time of Day Important for CV Risk? *Trends in Endocrinology & Metabolism*. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 30(10), 767-779. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2019.07.008>
- Cheung, I. N., Zee, P. C., Shalman, D., Malkani, R. G., Kang, J., & Reid, K. J. (2016). Morning and Evening Blue-Enriched Light Exposure Alters Metabolic Function in Normal Weight Adults. *PLoS ONE*, 11(5), 1-18. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0155601>
- Cheung, P. C., Salt, I. P., Davies, S. P., Hardie, D. G., & Carling, D. (2000). Characterization of AMP-activated protein kinase gamma-subunit isoforms and their role in AMP binding. *The Biochemical journal*, 346 Pt 3(Pt 3), 659-669.
- Cho, H., Zhao, X., Hatori, M., Yu, R. T., Barish, G. D., Lam, M. T., Chong, L.-W., Ditacchio, L., Atkins, A. R., Glass, C. K., Liddle, C., Auwerx, J., Downes, M., Panda, S., & Evans, R. M. (2012). Regulation of circadian behaviour and metabolism by REV-ERB-a and REV-ERB-b. *Nature*, 485(7396), 123-127. <https://doi.org/10.1038/nature11048>
- Chouchani, E. T., Kazak, L., & Spiegelman, B. M. (2019). New Advances in Adaptive Thermogenesis: UCP1 and Beyond. *Cell Metabolism*, 29(1), 27-37. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2018.11.002>
- Chowen, J. A., & García-Segura, L. M. (2021). Role of glial cells in the generation of sex differences in neurodegenerative diseases and brain aging. *Mechanisms of Ageing and Development*, 196, 111473. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2021.111473>
- Chung, W.-S., Allen, N. J., & Eroglu, C. (2015). Astrocytes Control Synapse Formation, Function, and Elimination. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(9), a020370. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020370>
- Claret, M., Smith, M. A., Batterham, R. L., Selman, C., Choudhury, A. I., Fryer, L. G. D., Clements, M., Al-Qassab, H., Heffron, H., Xu, A. W., Speakman, J. R., Barsh, G. S., Viollet, B., Vaulont, S., Ashford, M. L. J., Carling, D., & Withers, D. J. (2007). AMPK is essential for energy

- homeostasis regulation and glucose sensing by POMC and AgRP neurons. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(8), 2325-2336. <https://doi.org/10.1172/JCI31516>
- Clarke, L. E., Liddelow, S. A., Chakraborty, C., Münch, A. E., Heiman, M., & Barres, B. A. (2018). Normal aging induces A1-like astrocyte reactivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(8). <https://doi.org/10.1073/pnas.1800165115>
- Colwell, C. S., Michel, S., Itri, J., Rodriguez, W., Tam, J., Lelievre, V., Hu, Z., Liu, X., & Waschek, J. A. (2003). Disrupted circadian rhythms in VIP- and PHI-deficient mice. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 285(5), R939-R349. <https://doi.org/10.1152/AJPREGU.00200.2003>
- Contreras, C., Gonzalez, F., Fernø, J., Diéguez, C., Rahmouni, K., Nogueiras, R., & López, M. (2015). The brain and brown fat. *Annals of Medicine*, 47(2), 150-168. <https://doi.org/10.3109/07853890.2014.919727>
- Contreras, C., González-García, I., Martínez-Sánchez, N., Seoane-Collazo, P., Jacas, J., Morgan, D. A., Serra, D., Gallego, R., Gonzalez, F., Casals, N., Nogueiras, R., Rahmouni, K., Diéguez, C., & López, M. (2014). Central ceramide-induced hypothalamic lipotoxicity and ER stress regulate energy balance. *Cell Reports*, 9(1), 366-377. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2014.08.057>
- Contreras, C., González-García, I., Seoane-Collazo, P., Martínez-Sánchez, N., Liñares-Pose, L., Rial-Pensado, E., Fernø, J., Tena-Sempere, M., Casals, N., Diéguez, C., Nogueiras, R., & López, M. (2017). Reduction of hypothalamic endoplasmic reticulum stress activates browning of white fat and ameliorates obesity. *Diabetes*, 66(1), 87-99. <https://doi.org/10.2337/DB15-1547>
- Contreras, C., Nogueiras, R., Diéguez, C., Medina-Gómez, G., & López, M. (2016). Hypothalamus and thermogenesis: Heating the BAT, browning the WAT. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 438, 107-115. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.08.002>
- Contreras, C., Nogueiras, R., Diéguez, C., Rahmouni, K., & López, M. (2017). Traveling from the hypothalamus to the adipose tissue: The thermogenic pathway. *Redox Biology*, 12, 854-863. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.04.019>
- Coppari, R., & Bjørnbæk, C. (2012). Leptin revisited: Its mechanism of action and potential for treating diabetes. *Nature Reviews Drug Discovery*, 11(9), 692-708. <https://doi.org/10.1038/NRD3757>
- Costanzo-Garvey, D. L., Pfluger, P. T., Dougherty, M. K., Stock, J. L., Boehm, M., Chaika, O., Fernandez, M. R., Fisher, K., Kortum, R. L., Hong, E. G., Jun, J. Y., Ko, H. J., Schreiner, A., Volle, D. J., Treece, T., Swift, A. L., Winer, M., Chen, D., Wu, M., ... Lewis, R. E. (2009). KSR2 Is an Essential Regulator of AMP Kinase, Energy Expenditure, and Insulin Sensitivity. *Cell Metabolism*, 10(5), 366-378. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2009.09.010>
- Cox, K. H., & Takahashi, J. S. (2019). Circadian Clock Genes and the Transcriptional Architecture of the Clock Mechanism. *Journal of molecular endocrinology*, 63(4), R93-R102. <https://doi.org/10.1530/JME-19-0153>

- Crosby, P., Hamnett, R., Clevers, H., Bechtold, D. A., O', J. S., & Correspondence, N. (2019). Insulin/IGF-1 Drives PERIOD Synthesis to Entrain Circadian Rhythms with Feeding Time. *Cell*, *177*, 896-909. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.02.017>
- Damiola, F., Le Minh, N., Preitner, N., Kornmann, B., Fleury-Olela, F., & Schibler, U. (2000). Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes and Development*, *14*, 2950-2961. <https://doi.org/10.1101/gad.183500>
- Dang, F., Sun, X., Ma, X., Wu, R., Zhang, D., Chen, Y., Xu, Q., Wu, Y., & Liu, Y. (2016). Insulin post-transcriptionally modulates Bmal1 protein to affect the hepatic circadian clock. *Nature Communications* *2016 7:1*, *7*(1), 1-12. <https://doi.org/10.1038/ncomms12696>
- Daval, M., Foufelle, F., & Ferré, P. (2006). Functions of AMP-activated protein kinase in adipose tissue. *Journal of Physiology*, *574*(1), 55-62. <https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.2006.111484>
- Davidson, A. J. (2009). Lesion studies targeting food-anticipatory activity. *European Journal of Neuroscience*, *30*(9), 1658-1664. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.06961.x>
- Davis, A. M., Seney, M. L., Stallings, N. R., Zhao, L., Parker, K. L., & Tobet, S. A. (2004). Loss of steroidogenic factor 1 alters cellular topography in the mouse ventromedial nucleus of the hypothalamus. *Journal of Neurobiology*, *60*(4), 424-436. <https://doi.org/10.1002/neu.20030>
- Diéguez, C., Frühbeck, G., & López, M. (2009). Hypothalamic Lipids and the Regulation of Energy Homeostasis. *Obesity Facts*, *2*(2), 126-135. <https://doi.org/10.1159/000209251>
- Dietrich, M. O., & Horvath, T. L. (2009). Feeding signals and brain circuitry. *European Journal of Neuroscience*, *30*(9), 1688-1696. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.06963.x>
- Doherty, J., Logan, M. A., Taşdemir, Ö. E., & Freeman, M. R. (2009). Ensheathing Glia Function as Phagocytes in the Adult Drosophila Brain. *The Journal of Neuroscience*, *29*(15), 4768-4781. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5951-08.2009>
- Doucet, E., Imbeault, P., St-Pierre, S., Alméras, N., Mauriège, P., Després, J. P., Bouchard, C., & Tremblay, A. (2003). Greater than predicted decrease in energy expenditure during exercise after body weight loss in obese men. *Clinical Science*, *105*(1), 89-95. <https://doi.org/10.1042/CS20020252>
- Dupuis, J., Langenberg, C., Prokopenko, I., Saxena, R., Soranzo, N., Jackson, A. U., Wheeler, E., Glazer, N. L., Bouatia-Naji, N., Gloyn, A. L., Lindgren, C. M., Mägi, R., Morris, A. P., Randall, J., Johnson, T., Elliott, P., Rybin, D., Thorleifsson, G., Steinthorsdottir, V., ... Barroso, I. (2010). New genetic loci implicated in fasting glucose homeostasis and their impact on type 2 diabetes risk. *Nature genetics*, *42*(2), 105-116. <https://doi.org/10.1038/NG.520>
- Dyar, K. A., Lutter, D., Artati, A., Ceglia, N. J., Liu, Y., Armenta, D., Jastroch, M., Schneider, S., de Mateo, S., Cervantes, M., Abbondante, S., Tognini, P., Orozco-Solis, R., Kinouchi, K., Wang, C., Swerdlhoff, R., Nadeef, S., Masri, S., Magistretti, P., ... Sassone-Corsi, P. (2018). Atlas of Circadian Metabolism Reveals System-wide Coordination and Communication between Clocks. *Cell*, *174*(6), 1571-1585.e11. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.08.042>

- Eckel-Mahan, K., & Sassone-Corsi, P. (2013). Metabolism and the circadian clock converge. *Physiol Rev*, 93, 107-135. <https://doi.org/10.1152/physrev.00016.2012.-Circadian>
- Egar, M., & Singer, M. (1972). The role of ependyma in spinal cord regeneration in the urodele, *Triturus*. *Experimental Neurology*, 37(2), 422-430. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(72\)90085-4](https://doi.org/10.1016/0014-4886(72)90085-4)
- Elmqvist, J. K., Bjørbaek, C., Ahima, R. S., Flier, J. S., & Saper, C. B. (1998). Distributions of Leptin Receptor mRNA Isoforms in the Rat Brain. *J. Comp. Neurol*, 395, 535-547. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19980615\)395:4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19980615)395:4)
- Escartin, C., Galea, E., Lakatos, A., OCallaghan, J. P., Petzold, G. C., Serrano-Pozo, A., Steinhäuser, C., Volterra, A., Carmignoto, G., Agarwal, A., Allen, N. J., Araque, A., Barbeito, L., Barzilai, A., Bergles, D. E., Bonvento, G., Butt, A. M., Chen, W.-T., Cohen-Salmon, M., Verkhratsky, A. (2021). Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. *Nature Neuroscience*, 24(3), 312-325. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-00783-4>
- Fan, X., Ding, Y., Brown, S., Zhou, L., Shaw, M., Vella, M. C., Cheng, H., McNay, E. C., Sherwin, R. S., & McCrimmon, R. J. (2009). Hypothalamic AMP-activated protein kinase activation with AICAR amplifies counterregulatory responses to hypoglycemia in a rodent model of type 1 diabetes. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 296(6), R1702-R1708. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.90600.2008>
- Feillet, C. A., Ripperger, J. A., Magnone, M. C., Dulloo, A., Albrecht, U., & Challet, E. (2006). Lack of Food Anticipation in Per2 Mutant Mice. *Current Biology*, 16(20), 2016-2022. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.08.053>
- Fernández, D. C., Komal, R., Langel, J., Ma, J., Duy, P. Q., Penzo, M. A., Zhao, H., & Hattar, S. (2020). Retinal innervation tunes circuits that drive nonphotic entrainment to food. *Nature*, 581(7807), 194-198. <https://doi.org/10.1038/S41586-020-2204-1>
- Fernø, J., Varela, L., Skrede, S., Vázquez, M. J., & Nogueiras, R. N. (2011). Olanzapine-Induced Hyperphagia and Weight Gain Associate with Orexigenic Hypothalamic Neuropeptide Signaling without Concomitant AMPK Phosphorylation. *PLoS ONE*, 6(6), 1-9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020571>
- Fields, R. D., & Stevens-Graham, B. (2002). New insights into neuron-glia communication. *Science*, 298(5593), 556-562. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.298.5593.556>
- Folmes, K. D., Chan, A. Y. M., Koonen, D. P. Y., Pulinilkunnil, T. C., Baczkó, I., Hunter, B. E., Thorn, S., Allard, M. F., Roberts, R., Gollob, M. H., Light, P. E., & Dyck, J. R. B. (2009). Distinct Early Signaling Events Resulting From the Expression of the PRKAG2 R302Q Mutant of AMPK Contribute to Increased Myocardial Glycogen. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 2(5), 457-466. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.108.834564>
- Fonken, L. K., & Nelson, R. J. (2014). The effects of light at night on circadian clocks and metabolism. *Endocrine reviews*, 35(4), 648-670. <https://doi.org/10.1210/ER.2013-1051>
- Fonken, L. K., Workman, J. L., Walton, J. C., Weil, Z. M., Morris, J. S., Haim, A., & Nelson, R. J. (2010). Light at night increases body mass by shifting the time of food intake. *Proceedings of*

- the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(43), 18664-18669. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1008734107>
- Foteinou, P. T., Venkataraman, A., Francey, L. J., Anafi, R. C., Hogenesch, J. B., & Iii, F. J. D. (2018). Computational and experimental insights into the circadian effects of SIRT1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(45), 11643-11648. <https://doi.org/10.1073/pnas.1803410115>
- Freeman, M. R. (2010). Specification and morphogenesis of astrocytes. *Science*, 330(6005), 774-778. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1190928>
- Friedman, J. M. (2009). Causes and control of excess body fat. *Nature* 2009 459:7245, 459(7245), 340-342. <https://doi.org/10.1038/459340a>
- Friedman, J. M. (2019). Leptin and the endocrine control of energy balance. *Nature Metabolism* 2019 1:8, 1(8), 754-764. <https://doi.org/10.1038/s42255-019-0095-y>
- Froy, O. (2010). Metabolism and Circadian Rhythms-Implications for Obesity. *Endocrine Reviews*, 31(1), 1-24. <https://doi.org/10.1210/er.2009-0014>
- Fuente-Martín, E., García-Cáceres, C., Argente-Arizón, P., Díaz, F., Granado, M., Freire-Regatillo, A., Castro-González, D., Ceballos, M. L., Frago, L. M., Dickson, S. L., Argente, J., & Chowen, J. A. (2016). Ghrelin Regulates Glucose and Glutamate Transporters in Hypothalamic Astrocytes. *Scientific Reports*, 6(23673), 1-15. <https://doi.org/10.1038/srep23673>
- Fuente-Martín, E., García-Cáceres, C., Díaz, F., Argente-Arizón, P., Granado, M., Barrios, V., Argente, J., & Chowen, J. A. (2013). Hypothalamic inflammation without astrogliosis in response to high sucrose intake is modulated by neonatal nutrition in male rats. *Endocrinology*, 154(7), 2318-2330. <https://doi.org/10.1210/EN.2012-2196>
- Fuente-Martín, E., García-Cáceres, C., Granado, M., De Ceballos, M. L., Ángel Sánchez-Garrido, M., Sarman, B., Liu, Z.-W., Dietrich, M. O., Tena-Sempere, M., Argente-Arizón, P., Díaz, F., Argente, J., Horvath, T. L., & Chowen, J. A. (2012). Leptin regulates glutamate and glucose transporters in hypothalamic astrocytes. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(11), 3900-3913. <https://doi.org/10.1172/JCI64102>
- Gan, Y., Yang, C., Tong, X., Sun, H., Cong, Y., Yin, X., Li, L., Cao, S., Dong, X., Gong, Y., Shi, O., Deng, J., Bi, H., & Lu, Z. (2015). Shift work and diabetes mellitus: a meta-analysis of observational studies. *Occupational and environmental medicine*, 72(1), 72-78. <https://doi.org/10.1136/OEMED-2014-102150>
- Gao, S., Kinzig, K. P., Aja, S., Scott, K. A., Keung, W., Kelly, S., Strynadka, K., Chohnan, S., Smith, W. W., Tamashiro, K. L. K., Ladenheim, E. E., Ronnett, G. V., Tu, Y., Birnbaum, M. J., Lopaschuk, G. D., & Moran, T. H. (2007). Leptin activates hypothalamic acetyl-CoA carboxylase to inhibit food intake. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(44), 17358-17363. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0708385104>
- Gao, Y., Gan, T., Jiang, L., Yu, L., Tang, D., Wang, Y., Li, X., & Ding, G. (2020). Association between shift work and risk of type 2 diabetes mellitus: a systematic review and dose-response

- meta-analysis of observational studies. *Chronobiology International*, 37(1), 29-46. <https://doi.org/10.1080/07420528.2019.1683570>
- Gao, Y., Layritz, C., Legutko, B., Eichmann, T. O., Laperrousaz, E., Moullé, V. S., Cruciani-Guglielmacci, C., Magnan, C., Luquet, S., Woods, S. C., Eckel, R. H., Yi, C. X., Garcia-Caceres, C., & Tschöp, M. H. (2017). Disruption of Lipid Uptake in Astroglia Exacerbates Diet-Induced Obesity. *Diabetes*, 66(10), 2555-2563. <https://doi.org/10.2337/DB16-1278>
- García, D., & Shaw, R. J. (2017). Molecular Cell AMPK: Mechanisms of Cellular Energy Sensing and Restoration of Metabolic Balance. *Molecular Cell*, 66(6), 789-800. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.05.032>
- García-Cáceres, C., Balland, E., Prevot, V., Luquet, S., Woods, S. C., Koch, M., Horvath, T. L., Yi, C.-X., Chowen, J. A., Verkhratsky, A., Araque, A., Bechmann, I., & Tschöp, M. H. (2019). Role of astrocytes, microglia, and tanycytes in brain control of systemic metabolism. *Nature Neuroscience*, 22, 7-14. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0286-y>
- García-Cáceres, C., Fuente-Martán, E., Burgos-Ramos, E., Granado, M., Frago, L. M., Barrios, V., Horvath, T., Argente, J., & Chowen, J. A. (2011). Differential acute and chronic effects of leptin on hypothalamic astrocyte morphology and synaptic protein levels. *Endocrinology*, 152(5), 1809-1818. <https://doi.org/10.1210/EN.2010-1252>
- García-Cáceres, C., Fuente-Martín, E., Argente, J., & Chowen, J. A. (2012). Emerging role of glial cells in the control of body weight. *Molecular Metabolism*, 1, 37-46. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2012.07.001>
- García-Cáceres, C., Quarta, C., Varela, L., Gao, Y., Gruber, T., Legutko, B., Jastroch, M., Johansson, P., Ninkovic, J., Yi, C. X., Le Thuc, O., Szigeti-Buck, K., Cai, W., Meyer, C. W., Pfluger, P. T., Fernández, A. M., Luquet, S., Woods, S. C., Torres-Alemán, I., ... Tschöp, M. H. (2016). Astrocytic Insulin Signaling Couples Brain Glucose Uptake with Nutrient Availability. *Cell*, 166(4), 867-880. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2016.07.028>
- García-Cáceres, C., Yi, C. X., & Tschöp, M. H. (2013). Hypothalamic Astrocytes in Obesity. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 42(1), 57-66. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2012.11.003>
- Giantomasi, L., Ribeiro, J. F., Barca-Mayo, O., Malerba, M., Miele, E., De Pietri Tonelli, D., & Berdondini, L. (2023). Astrocytes actively support long-range molecular clock synchronization of segregated neuronal populations. *Scientific Reports*, 13(4815), 1-13. <https://doi.org/10.1038/S41598-023-31966-1>
- Ginhoux, F., & Prinz, M. (2015). Origin of Microglia: Current Concepts and Past Controversies. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(a020537), 1-15. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020537>
- Girardet, C. C., Blanchard, M.-P., Ferracci, G. R., Vê, C. L., Moreno, M., François-Bellan, A.-M., Becquet, D., & Bosler, O. (2010). Daily changes in synaptic innervation of VIP neurons in the rat suprachiasmatic nucleus: contribution of glutamatergic afferents. *European Journal of Neuroscience*, 31(2), 359-370. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.07071.x>

- Goldman, S. (2003). Glia as neural progenitor cells. *Trends in Neurosciences*, 26(11), 590-596. <https://doi.org/10.1016/J.TINS.2003.09.011>
- Gomes, C., Sequeira, C., Barbosa, M., Cunha, C., Vaz, A. R., & Brites, D. (2020). Astrocyte regional diversity in ALS includes distinct aberrant phenotypes with common and causal pathological processes. *Experimental Cell Research*, 395(2), 112209. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2020.112209>
- Gomez-Pinilla, F., & Ying, Z. (2010). Differential effects of exercise and dietary docosahexaenoic acid (DHA) on molecular systems associated with control of allostasis in the hypothalamus and hippocampus. *Neuroscience*, 168(1), 130-137. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2010.02.070>
- Gonçalves, C.-A., Concli Leite, M., & Nardin, P. (2008). Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury. *Clinical Biochemistry*, 41(10-11), 755-763. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2008.04.003>
- González-García, I., Contreras, C., Estévez-Salguero, Á., Ruíz-Pino, F., Colsh, B., Pensado, I., Liñares-Pose, L., Rial-Pensado, E., Martínez de Morentin, P. B., Fernø, J., Diéguez, C., Nogueiras, R., Le Stunff, H., Magnan, C., Tena-Sempere, M., & López, M. (2018). Estradiol Regulates Energy Balance by Ameliorating Hypothalamic Ceramide-Induced ER Stress. *Cell Reports*, 25(2), 413-423.e5. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2018.09.038>
- González-García, I., Fernø, J., Diéguez, C., Nogueiras, R., & López, M. (2017). Hypothalamic Lipids: Key Regulators of Whole Body Energy Balance. *Neuroendocrinology*, 104(4), 398-411. <https://doi.org/10.1159/000448432>
- González-García, I., & García-Cáceres, C. (2021). Hypothalamic Astrocytes as a Specialized and Responsive Cell Population in Obesity. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6176), 1-13. <https://doi.org/10.3390/IJMS22126176>
- González-García, I., Gruber, T., & García-Cáceres, C. (2021). Insulin action on astrocytes: From energy homeostasis to behaviour. *Journal of Neuroendocrinology*, 33(e12953), 1-11. <https://doi.org/10.1111/JNE.12953>
- González-García, I., Milbank, E., Martínez-Ordoñez, A., Carlos Diéguez, & López, M., & Contreras, C. (2019). HYPOTHesizing about central combAT against obesity. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 76, 193-211. <https://doi.org/10.1007/s13105-019-00719-y/Published>
- González-García, I., Milbank, E., Diéguez, C., López, M., & Contreras, C. (2019). Glucagon, GLP-1 and Thermogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3445), 1-16. <https://doi.org/10.3390/ijms20143445>
- González-García, I., Tena-Sempere, M., & López, M. (2017). Estradiol regulation of brown adipose tissue thermogenesis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1043, 315-335. https://doi.org/10.1007/978-3-319-70178-3_15/COVER
- Gowans, G. J., Hawley, S. A., Ross, F. A., & Hardie, D. G. (2013). AMP Is a True Physiological Regulator of AMP-Activated Protein Kinase by Both Allosteric Activation and Enhancing Net

Phosphorylation. *Cell Metabolism*, 18(4), 556-566.
<https://doi.org/10.1016/J.CMET.2013.08.019>

- Greenwell, B. J., Trott, A. J., Beytebiere, J. R., Pao, S., Bosley, A., Beach, E., Finegan, P., Hernandez, C., & Menet, J. S. (2019). Rhythmic Food Intake Drives Rhythmic Gene Expression More Potently than the Hepatic Circadian Clock in Mice. *Cell Reports*, 27(3), 649-657.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.03.064>
- Guilding, C., Hughes, A. T., Brown, T. M., Namvar, S., & Piggins, H. D. (2009). A riot of rhythms: neuronal and glial circadian oscillators in the mediobasal hypothalamus. *Molecular Brain*, 2(28), 1-19. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-2-28>
- Habib, N., McCabe, C., Medina, S., Varshavsky, M., Kitsberg, D., Dvir-Szternfeld, R., Green, G., Dionne, D., Nguyen, L., Marshall, J. L., Chen, F., Zhang, F., Kaplan, T., Regev, A., & Schwartz, M. (2020). Disease-associated astrocytes in Alzheimer's disease and aging. *Nature Neuroscience*, 23(6), 701-706. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-0624-8>
- Halassa, M. M., Fellin, T., Takano, H., Dong, J.-H., & Haydon, P. G. (2007). Synaptic Islands Defined by the Territory of a Single Astrocyte. *Journal of Neuroscience*, 27(24), 6473-6477. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1419-07.2007>
- Hansen, A. B., Stayner, L., Hansen, J., & Andersen, Z. J. (2016). Night shift work and incidence of diabetes in the Danish Nurse Cohort. *Occupational and Environmental Medicine*, 73(4), 262-268. <https://doi.org/10.1136/oemed-2015-103342>
- Hara, R., Wan, K., Wakamatsu, H., Aida, R., Moriya, T., Akiyama, M., & Shibata, S. (2001). Restricted feeding entrains liver clock without participation of the suprachiasmatic nucleus. *Genes to Cells*, 6(3), 269-278. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2443.2001.00419.X>
- Hardie, D. G. (2004). The AMP-activated protein kinase pathway – new players upstream and downstream. *Journal of Cell Science*, 117(23), 5479-5487. <https://doi.org/10.1242/jcs.01540>
- Hardie, G. (2013). The LKB1-AMPK Pathway-Friend or Foe in Cancer? *Cancer Cell*, 23(2), 131-132. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.01.009>
- Hardie, G. (2014). AMPK - Sensing energy while talking to other signaling pathways. *Cell Metabolism*, 20(6), 939-952. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2014.09.013>
- Hardie, G., Ross, F. A., & Hawley, S. A. (2012). AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 13(4), 251-262. <https://doi.org/10.1038/NRM3311>
- Hasel, P., Rose, I. V. L., Sadick, J. S., Kim, R. D., & Liddelow, S. A. (2021). Neuroinflammatory astrocyte subtypes in the mouse brain. *Nature Neuroscience*, 24(10), 1475-1487. <https://doi.org/10.1038/s41593-021-00905-6>
- Hastings, M. H., Brancaccio, M., Gonzalez-Aponte, M. F., & Herzog, E. D. (2023). Circadian Rhythms and Astrocytes: The Good, the Bad, and the Ugly. *Annual review of neuroscience*, 46, 123-143. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-NEURO-100322-112249>

- Hastings, M. H., Maywood, E. S., & Brancaccio, M. (2018). Generation of circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus. *Nature reviews. Neuroscience*, *19*(8), 453-469. <https://doi.org/10.1038/S41583-018-0026-Z>
- Hastings, M. H., Maywood, E. S., & Reddy, A. B. (2008). Two decades of circadian time. *Journal of Neuroendocrinology*, *20*(6), 812-819. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2826.2008.01715.X>
- Hatori, M., Vollmers, C., Zarrinpar, A., DiTacchio, L., Bushong, E. A., Gill, S., Leblanc, M., Chaix, A., Joens, M., Fitzpatrick, J. A. J., Ellisman, M. H., & Panda, S. (2012). Time restricted feeding without reducing caloric intake prevents metabolic diseases in mice fed a high fat diet. *Cell metabolism*, *15*(6), 848. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2012.04.019>
- Hawley, S. A., Pan, D. A., Mustard, K. J., Ross, L., Bain, J., Edelman, A. M., Frenguelli, B. G., & Grahame Hardie, D. (2005). Calmodulin-dependent protein kinase kinase- β is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell Metabolism*, *2*, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.05.009>
- Hawley, S. A., Ross, F. A., Chevtzoff, C., Green, K. A., Evans, A., Fogarty, S., Towler, M. C., Brown, L. J., Ogunbayo, O. A., Evans, A. M., & Hardie, D. G. (2010). Use of Cells Expressing γ Subunit Variants to Identify Diverse Mechanisms of AMPK Activation. *Cell Metabolism*, *11*(6), 554-565. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.04.001>
- Hemmer, A., Mareschal, J., Dibner, C., Pralong, J. A., Dorribo, V., Perrig, S., Genton, L., Pichard, C., & Collet, T.-H. (2021). The Effects of Shift Work on Cardio-Metabolic Diseases and Eating Patterns. *Nutrients*, *13*(11), 4178. <https://doi.org/10.3390/nu13114178>
- Hetherington, A. W., & Ranson, S. W. (1983). Nutrition Classics. The Anatomical Record, Volume 78, 1940: Hypothalamic lesions and adiposity in the rat. *Nutrition reviews*, *41*(4), 124-127. <https://doi.org/10.1111/J.1753-4887.1983.TB07169.X>
- 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>
- Himms-Hagen, J. (1989). Role of thermogenesis in the regulation of energy balance in relation to obesity. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, *67*(4).
- Hogenboom, R., Kalsbeek, M. J., Korpel, N. L., de Goede, P., Koenen, M., Buijs, R. M., Romijn, J. A., Swaab, D. F., Kalsbeek, A., & Yi, C. X. (2019). Loss of arginine vasopressin- and vasoactive intestinal polypeptide-containing neurons and glial cells in the suprachiasmatic nucleus of individuals with type 2 diabetes. *Diabetologia*, *62*(11), 2088-2093. <https://doi.org/10.1007/S00125-019-4953-7>
- Holmes, M. M., & Mistlberger, R. E. (2000). Food anticipatory activity and photic entrainment in food-restricted BALB/c mice. *Physiology & Behavior*, *68*(5), 655-666. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(99\)00231-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(99)00231-0)
- Horst, G. T. J. van der, Muijtjens, M., Kobayashi, K., Takano, R., Kanno, S., Takao, M., Wit, J. de, Verkerk, A., Eker, A. P. M., Leenen, D. van, Buijs, R., Bootsma, D., Hoeijmakers, J. H. J., & Yasui, A. (1999). Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature*, *398*(6728), 627-630. <https://doi.org/10.1038/19323>

- Horvath, T. L., Sarman, B., García-Cáceres, C., Enriori, P. J., Sotonyi, P., Shanabrough, M., Borok, E., Argente, J., Chowen, J. A., Perez-Tilve, D., Pfuger, P. T., Brönneke, H. S., Levin, B. E., Diano, S., Cowley, M. A., & Tschöp, M. H. (2010). Synaptic input organization of the melanocortin system predicts diet-induced hypothalamic reactive gliosis and obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(33), 14875-14880. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1004282107>
- Hsueh, H., He, Y., Kastin, A. J., Tu, H., Markadakis, E. N., Rogers, R. C., Fossier, P. B., & Pan, W. (2008). Obesity induces functional astrocytic leptin receptors in hypothalamus. *Brain*, *132*(4), 889-902. <https://doi.org/10.1093/brain/awp029>
- Hughey, C. C., Wasserman, D. H., Lee-Young, R. S., & Lantier, L. (2014). Approach to Assessing Determinants of Glucose Homeostasis in the Conscious Mouse. *Mammalian genome: official journal of the International Mammalian Genome Society*, *25*(0), 522-538. <https://doi.org/10.1007/S00335-014-9533-Z>
- Hui, S. P., Dutta, A., & Ghosh, S. (2010). Cellular response after crush injury in adult zebrafish spinal cord. *Developmental Dynamics*, *239*(11), 2962-2979. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22438>
- Hung, Y. H., & Stelzner, D. J. (1991). Frog tectal efferent axons fail to regenerate within the CNS but grow within peripheral nerve implants. *Experimental Neurology*, *112*(3), 273-283. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(91\)90127-X](https://doi.org/10.1016/0014-4886(91)90127-X)
- Huynh, M. K. Q., Kinyua, A. W., Yang, D. J., & Kim, K. W. (2016). Hypothalamic AMPK as a Regulator of Energy Homeostasis. *Neural Plasticity*, *2016*, 1-12. <https://doi.org/10.1155/2016/2754078>
- Iloff, J. J., Wang, M., Liao, Y., Plogg, B. A., Peng, W., Gundersen, G. A., Benveniste, H., Vates, G. E., Deane, R., Goldman, S. A., Nagelhus, E. A., & Nedergaard, M. (2012). A Paravascular Pathway Facilitates CSF Flow Through the Brain Parenchyma and the Clearance of Interstitial Solutes, Including Amyloid β . *Science Translational Medicine*, *4*(147). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003748>
- Inoki, K., Kim, J., & Guan, K. L. (2012). AMPK and mTOR in cellular energy homeostasis and drug targets. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *52*, 381-400. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-PHARMTOX-010611-134537>
- Izumo, M., Pejchal, M., Schook, A. C., Lange, R. P., Walisser, J. A., Sato, T. R., Wang, X., Bradfield, C. A., & Takahashi, J. S. (2014). Differential effects of light and feeding on circadian organization of peripheral clocks in a forebrain *Bmal1* mutant. *eLife*, *3*, 1-27. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.04617>
- Jäkel, S., & Dimou, L. (2017). Glial Cells and Their Function in the Adult Brain: A Journey through the History of Their Ablation. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *11*(24), 1-17. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00024>
- Jayaram, B., Pan, W., Wang, Y., Hsueh, H., MacE, A., Cornelissen-Guillaume, G. G., Mishra, P. K., Koza, R. A., & Kastin, A. J. (2013). Astrocytic leptin-receptor knockout mice show partial

- rescue of leptin resistance in diet-induced obesity. *Journal of Applied Physiology*, *114*(6), 734-741. <https://doi.org/10.1152/JAPPLPHYSIOL.01499.2012>
- Jespersen, N. Z., Larsen, T. J., Peijs, L., Dugaard, S., Homøe, P., Loft, A., De Jong, J., Mathur, N., Cannon, B., Nedergaard, J., Pedersen, B. K., Møller, K., & Scheele, C. (2013). A classical brown adipose tissue mma signature partly overlaps with brite in the supraclavicular region of adult humans. *Cell Metabolism*, *17*(5), 798-805. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2013.04.011>
- Jones, J. R., Simon, T., Lones, L., & Herzog, E. D. (2018). SCN VIP Neurons Are Essential for Normal Light-Mediated Resetting of the Circadian System. *The Journal of Neuroscience*, *38*(37), 7986-7995. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1322-18.2018>
- Jordan, S. D., & Lamia, K. A. (2013). AMPK at the crossroads of circadian clocks and metabolism. *Molecular and cellular endocrinology*, *366*(2), 163-169. <https://doi.org/10.1016/J.MCE.2012.06.017>
- Kaasik, K., Kivimä, S., Allen, J. J., Chalkley, R. J., Huang, Y., Baer, K., Kissel, H., Burlingame, A. L., Shokat, K. M., Ptá Cek, L. J., & Fu, Y.-H. (2013). Cell Metabolism Glucose Sensor O-GlcNAcylation Coordinates with Phosphorylation to Regulate Circadian Clock. *Cell Metabolism*, *17*(2), 291-302. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.12.017>
- Kálmán, M., Somiya, H., Lazarevic, L., Milosevic, I., Ari, C., & Majorossy, K. (2013). Absence of post-lesion reactive gliosis in elasmobranchs and turtles and its bearing on the evolution of astroglia. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, *320*(6), 351-367. <https://doi.org/10.1002/jez.b.22505>
- Kampe, J., Tschöp, M., Horvath, T. L., & Widmer, P. (2010). Neuroendocrine Integration of Body Weight Regulation. *Endotext*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279040/>
- Kao, L. S., & Green, C. E. (2008). Analysis of Variance: Is There a Difference in Means and What Does It Mean? *Journal of Surgical Research*, *144*(1), 158-170. <https://doi.org/10.1016/J.JSS.2007.02.053>
- Karatsoreos, I. N., Bhagat, S., Bloss, E. B., Morrison, J. H., & McEwen, B. S. (2011). Disruption of circadian clocks has ramifications for metabolism, brain, and behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(4), 1657-1662. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1018375108/-/DCSUPPLEMENTAL>
- Kettner, N. M., Mayo, S. A., Hua, J., Lee, C., Moore, D. D., & Fu, L. (2015). Circadian Dysfunction Induces Leptin Resistance in Mice. *Cell Metabolism*, *22*(3), 448-459. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.06.005>
- Kim, E.-K., Miller, I., Aja, S., Landree, L. E., Pinn, M., McFadden, J., Kuhajda, F. P., Moran, T. H., & Ronnett, G. V. (2004). C75, a Fatty Acid Synthase Inhibitor, Reduces Food Intake via Hypothalamic AMP-activated Protein Kinase. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(19), 19970-19976. <https://doi.org/10.1074/jbc.M402165200>
- Kim, H. K., Youn, B. S., Shin, M. S., Namkoong, C., Park, K. H., Baik, J. H., Kim, J. B., Park, J. Y., Lee, K. U., Kim, Y. B., & Kim, M. S. (2010). Hypothalamic Angptl4/Fiaf Is a Novel

Regulator of Food Intake and Body Weight. *Diabetes*, 59(11), 2772.
<https://doi.org/10.2337/DB10-0145>

- Kim, J., Suyama, S., Koch, M., Jin, S., Argente-Arizon, P., Argente, J., Liu, Z. W., Zimmer, M. R., Jeong, J. K., Szigeti-Buck, K., Gao, Y., Garcia-Caceres, C., Yi, C. X., Salmaso, N., Vaccarino, F. M., Chowen, J., Diano, S., Dietrich, M. O., Tschöp, M. H., & Horvath, T. L. (2014). Leptin signaling in astrocytes regulates hypothalamic neuronal circuits and feeding. *Nature Neuroscience*, 17(7), 908-910. <https://doi.org/10.1038/NN.3725>
- Kim, M. S., Park, J. Y., Namkoong, C., Jang, P. G., Ryu, J. W., Song, H. S., Yun, J. Y., Namgoong, I. S., Ha, J., Park, I. S., Lee, I. K., Viollet, B., Youn, J. H., Lee, H. K., & Lee, K. U. (2004). Anti-obesity effects of α -lipoic acid mediated by suppression of hypothalamic AMP-activated protein kinase. *Nature Medicine*, 10(7), 727-733. <https://doi.org/10.1038/NM1061>
- Kinote, A., Faria, J. A., Roman, E. A., Solon, C., Razolli, D. S., Ignacio-Souza, L. M., Sollon, C. S., Nascimento, L. F., De Araújo, T. M., Paula, A., Barbosa, L., Lellis-Santos, C., Velloso, L. A., Bordin, S., Anhê, G. F., & Medicine, I. (2012). Fructose-Induced Hypothalamic AMPK Activation Stimulates Hepatic PEPCK and Gluconeogenesis due to Increased Corticosterone Levels. *Endocrinology*, 153(8), 3633-3645. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1341>
- Kola, B., Farkas, I., Christ-Crain, M., Wittmann, G., Lolli, F., Amin, F., Harvey-White, J., Liposits, Z., Kunos, G., Grossman, A. B., Fekete, C., & Korbonits, M. (2008). The orexigenic effect of ghrelin is mediated through central activation of the endogenous cannabinoid system. *PLoS ONE*, 3(3), 1-8. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0001797>
- Kolbe, I., Leinweber, B., Brandenburger, M., & Oster, H. (2019). Circadian clock network desynchrony promotes weight gain and alters glucose homeostasis in mice. *Molecular Metabolism*, 30, 140-151. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2019.09.012>
- Kopelman, P. G. (2000). Obesity as a medical problem. *Nature*, 404(6778), 635-643. <https://doi.org/10.1038/35007508>
- Koronowski, K. B., & Sassone-Corsi, P. (2021). Communicating clocks shape circadian homeostasis. *Science*, 371(6530), 1-26. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.ABD0951>
- Kozak, L. P., Britton, J. H., Kozak, U. C., & Wells, J. M. (1988). The mitochondrial uncoupling protein gene. Correlation of exon structure to transmembrane domains. *Journal of Biological Chemistry*, 263(25), 12274-12277. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)37751-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)37751-2)
- Kume, K., Zylka, M. J., Sriram, S., Shearman, L. P., Weaver, D. R., Jin, X., Maywood, E. S., Hastings, M. H., & Reppert, S. M. (1999). mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell*, 98(2), 193-205. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81014-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81014-4)
- Kurrasch, D. M., Cheung, C. C., Lee, F. Y., Tran, P. V., Hata, K., & Ingraham, H. A. (2007). The Neonatal Ventromedial Hypothalamus Transcriptome Reveals Novel Markers with Spatially Distinct Patterning. *The Journal of Neuroscience*, 27(50), 13624-13634. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2858-07.2007>

- Kwon, Y. H., Kim, J., Kim, C. S., Tu, T. H., Kim, M. S., Suk, K., Kim, D. H., Lee, B. J., Choi, H. S., Park, T., Choi, M. S., Goto, T., Kawada, T., Ha, T. Y., & Yu, R. (2017). Hypothalamic lipid-laden astrocytes induce microglia migration and activation. *FEBS letters*, *591*(12), 1742-1751. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12691>
- Lage, R., Dié Guez, C., Vidal-Puig, A., & Ló Pez, M. (2008). AMPK: a metabolic gauge regulating whole-body energy homeostasis. *Trends in Molecular Medicine*, *14*(12), 539-549. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2008.09.007>
- Lamia, K. A., Sachdeva, U. M., Di Tacchio, L., Williams, E. C., Alvarez, J. G., Egan, D. F., Vasquez, D. S., Juguilon, H., Panda, S., Shaw, R. J., Thompson, C. B., & Evans, R. M. (2009). AMPK Regulates the Circadian Clock by Cryptochrome Phosphorylation and Degradation. *Science*, *326*(5951), 437. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1172156>
- Landsberg, L., Young, J. B., Leonard, W. R., Linsenmeier, R. A., & Turek, F. W. (2009). Is obesity associated with lower body temperatures? Core temperature: a forgotten variable in energy balance. *Metabolism: Clinical and Experimental*, *58*(6), 871-876. <https://doi.org/10.1016/J.METABOL.2009.02.017>
- Lang, D. M., Monzon-Mayor, M., del Mar Romero-Aleman, M., Yanes, C., Santos, E., & Pesheva, P. (2008). Tenascin-R and axon growth-promoting molecules are up-regulated in the regenerating visual pathway of the lizard (*Gallotia galloti*). *Developmental Neurobiology*, *68*(7), 899-916. <https://doi.org/10.1002/dneu.20624>
- Le Foll, C., Dunn-Meynell, A. A., Mizioroko, H. M., & Levin, B. E. (2014). Regulation of hypothalamic neuronal sensing and food intake by ketone bodies and fatty acids. *Diabetes*, *63*(4), 1259-1269. <https://doi.org/10.2337/DB13-1090/-/DC1>
- Lee, H. M., Chen, R., Kim, H., Etchegaray, J. P., Weaver, D. R., & Lee, C. (2011). The period of the circadian oscillator is primarily determined by the balance between casein kinase 1 and protein phosphatase 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(39), 16451-16456. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1107178108/-/DCSUPPLEMENTAL/PNAS.201107178SI.PDF>
- Lee, I. T., Chang, A. S., Manandhar, M., Shan, Y., Fan, J., Izumo, M., Ikeda, Y., Motoike, T., Dixon, S., Seinfeld, J. E., Takahashi, J. S., & Yanagisawa, M. (2015). Neuromedin S-Producing Neurons Act as Essential Pacemakers in the Suprachiasmatic Nucleus to Couple Clock Neurons and Dictate Circadian Rhythms. *Neuron*, *85*(5), 1086-1102. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.02.006>
- Lee, P., Bova, R., Schofield, L., Bryant, W., Dieckmann, W., Slattery, A., Govendir, M. A., Emmett, L., & Greenfield, J. R. (2016). Brown Adipose Tissue Exhibits a Glucose-Responsive Thermogenic Biorhythm in Humans. *Cell Metabolism*, *23*, 602-609. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.02.007>
- Lee, Y., Field, J. M., & Sehgal, A. (2021). Circadian Rhythms, Disease and Chronotherapy. *J Biol Rhythms*, *36*(6), 503-531. <https://doi.org/10.1177/07487304211044301>

- Lee, Y., & Kim, E. K. (2013). AMP-activated protein kinase as a key molecular link between metabolism and clockwork. *Experimental & Molecular Medicine* 2013 45:7, 45(7), e33-e33. <https://doi.org/10.1038/emm.2013.65>
- Leloup, C., Arluison, M., Lepetit, N., Cartier, N., Marfaing-Jallat, P., Ferré, P., & Pénicaud, L. (1994). Glucose transporter 2 (GLUT 2): expression in specific brain nuclei. *Brain Research*, 638(1-2), 221-226. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)90653-X](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)90653-X)
- Leloup, C., Orosco, M., Serradas, P., Nicoladis, S., & Pénicaud, L. (1998). Specific inhibition of GLUT2 in arcuate nucleus by antisense oligonucleotides suppresses nervous control of insulin secretion. *Molecular Brain Research*, 57(2), 275-280. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(98\)00097-7](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(98)00097-7)
- Leproult, R., Holmbäck, U., & Van Cauter, E. (2014). Circadian misalignment augments markers of insulin resistance and inflammation, independently of sleep loss. *Diabetes*, 63(6), 1860-1869. <https://doi.org/10.2337/DB13-1546>
- Lesauter, J., & Silver, R. (1998). Output Signals of the Scn. *Chronobiology International*, 15(5), 535-550. <https://doi.org/10.3109/07420529808998706>
- Li, J. M., Ge, C. X., Xu, M. X., Wang, W., Yu, R., Fan, C. Y., & Kong, L. D. (2015). Betaine recovers hypothalamic neural injury by inhibiting astrogliosis and inflammation in fructose-fed rats. *Molecular Nutrition and Food Research*, 59(2), 189-202. <https://doi.org/10.1002/MNFR.201400307>
- Li, M. D., Ruan, H. Bin, Hughes, M. E., Lee, J. S., Singh, J. P., Jones, S. P., Nitabach, M. N., & Yang, X. (2013). O-GlcNAc signaling entrains the circadian clock by inhibiting BMAL1/CLOCK ubiquitination. *Cell metabolism*, 17(2), 303-310. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2012.12.015>
- Li, W., Chen, Z., Ruan, W., Yi, G., Wang, D., & Lu, Z. (2019). A meta-analysis of cohort studies including dose-response relationship between shift work and the risk of diabetes mellitus. *European Journal of Epidemiology*, 34(11), 1013-1024. <https://doi.org/10.1007/s10654-019-00561-y>
- Liddelov, S. A., & Barres, B. A. (2017). Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. *Immunity*, 46(6), 957-967. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.06.006>
- Liddelov, S. A., Guttenplan, K. A., Clarke, L. E., Bennett, F. C., Bohlen, C. J., Schirmer, L., Bennett, M. L., Münch, A. E., Chung, W.-S., Peterson, T. C., Wilton, D. K., Frouin, A., Napier, B. A., Panicker, N., Kumar, M., Buckwalter, M. S., Rowitch, D. H., Dawson, V. L., Dawson, T. M., ... Barres, B. A. (2017). Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*, 541(7638), 481-487. <https://doi.org/10.1038/nature21029>
- Liddelov, S., & Barres, B. (2015). Astrocytes in Health and Disease. *Cell*, 162(5), 1170-1170.e1. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.08.029>

- Lim, Y. C., Hoe, V. C. W., Darius, A., & Bhoo-Pathy, N. (2018). Association between night-shift work, sleep quality and metabolic syndrome. *Occupational and Environmental Medicine*, 75(10), 716-723. <https://doi.org/10.1136/oemed-2018-105104>
- Lin, S. C., & Hardie, D. G. (2018). AMPK: Sensing Glucose as well as Cellular Energy Status. *Cell Metabolism*, 27(2), 299-313. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2017.10.009>
- Liu, Q., Shi, J., Duan, P., Liu, B., Li, T., Wang, C., Li, H., Yang, T., Gan, Y., Wang, X., Cao, S., & Lu, Z. (2018). Is shift work associated with a higher risk of overweight or obesity? A systematic review of observational studies with meta-analysis. *International Journal of Epidemiology*, 47(6), 1956-1971. <https://doi.org/10.1093/ije/dyy079>
- López, M. (2018). Hypothalamic AMPK and energy balance. *European Journal of Clinical Investigation*, 48(9), 1-10. <https://doi.org/10.1111/ECI.12996>
- López, M. (2022). Hypothalamic AMPK as a possible target for energy balance-related diseases. *Trends in Pharmacological Sciences*, 43(7), 546-556. <https://doi.org/10.1016/J.TIPS.2022.04.007>
- López, M., Fernández-Real, J. M., & Tomarev, S. I. (2023). Obesity wars: may the smell be with you. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 324(6), E569-E576. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00040.2023>
- López, M., Lage, R., Saha, A. K., Pé Rez-Tilve, D., Vázquez, M. J., Varela, L., Sangiao-Alvarellos, S., Tovar, S., Raghay, K., Rodríguez-Cuenca, S., Deoliveira, R. M., Castañ, T., Datta, R., Dong, J. Z., Culler, M., Sleeman, M. W., Alvarez, C. V. A., Gallego, R., Lelliott, C. J., ... Vidal-Puig, A. (s. f.). Hypothalamic Fatty Acid Metabolism Mediates the Orexigenic Action of Ghrelin. *Cell Metabolism*. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.03.006>
- López, M., Lelliott, C. J., & Vidal-Puig, A. (2007). Hypothalamic fatty acid metabolism: a housekeeping pathway that regulates food intake. *BioEssays*, 29, 248-261. <https://doi.org/10.1002/bies.20539>
- López, M., Nogueiras, R., Tena-Sempere, M., & Diéguez, C. (2016). Hypothalamic AMPK: a canonical regulator of whole-body energy balance. *Nature Reviews Endocrinology* 2016 12:7, 12(7), 421-432. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.67>
- López, M., Varela, L., Vázquez, M. J., Rodríguez-Cuenca, S., González, C. R., Velagapudi, V. R., Morgan, D. A., Schoenmakers, E., Agassandian, K., Lage, R., De Morentin, P. B. M., Tovar, S., Nogueiras, R., Carling, D., Lelliott, C., Gallego, R., Orešič, M., Chatterjee, K., Saha, A. K., ... Vidal-Puig, A. (2010). Hypothalamic AMPK and fatty acid metabolism mediate thyroid regulation of energy balance. *Nature Medicine*, 16(9), 1001-1008. <https://doi.org/10.1038/NM.2207>
- Luciano, A. K., Zhou, W., Santana, J. M., Kyriakides, C., Velazquez, H., & Sessa, W. C. (2018). CLOCK phosphorylation by AKT regulates its nuclear accumulation and circadian gene expression in peripheral tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 293(23), 9126-9136. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.000773>

- Luengo-Mateos, M., González-Vila, A., Vicente Dragano, N. R., Ohinska, N., Silveira-Loureiro, M., González-Domínguez, M., Estévez-Salguero, Á., Novelle-Rodríguez, P., López, M., & Barca-Mayo, O. (2023). Hypothalamic astrocytic-BMAL1 regulates energy homeostasis in a sex-dependent manner. *Cell Reports*, *42*(8), 112949. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112949>
- Lushnikova, I., Skibo, G., Muller, D., & Nikonenko, I. (2009). Synaptic potentiation induces increased glial coverage of excitatory synapses in CA1 hippocampus. *Hippocampus*, *19*(8), 753-762. <https://doi.org/10.1002/HIPO.20551>
- Ma, Y.-T., Luo, H., Guan, W.-J., Zhang, H., Chen, C., Wang, Z., & Li, J.-D. (2013). O-GlcNAcylation of BMAL1 regulates circadian rhythms in NIH3T3 fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *431*(3), 382-387. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.01.043>
- MacDonald, J. M., Beach, M. G., Porpiglia, E., Sheehan, A. E., Watts, R. J., & Freeman, M. R. (2006). The Drosophila Cell Corpse Engulfment Receptor Draper Mediates Glial Clearance of Severed Axons. *Neuron*, *50*(6), 869-881. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.04.028>
- Macvicar, B. A., & Newman, E. A. (2015). Astrocyte Regulation of Blood Flow in the Brain. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *7*(a020388), 1-14. <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A020388>
- Magistretti, P. J., & Allaman, I. (2018). Lactate in the brain: from metabolic end-product to signalling molecule. *Nature Reviews Neuroscience* *2018 19:4*, *19*(4), 235-249. <https://doi.org/10.1038/nrn.2018.19>
- Majdic, G., Young, M., Gomez-Sanchez, E., Anderson, P., Szczepaniak, L. S., Dobbins, R. L., McGarry, J. D., & Parker, K. L. (2002). Knockout Mice Lacking Steroidogenic Factor 1 Are a Novel Genetic Model of Hypothalamic Obesity. *Endocrinology*, *143*(2), 607-614. <https://doi.org/10.1210/endo.143.2.8652>
- Manoogian, E. N. C., Chaix, A., & Panda, S. (2019). When to Eat: The Importance of Eating Patterns in Health and Disease. *Journal of Biological Rhythms*, *34*(6), 579-581. <https://doi.org/10.1177/0748730419892105>
- Marcheva, B., Ramsey, K. M., Buhr, E. D., Kobayashi, Y., Su, H., Ko, C. H., Ivanova, G., Omura, C., Mo, S., Vitaterna, M. H., Lopez, J. P., Philipson, L. H., Bradfield, C. A., Crosby, S. D., Jebailey, L., Wang, X., Takahashi, J. S., & Bass, J. (2010). Disruption of the clock components CLOCK and BMAL1 leads to hypoinsulinaemia and diabetes. *Nature*, *466*(7306), 627-631. <https://doi.org/10.1038/NATURE09253>
- Martin, T. L., Alquier, T., Asakura, K., Furukawa, N., Preitner, F., & Kahn, B. B. (2006). Diet-induced Obesity Alters AMP Kinase Activity in Hypothalamus and Skeletal Muscle. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(28), 18933-18941. <https://doi.org/10.1074/jbc.M512831200>
- Martínez De Morentin, P. B., González-García, I., Martins, L., Lage, R., Fernández-Mallo, D., Martínez-Sánchez, N., Ruíz-Pino, F., Liu, J., Morgan, D. A., Pinilla, L., Gallego, R., Saha, A. K., Kalsbeek, A., Fliers, E., Bisschop, P. H., Diéguez, C., Nogueiras, R. N., Rahmouni, K.,

- Tena-Sempere, M., & Ló Pez, M. (2014). Estradiol Regulates Brown Adipose Tissue Thermogenesis via Hypothalamic AMPK. *Cell Metabolism*, *20*(1), 41-53. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.03.031>
- Martínez De Morentin, P. B., Whittle, A. J., Fernø, J., Nogueiras, R., Diéguez, C., Vidal-Puig, A., & López, M. (2012). Nicotine induces negative energy balance through hypothalamic AMP-activated protein kinase. *Diabetes*, *61*(4), 807-817. <https://doi.org/10.2337/DB11-1079>
- Martínez-Sánchez, N., Seoane-Collazo, P., Contreras, C., Sabio, G., Villarroya, F., López, M., Varela, L., Villarroya, J., Rial-Pensado, E., Buqué, X., Aurrekoetxea, I., Delgado, T. C., Vázquez-Martínez, R., González-García, I., Roa, J., Whittle, A. J., Gomez-Santos, B., Velagapudi, V., Tung, Y. C. L., ... Martínez De Morentin, P. B. (2017). Hypothalamic AMPK-ER Stress-JNK1 Axis Mediates the Central Actions of Thyroid Hormones on Energy Balance Cell Metabolism. *Cell Metabolism*, *26*(1), 212-229. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.06.014>
- Martins, L., Seoane-Collazo, P., Contreras, C., González-García, I., Martínez-Sánchez, N., González, F., Zalvide, J., Gallego, R., Diéguez, C., Nogueiras, R., Tena-Sempere, M., & López, M. (2016). A Functional Link between AMPK and Orexin Mediates the Effect of BMP8B on Energy Balance. *Cell Reports*, *16*(8), 2231-2242. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2016.07.045>
- Marty, N., Dallaporta, M., Foretz, M., Emery, M., Tarussio, D., Bady, I., Binnert, C., Beermann, F., & Thorens, B. (2005). Regulation of glucagon secretion by glucose transporter type 2 (glut2) and astrocyte-dependent glucose sensors. *The Journal of clinical investigation*, *115*(12), 3545-3553. <https://doi.org/10.1172/JCI26309>
- Matusova, Z., Hol, E. M., Pekny, M., Kubista, M., & Valihrach, L. (2023). Reactive astrogliosis in the era of single-cell transcriptomics. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *17*. <https://doi.org/10.3389/fncel.2023.1173200>
- Maywood, E. S., Chesham, J. E., O'Brien, J. A., & Hastings, M. H. (2011). A diversity of paracrine signals sustains molecular circadian cycling in suprachiasmatic nucleus circuits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(34), 14306-14311. https://doi.org/10.1073/PNAS.1101767108/SUPPL_FILE/SM06.MOV
- Maywood, E. S., Elliott, T. S., Patton, A. P., Krogager, T. P., Chesham, J. E., Ernst, R. J., Beránek, V., Brancaccio, M., Chin, J. W., & Hastings, M. H. (2018). Translational switching of Cry1 protein expression confers reversible control of circadian behavior in arrhythmic Cry-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(52), E12388-E12397. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1811438115/-/DCSUPPLEMENTAL>
- Mazuski, C., Abel, J. H., Chen, S. P., Hermanstynne, T. O., Jones, J. R., Simon, T., Doyle, F. J., & Herzog, E. D. (2018). Entrainment of Circadian Rhythms Depends on Firing Rates and Neuropeptide Release of VIP SCN Neurons. *Neuron*, *99*(3), 555-563.e5. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2018.06.029>

- McClellan, K. M., Parker, K. L., & Tobet, S. (2006). Development of the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *Frontiers in Neuroendocrinology*, *27*, 193-209. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2006.02.002>
- McCrimmon, R. J., Shaw, M., Fan, X., Cheng, H., Ding, Y., Vella, M. C., Zhou, L., McNay, E. C., & Sherwin, R. S. (2008). Key Role for AMP-activated protein kinase in the ventromedial hypothalamus in regulating counterregulatory hormone responses to acute hypoglycemia. *Diabetes*, *57*(2), 444-450. <https://doi.org/10.2337/DB07-0837>
- McDearmon, E. L., Patel, K. N., Ko, C. H., Walisser, J. A., Schook, A. C., Chong, J. L., Wilsbacher, L. D., Song, E. J., Hong, H. K., Bradfield, C. A., & Takahashi, J. S. (2006). Dissecting the functions of the mammalian clock protein BMAL1 by tissue-specific rescue in mice. *Science*, *314*(5803), 1304-1308. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1132430/SUPPL_FILE/MCDEARMON.SOM.PDF
- McFadden, E., Jones, M. E., Schoemaker, M. J., Ashworth, A., & Swerdlow, A. J. (2014). The relationship between obesity and exposure to light at night: cross-sectional analyses of over 100,000 women in the Breakthrough Generations Study. *American journal of epidemiology*, *180*(3), 245-250. <https://doi.org/10.1093/AJE/KWU117>
- McHill, A. W., Melanson, E. L., Higgins, J., Connick, E., Moehlman, T. M., Stothard, E. R., & Wright, K. P. (2014). Impact of circadian misalignment on energy metabolism during simulated nightshift work. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(48), 17302-17307. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1412021111/-/DCSUPPLEMENTAL>
- Mendelsohn, A. R., & Larrick, J. W. (2013). Sleep Facilitates Clearance of Metabolites from the Brain: Glymphatic Function in Aging and Neurodegenerative Diseases. *Rejuvenation Research*, *16*(6), 518-523. <https://doi.org/10.1089/rej.2013.1530>
- Mendoza, J., Pévet, P., Felder-Schmittbuhl, M.-P., Bailly, Y., & Challet, E. (2010). The Cerebellum Harbors a Circadian Oscillator Involved in Food Anticipation. *The Journal of Neuroscience*, *30*(5), 1894-1904. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5855-09.2010>
- Meng, Q.-J., Logunova, L., Maywood, E. S., Gallego, M., Lebiecki, J., Brown, T. M., Slá, M., Semikhodskii, A. S., Glossop, N. R. J., Piggins, H. D., Chesham, J. E., Bechtold, D. A., Yoo, S.-H., Takahashi, J. S., Virshup, D. M., Boot-Handford, R. P., Hastings, M. H., & Loudon, A. S. I. (2008). Setting Clock Speed in Mammals: The CK1 δ Mutation in Mice Accelerates Circadian Pacemakers by Selectively Destabilizing PERIOD Proteins. *Neuron*, *58*, 78-88. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.01.019>
- Mieda, M., Ono, D., Honma, S., & Correspondence, T. S. (2015). Cellular Clocks in AVP Neurons of the SCN Are Critical for Interneuronal Coupling Regulating Circadian Behavior Rhythm. *Neuron*, *85*, 1103-1116. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.02.005>
- Milbank, E., Dragano, N., Vidal-Gómez, X., Rivas-Limeres, V., Garrido-Gil, P., Wertheimer, M., Recoquillon, S., Pata, M. P., Labandeira-Garcia, J. L., Diéguez, C., Nogueiras, R., Martínez, M. C., Andriantsitohaina, R., & López, M. (2023). Small extracellular vesicle targeting of

- hypothalamic AMPK α 1 promotes weight loss in leptin receptor deficient mice. *Metabolism*, 139, 155350. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2022.155350>
- Milbank, E., Dragano, N. R. V., González-García, I., Garcia, M. R., Rivas-Limeres, V., Perdomo, L., Hilaiet, G., Ruiz-Pino, F., Mallegol, P., Morgan, D. A., Iglesias-Rey, R., Contreras, C., Vergori, L., Cuñarro, J., Porteiro, B., Gavaldà-Navarro, A., Oelkrug, R., Vidal, A., Roa, J., ... López, M. (2021). Small extracellular vesicle-mediated targeting of hypothalamic AMPK α 1 corrects obesity through BAT activation. *Nature Metabolism*, 3(10), 1415-1431. <https://doi.org/10.1038/s42255-021-00467-8>
- Minokoshi, Y., Alquier, T., Furukawa, H., Kim, Y. B., Lee, A., Xue, B., Mu, J., Fofelle, F., Ferré, P., Birnbaum, M. J., Stuck, B. J., & Kahn, B. B. (2004). AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature*, 428(6982), 569-574. <https://doi.org/10.1038/NATURE02440>
- Mistberger, R. E. (2020). Food as circadian time cue for appetitive behavior. *F1000Research*, 9(61), 1-12. <https://doi.org/10.12688/F1000RESEARCH.20829.1>
- Mistberger, R. E., & Rusak, B. (2011). Circadian Rhythms in Mammals. En *Principles and Practice of Sleep Medicine* (pp. 363-375). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-6645-3.00032-3>
- Miyamoto, L. (2018). Molecular Pathogenesis of Familial Wolff-Parkinson-White Syndrome. *The Journal of Medical Investigation*, 65(1.2), 1-8. <https://doi.org/10.2152/jmi.65.1>
- Momcilovic, M., Hong, S.-P., & Carlson, M. (2006). Mammalian TAK1 Activates Snf1 Protein Kinase in Yeast and Phosphorylates AMP-activated Protein Kinase in Vitro. *Journal of Biological Chemistry*, 281(35), 25336-25343. <https://doi.org/10.1074/jbc.M604399200>
- Monique, L., & Servière, J. (1993). Circadian fluctuations in GFAP distribution in the Syrian hamster suprachiasmatic nucleus. *Neuroreport*, 4(11), 1243-1246. <https://doi.org/10.1097/00001756-199309000-00008>
- Moore, R. Y., & Eichler, V. B. (1972). Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Research*, 42(1), 201-206. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(72\)90054-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(72)90054-6)
- Moore, R. Y., Klein, D. C., & Reppert, S. M. (1991). *Suprachiasmatic nucleus: the mind's clock*. Oxford University Press.
- Mori, T., Tanaka, K., Buffo, A., Wurst, W., Kühn, R., & Götz, M. (2006). Inducible gene deletion in astroglia and radial glia-A valuable tool for functional and lineage analysis. *Glia*, 54(1), 21-34. <https://doi.org/10.1002/glia.20350>
- Morris, C. J., Purvis, T. E., Mistretta, J., & Scheer, F. A. J. L. (2016). Effects of the Internal Circadian System and Circadian Misalignment on Glucose Tolerance in Chronic Shift Workers. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 101(3), 1066-1074. <https://doi.org/10.1210/JC.2015-3924>

- Morselli, E., Fuente-Martin, E., Finan, B., Kim, M., Frank, A., Garcia-Caceres, C., Navas, C. R., Gordillo, R., Neinast, M., Kalainayakan, S. P., Li, D. L., Gao, Y., Yi, C. X., Hahner, L., Palmer, B. F., Tschöp, M. H., & Clegg, D. J. (2014). Hypothalamic PGC-1 α Protects Against High Fat Diet Exposure by Regulating ER α . *Cell reports*, 9(2), 633-645. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2014.09.025>
- Morton, G. J., & Schwartz, M. W. (2011). Leptin and the central nervous system control of glucose metabolism. *Physiological Reviews*, 91(2), 389-411. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00007.2010/ASSET/IMAGES/LARGE/Z9J0021125740005.JPEG>
- Mota, M. C., De-Souza, D. A., Rossato, L. T., Silva, C. M., Araújo, M. B. J., Tufik, S., De Mello, M. T., & Crispim, C. A. (2013). Dietary patterns, metabolic markers and subjective sleep measures in resident physicians. *Chronobiology International*, 30(8), 1032-1041. <https://doi.org/10.3109/07420528.2013.796966>
- Mukherjee, S., Skrede, S., Milbank, E., Andriantsitohaina, R., López, M., & Fernø, J. (2021). Understanding the Effects of Antipsychotics on Appetite Control. *Frontiers in Nutrition*, 8, 1-17. <https://doi.org/10.3389/FNUT.2021.815456>
- Müller, T. D., Nogueiras, R., Andermann, M. L., Andrews, Z. B., Anker, S. D., Argente, J., Batterham, R. L., Benoit, S. C., Bowers, C. Y., Broglio, F., Casanueva, F. F., D'Alessio, D., Depoortere, I., Geliebter, A., Ghigo, E., Cole, P. A., Cowley, M., Cummings, D. E., Dagher, A., ... Tschöp, M. H. (2015). Ghrelin. *Molecular Metabolism*, 4(6), 437. <https://doi.org/10.1016/J.MOLMET.2015.03.005>
- Murlidharan, G., Crowther, A., Reardon, R. A., Song, J., & Asokan, A. (2016). Glymphatic fluid transport controls paravascular clearance of AAV vectors from the brain. *JCI Insight*, 1(14). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.88034>
- Murphy, K. G., & Bloom, S. R. (2006). Gut hormones and the regulation of energy homeostasis. *Nature*, 444(7121), 854-859. <https://doi.org/10.1038/NATURE05484>
- Murray, M. (1976). Regeneration of retinal axons into the goldfish optic tectum. *The Journal of Comparative Neurology*, 168(2), 175-195. <https://doi.org/10.1002/cne.901680202>
- Nakahata, Y., Kaluzova, M., Grimaldi, B., Sahar, S., Hirayama, J., Chen, D., Guarente, L. P., & Sassone-Corsi, P. (2008). The NAD⁺-dependent deacetylase SIRT1 modulates CLOCK-mediated chromatin remodeling and circadian control. *Cell*, 134(2), 329-340. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2008.07.002>
- Namkoong, C., Min, S. K., Pil, G. J., Sung, M. H., Hye, S. P., Koh, E. H., Woo, J. L., Jong, Y. K., In, S. P., Joong, Y. P., & Ki, U. L. (2005). Enhanced hypothalamic AMP-activated protein kinase activity contributes to hyperphagia in diabetic rats. *Diabetes*, 54(1), 63-68. <https://doi.org/10.2337/DIABETES.54.1.63>
- Namkoong, H., Jang, P. G., Park, I. S., Hong, S. W., Katakami, H., Chun, S., Kim, S. W., Park, J. Y., Lee M S, & Kim, S. C. (2005). Hypothalamic AMP-activated protein kinase mediates

- counter-regulatory responses to hypoglycaemia in rats. *Diabetologia*, 48, 2170-2178. <https://doi.org/10.1007/s00125-005-1913-1>
- Navarrete, M., Perea, G., Maglio, L., Pastor, J., García De Sola, R., & Araque, A. (2013). Astrocyte Calcium Signal and Gliotransmission in Human Brain Tissue. *Cerebral Cortex*, 23(5), 1240-1246. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhs122>
- Nedeltsheva, A. V., Kilkus, J. M., Imperial, J., Kasza, K., Schoeller, D. A., & Penev, P. D. (2009). Sleep curtailment is accompanied by increased intake of calories from snacks. *The American journal of clinical nutrition*, 89(1), 126-133. <https://doi.org/10.3945/AJCN.2008.26574>
- Nedergaard, J., Bengtsson, T., & Cannon, B. (2007). Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 293(2), E444-E452. <https://doi.org/10.1152/AJPENDO.00691.2006>
- Ng, F. S., Tangredi, M. M., & Jackson, F. R. (2011). Glial cells physiologically modulate clock neurons and circadian behavior in a calcium-dependent manner. *Current biology*, 21(8), 625-634. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2011.03.027>
- Nguyen, J., & Wright, K. P. (2009). Influence of weeks of circadian misalignment on leptin levels. *Nature and science of sleep*, 2, 9-18. <https://doi.org/10.2147/NSS.S7624>
- Nicholls, D. G., Bernson, V. S., & Heaton, G. M. (1978). The identification of the component in the inner membrane of brown adipose tissue mitochondria responsible for regulating energy dissipation. *Experientia. Supplementum*, 32, 89-93. https://doi.org/10.1007/978-3-0348-5559-4_9
- Nogueiras, R., López, M., & Diéguez, C. (2010). Regulation of lipid metabolism by energy availability: A role for the central nervous system. *Obesity Reviews*, 11(3), 185-201. <https://doi.org/10.1111/J.1467-789X.2009.00669.X>
- Norenberg, M. D. (1979). Distribution of glutamine synthetase in the rat central nervous system. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 27(3), 756-762. <https://doi.org/10.1177/27.3.39099>
- Obayashi, K., Saeki, K., Iwamoto, J., Okamoto, N., Tomioka, K., Nezu, S., Ikada, Y., & Kurumatani, N. (2013). Exposure to light at night, nocturnal urinary melatonin excretion, and obesity/dyslipidemia in the elderly: a cross-sectional analysis of the HEIJO-KYO study. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 98(1), 337-344. <https://doi.org/10.1210/JC.2012-2874>
- Oberheim, N. A., Wang, X., Goldman, S., & Nedergaard, M. (2006). Astrocytic complexity distinguishes the human brain. *Trends in neurosciences*, 29(10), 547-553. <https://doi.org/10.1016/J.TINS.2006.08.004>
- O'Hara, C. M., Egar, M. W., & Chernoff, E. A. G. (1992). Reorganization of the ependyma during axolotl spinal cord regeneration: Changes in intermediate filament and fibronectin expression. *Developmental Dynamics*, 193(2), 103-115. <https://doi.org/10.1002/aja.1001930202>

- Ohta, H., Yamazaki, S., & McMahon, D. G. (2005). Constant light desynchronizes mammalian clock neurons. *Nature neuroscience*, 8(3), 267-269. <https://doi.org/10.1038/NN1395>
- Olavarrieta Bernardino, S. (2016). *Trastornos de sueño por trabajo a turnos: Correlatos psicosociales y de salud*.
- Ono, D., Honma, K., & Honma, S. (2021). Roles of Neuropeptides, VIP and AVP, in the Mammalian Central Circadian Clock. *Frontiers in Neuroscience*, 15. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.650154>
- Orozco-Solis, R., Aguilar-Arnal, L., Murakami, M., Peruquetti, R., Ramadori, G., Coppari, R., & Sassone-Corsi, P. (2016). The Circadian Clock in the Ventromedial Hypothalamus Controls Cyclic Energy Expenditure. *Cell Metabolism*, 23(3), 467-478. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2016.02.003>
- Orre, M., Kamphuis, W., Osborn, L. M., Jansen, A. H. P., Kooijman, L., Bossers, K., & Hol, E. M. (2014). Isolation of glia from Alzheimer's mice reveals inflammation and dysfunction. *Neurobiology of Aging*, 35(12), 2746-2760. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.06.004>
- Palmer, B. F., & Clegg, D. J. (2015). The sexual dimorphism of obesity. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 402, 113-119. <https://doi.org/10.1016/J.MCE.2014.11.029>
- Palmisano, B. T., Stafford, J. M., & Pendergast, J. S. (2017). High-Fat Feeding Does Not Disrupt Daily Rhythms in Female Mice because of Protection by Ovarian Hormones. *Frontiers in Endocrinology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00044>
- Pan, A., Schernhammer, E. S., Sun, Q., & Hu, F. B. (2011). Rotating Night Shift Work and Risk of Type 2 Diabetes: Two Prospective Cohort Studies in Women. *PLoS Medicine*, 8(12), e1001141. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001141>
- Pan, W., Hsueh, H., He, Y., Sakharkar, A., Cain, C., Yu, C., & Kastin, A. J. (2008). Astrocyte Leptin Receptor (ObR) and Leptin Transport in Adult-Onset Obese Mice. *Endocrinology*, 149(6), 2798-2806. <https://doi.org/10.1210/en.2007-1673>
- Panda, S. (2016). Circadian physiology of metabolism. *Science*, 354(6315), 1008-1015. <https://doi.org/10.1126/science.aah4967>
- Panda, S., Antoch, M. P., Miller, B. H., Su, A. I., Schook, A. B., Straume, M., Schultz, P. G., Kay, S. A., Takahashi, J. S., & Hogenesch, J. B. (2002). Coordinated Transcription of Key Pathways in the Mouse by the Circadian Clock. *Cell*, 109(3), 307-320. <http://expression.gnf.org/circadian>
- Paranjape, S. A., Chan, O., Zhu, W., Horblitt, A. M., Grillo, C. A., Wilson, S., Reagan, L., & Sherwin, R. S. (2011). Chronic reduction of insulin receptors in the ventromedial hypothalamus produces glucose intolerance and islet dysfunction in the absence of weight gain. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 301, 978-983. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00304.2011.-Insulin>

- Parsons, M. J., Brancaccio, M., Sethi, S., Maywood, E. S., Satija, R., Edwards, J. K., Jagannath, A., Couch, Y., Finelli, M. J., Smyllie, N. J., Esapa, C., Butler, R., Barnard, A. R., Chesham, J. E., Saito, S., Joynson, G., Wells, S., Foster, R. G., Oliver, P. L., ... Nolan, P. M. (2015). The Regulatory Factor ZFH3 Modifies Circadian Function in SCN via an AT Motif-Driven Axis. *Cell*, *162*(3), 621. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2015.06.060>
- Parsons, M. P., & Hirasawa, M. (2010). ATP-sensitive potassium channel-mediated lactate effect on orexin neurons: implications for brain energetics during arousal. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, *30*(24), 8061-8070. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5741-09.2010>
- Paschos, G. K., Ibrahim, S., Song, W. L., Kunieda, T., Grant, G., Reyes, T. M., Bradfield, C. A., Vaughan, C. H., Eiden, M., Masoodi, M., Griffin, J. L., Wang, F., Lawson, J. A., & Fitzgerald, G. A. (2012). Obesity in mice with adipocyte-specific deletion of clock component Arntl. *Nature medicine*, *18*(12), 1768-1777. <https://doi.org/10.1038/NM.2979>
- Patel, A. J., Weir, M. D., Hunt, A., Tahourdin, C. S. M., & Thomas, D. G. T. (1985). Distribution of glutamine synthetase and glial fibrillary acidic protein and correlation of glutamine synthetase with glutamate decarboxylase in different regions of the rat central nervous system. *Brain Research*, *331*(1), 1-9. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(85\)90708-5](https://doi.org/10.1016/0006-8993(85)90708-5)
- Patton, A. P., & Hastings, M. H. (2023). The Mammalian Circadian Time-Keeping System. *Journal of Huntington's Disease*, 1-14. <https://doi.org/10.3233/JHD-230571>
- Paxinos, G., & Franklin, K. B. J. (2001). *The mouse brain in stereotaxic coordinates: Vol. Academic Press* (Second edition). Academic Press.
- Pekny, M., Wilhelmsson, U., Tatlisumak, T., & Pekna, M. (2019). Astrocyte activation and reactive gliosis—A new target in stroke? *Neuroscience Letters*, *689*, 45-55. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.07.021>
- Perea, G., & Araque, A. (2005). Glial calcium signaling and neuron-glia communication. *Cell Calcium*, *38*, 375-382. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2005.06.015>
- Perea, G., & Araque, A. (2007). Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science*, *317*(5841), 1083-1086. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1144640>
- Perea, G., Navarrete, M., & Araque, A. (2009). Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends in Neurosciences*, *32*(8), 421-431. <https://doi.org/10.1016/J.TINS.2009.05.001>
- Petrovic, N., Walden, T. B., Shabalina, I. G., Timmons, J. A., Cannon, B., & Nedergaard, J. (2009). Chronic Peroxisome Proliferator-activated Receptor (PPAR) Activation of Epididymally Derived White Adipocyte Cultures Reveals a Population of Thermogenically Competent, UCP1-containing Adipocytes Molecularly Distinct from Classic Brown Adipocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, *285*(10), 7153-7164. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.053942>

- Pezük, P., Mohawk, J. A., Wang, L. A., & Menaker, M. (2012). Glucocorticoids as Entraining Signals for Peripheral Circadian Oscillators. *Endocrinology*, *153*(10), 4775-4783. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1486>
- Pfriege, F. W., & Barres, B. A. (1997). Synaptic Efficacy Enhanced by Glial Cells in Vitro. *Science*, *277*(5332), 1684-1687. <https://doi.org/10.1126/science.277.5332.1684>
- Pot, G. K., Almoosawi, S., & Stephen, A. M. (2016). Meal irregularity and cardiometabolic consequences: results from observational and intervention studies. *The Proceedings of the Nutrition Society*, *75*(4), 475-486.
- Preitner, N., Damiola, F., Luis-Lopez-Molina, Zakany, J., Duboule, D., Albrecht, U., & Schibler, U. (2002). The Orphan Nuclear Receptor REV-ERB α Controls Circadian Transcription within the Positive Limb of the Mammalian Circadian Oscillator. *Cell*, *110*(2), 251-260. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00825-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00825-5)
- Punjabi, N. M., Shahar, E., Redline, S., Gottlieb, D. J., Givelber, R., & Resnick, H. E. (2004). Sleep-disordered breathing, glucose intolerance, and insulin resistance: the Sleep Heart Health Study. *American journal of epidemiology*, *160*(6), 521-530. <https://doi.org/10.1093/AJE/KWH261>
- Qi, J., Gong, J., Zhao, T., Zhao, J., Lam, P., Ye, J., Li, J. Z., Wu, J., Zhou, H. M., & Li, P. (2008). Downregulation of AMP-activated protein kinase by Cidea-mediated ubiquitination and degradation in brown adipose tissue. *EMBO Journal*, *27*(11), 1537-1548. <https://doi.org/10.1038/EMBOJ.2008.92>
- Qian, J., Dalla Man, C., Morris, C. J., Cobelli, C., & Scheer, F. A. J. L. (2018). Differential effects of the circadian system and circadian misalignment on insulin sensitivity and insulin secretion in humans. *Diabetes, obesity & metabolism*, *20*(10), 2481-2485. <https://doi.org/10.1111/DOM.13391>
- Qian, J., Morris, C. J., Caputo, R., Garaulet, M., & Scheer, F. A. J. L. (2019). Ghrelin is Impacted by the Endogenous Circadian System and by Circadian Misalignment in Humans. *International journal of obesity (2005)*, *43*(8), 1644. <https://doi.org/10.1038/S41366-018-0208-9>
- Quiñones, M., Al-Massadi, O., Gallego, R., Fernø, J., Diéguez, C., López, M., & Nogueiras, R. (2015). Hypothalamic CaMKK β mediates glucagon anorectic effect and its diet-induced resistance. *Molecular Metabolism*, *4*(12), 961-970. <https://doi.org/10.1016/J.MOLMET.2015.09.014>
- Rao, M. N., Neylan, T. C., Grunfeld, C., Mulligan, K., Schambelan, M., & Schwarz, J. M. (2015). Subchronic sleep restriction causes tissue-specific insulin resistance. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *100*(4), 1664-1671. <https://doi.org/10.1210/JC.2014-3911>
- Reier, P. J. (1979). Penetration of grafted astrocytic scars by regenerating optic nerve axons in xenopus tadpoles. *Brain Research*, *164*(1-2), 61-68. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(79\)90006-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(79)90006-4)
- Reppert, S. M., & Weaver, D. R. (2002). Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*, *418*, 935-941.

- Reutrakul, S., & Mokhlesi, B. (2017). Obstructive Sleep Apnea and Diabetes: A State of the Art Review. *Chest*, *152*(5), 1070-1086. <https://doi.org/10.1016/J.CHEST.2017.05.009>
- Rial-Pensado, E., Freire-Agulleiro, O., Ríos, M., Guo, D. F., Contreras, C., Seoane-Collazo, P., Tovar, S., Nogueiras, R., Diéguez, C., Rahmouni, K., & López, M. (2022). Obesity induces resistance to central action of BMP8B through a mechanism involving the BBSome. *Molecular Metabolism*, *59*, 1-11. <https://doi.org/10.1016/J.MOLMET.2022.101465>
- Rial-Pensado, E., Rivas-Limeres, V., Grijota-Martínez, C., Rodríguez-Díaz, A., Capelli, V., Barca-Mayo, O., Nogueiras, R., Mittag, J., Diéguez, C., & López, M. (2022). Temperature modulates systemic and central actions of thyroid hormones on BAT thermogenesis. *Frontiers in Physiology*, *13*, 1-12. <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2022.1017381/FULL>
- Riccitelli, S., Boi, F., Lonardoni, D., Giantomasi, L., Barca-Mayo, O., De Pietri Tonelli, D., Bisti, S., Di Marco, S., & Berdondini, L. (2022). Glial Bmal1 role in mammalian retina daily changes. *Scientific Reports*, *12*(1), 21561. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-25783-1>
- Richards, J., & Gumz, M. L. (2012). Advances in understanding the peripheral circadian clocks. *The FASEB Journal*, *26*(9), 3602-3613. <https://doi.org/10.1096/FJ.12-203554>
- Ridet, J. L., Malhotra, S. K., Privat, A., & Gage, F. H. (1997). Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends in Neurosciences*, *20*(12), 570-577. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(97\)01139-9](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(97)01139-9)
- Robles, M. S., Humphrey, S. J., Mann Correspondence, M., & Mann, M. (2017). Phosphorylation Is a Central Mechanism for Circadian Control of Metabolism and Physiology Cell Metabolism Resource Phosphorylation Is a Central Mechanism for Circadian Control of Metabolism and Physiology. *Cell Metabolism*, *25*, 118-127. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.10.004>
- Rollag, M. D., Berson, D. M., & Provencio, I. (2003). Melanopsin, ganglion-cell photoreceptors, and mammalian photoentrainment. *Journal of biological rhythms*, *18*(3), 227-234. <https://doi.org/10.1177/0748730403018003005>
- Rosbash, M. (2009). The Implications of Multiple Circadian Clock Origins. *PLoS Biology*, *7*(3), 0421-0425. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000062>
- Rusnakova, V., Honsa, P., Dzamba, D., Ståhlberg, A., Kubista, M., & Anderova, M. (2013). Heterogeneity of Astrocytes: From Development to Injury – Single Cell Gene Expression. *PLoS ONE*, *8*(8), e69734. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069734>
- Sadick, J. S., O’Dea, M. R., Hasel, P., Dykstra, T., Faustin, A., & Liddelow, S. A. (2022). Astrocytes and oligodendrocytes undergo subtype-specific transcriptional changes in Alzheimer’s disease. *Neuron*, *110*(11), 1788-1805.e10. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.03.008>
- Salminen, A., Kaarniranta, K., & Kauppinen, A. (2016). Age-related changes in AMPK activation: Role for AMPK phosphatases and inhibitory phosphorylation by upstream signaling pathways. *Ageing Research Reviews*, *28*, 15-26. <https://doi.org/10.1016/J.ARR.2016.04.003>

- Salt, I. P., & Hardie, D. G. (2017). AMP-Activated Protein Kinase. *Circulation Research*, *120*(11), 1825-1841. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.309633>
- Saltiel, A. R., & Kahn, C. R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, *414*(6865), 799-806. <https://doi.org/10.1038/414799a>
- Sancar, A., & Van Gelder, R. N. (2021). Clocks, cancer, and chronochemotherapy. *Science*, *371*(6524), 1-7. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.ABB0738>
- Saper, C. B., & Lowell, B. B. (2014). The hypothalamus. *Current biology: CB*, *24*(23), R1111-R1116. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2014.10.023>
- Sato, T. K., Panda, S., Miraglia, L. J., Reyes, T. M., Rudic, R. D., Mcnamara, P., Reppert, Naik, K. A., Fitzgerald, G. A., Kay, S. A., & Hogenesch, J. B. (2004). A Functional Genomics Strategy Reveals Rora as a Component of the Mammalian Circadian Clock. *Neuron*, *43*(4), 527-537. <http://expression.gnf.org/circadian>
- Scheer, F. A. J. L., Hilton, M. F., Mantzoros, C. S., & Shea, S. A. (2009). Adverse metabolic and cardiovascular consequences of circadian misalignment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(17), 4453-4458.
- Schibler, U., & Sassone-Corsi, P. (2002). A Web of Circadian Pacemakers. *Cell*, *111*(7), 919-922. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)01225-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)01225-4)
- Scott, E. M., Carter, A. M., & Grant, P. J. (2008). Association between polymorphisms in the Clock gene, obesity and the metabolic syndrome in man. *International Journal of Obesity*, *32*(4), 658-662. <https://doi.org/10.1038/SJ.IJO.0803778>
- Scott, J. W., Hawley, S. A., Green, K. A., Anis, M., Stewart, G., Scullion, G. A., Norman, D. G., & Hardie, D. G. (2004). CBS domains form energy-sensing modules whose binding of adenosine ligands is disrupted by disease mutations. *Journal of Clinical Investigation*, *113*(2), 274-284. <https://doi.org/10.1172/JCI19874>
- Sen, S., Raingard, H., Dumont, S., Kalsbeek, A., Vuillez, P., & Challet, E. (2017). Ultradian feeding in mice not only affects the peripheral clock in the liver, but also the master clock in the brain. *Chronobiology International*, *34*(1), 17-36. <https://doi.org/10.1080/07420528.2016.1231689>
- Seo, S., Ju, S., Chung, H., Lee, D., & Park, S. (2008). Acute Effects of Glucagon-Like Peptide-1 on Hypothalamic Neuropeptide and AMP Activated Kinase Expression in Fasted Rats. *Endocrine Journal*, *55*(5), 867-874.
- Seoane-Collazo, P., Diéguez, C., Nogueiras, R., Rahmouni, K., Fernández-Real, J. M., & López, M. (2021). Nicotine' actions on energy balance: Friend or foe? *Pharmacology and Therapeutics*, *219*, 1-20. <https://doi.org/10.1016/J.PHARMTHERA.2020.107693>
- Seoane-Collazo, P., Fernø, J., Francisco Gonzalez, Carlos Diéguez, Leis, R., Nogueiras, R., & López, M. (2020). Hypothalamic-autonomic control of energy homeostasis. *Endocrine*, *50*, 276-291. <https://doi.org/10.1007/s12020-015-0658-y>

- Seoane-Collazo, P., Martínez De Morentin, P. B., Fernø, J., Diéguez, C., Nogueiras, R., & López, M. (2014). Nicotine improves obesity and hepatic steatosis and ER stress in diet-induced obese male rats. *Endocrinology*, *155*(5), 1679-1689. <https://doi.org/10.1210/EN.2013-1839>
- Seoane-Collazo, P., Roa, J., Rial-Pensado, E., Liñares-Pose, L., Beiroa, D., Ruíz-Pino, F., López-González, T., Morgan, D. A., Pardavila, J. Á., Sánchez-Tapia, M. J., Martínez-Sánchez, N., Contreras, C., Fidalgo, M., Diéguez, C., Coppari, R., Rahmouni, K., Nogueiras, R., Tena-Sempere, M., & López, M. (2018). SF1-Specific AMPK α 1 Deletion Protects Against Diet-Induced Obesity. *Diabetes*, *67*(11), 2213-2226. <https://doi.org/10.2337/db17-1538>
- Servière, J., & Lavalie, M. (1996). Astrocytes in the mammalian circadian clock: putative roles. En R. M. Buijs, H. J. Romijn, & M. Mirmiran (Eds.), *Hypothalamic Integration of Circadian Rhythms* (Vol. 111, pp. 57-73).
- Shabalina, I. G., Petrovic, N., De Jong, J. M. A., Kalinovich, A. V, Cannon, B., & Nedergaard, J. (2013). UCP1 in Brite/Beige Adipose Tissue Mitochondria Is Functionally Thermogenic. *Cell Reports*, *5*(5), 1196-1203. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.10.044>
- Shan, Z., Ma, H., Xie, M., Yan, P., Guo, Y., Bao, W., Rong, Y., Jackson, C. L., Hu, F. B., & Liu, L. (2015). Sleep duration and risk of type 2 diabetes: a meta-analysis of prospective studies. *Diabetes care*, *38*(3), 529-537. <https://doi.org/10.2337/DC14-2073>
- Sheward, W. J., Maywood, E. S., French, K. L., Horn, J. M., Hastings, M. H., Seck, J. R., Holmes, M. C., & Harmar, A. J. (2007). Entrainment to Feeding but Not to Light: Circadian Phenotype of VPAC2 Receptor-Null Mice. *Journal of Neuroscience*, *27*(16), 4351-4358. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4843-06.2007>
- Shi, S. Q., Ansari, T. S., McGuinness, O. P., Wasserman, D. H., & Johnson, C. H. (2013). Circadian disruption leads to insulin resistance and obesity. *Current biology: CB*, *23*(5), 372-381. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2013.01.048>
- Shigetomi, E., Saito, K., Sano, F., & Koizumi, S. (2019). Aberrant Calcium Signals in Reactive Astrocytes: A Key Process in Neurological Disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(4), 1-18. <https://doi.org/10.3390/ijms20040996>
- Shimizu, H., Arima, H., Watanabe, M., Goto, M., Banno, R., Sato, I., Ozaki, N., Nagasaki, H., & Oiso, Y. (2008). Glucocorticoids Increase Neuropeptide Y and Agouti-Related Peptide Gene Expression via Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase Signaling in the Arcuate Nucleus of Rats. *Endocrinology*, *149*(9), 4544-4553. <https://doi.org/10.1210/en.2008-0229>
- Shimizu, N., Oomura, Y., Plata-Salamán, C. R., & Morimoto, M. (1987). Hyperphagia and obesity in rats with bilateral ibotenic acid-induced lesions of the ventromedial hypothalamic nucleus. *Brain Research*, *416*(1), 153-156. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(87\)91508-3](https://doi.org/10.1016/0006-8993(87)91508-3)
- Shimogawa, Y., Maekawa, F., & Yamanouchi, K. (2014). Unilateral Lesion Increases Oestrogen Receptor α Expression in the Intact Side of the Ventromedial Hypothalamic Nucleus in Ovariectomised Rats. *Journal of Neuroendocrinology*, *26*(4), 258-266. <https://doi.org/10.1111/JNE.12149>

- Sjöstedt, E., Zhong, W., Fagerberg, L., Karlsson, M., Mitsios, N., Adori, C., Oksvold, P., Edfors, F., Limiszewska, A., Hikmet, F., Huang, J., Du, Y., Lin, L., Dong, Z., Yang, L., Liu, X., Jiang, H., Xu, X., Wang, J., ... Mulder, J. (2020). An atlas of the protein-coding genes in the human, pig, and mouse brain. *Science*, *367*(6482). <https://doi.org/10.1126/science.aay5947>
- Skrede, S., Martins, L., Berge, R. K., Steen, V. M., López, M., & Ferno, J. (2014). Olanzapine depot formulation in rat: a step forward in modelling antipsychotic-induced metabolic adverse effects. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, *17*(1), 91-104. <https://doi.org/10.1017/S1461145713000862>
- Sofroniew, M. V. (2020). Astrocyte reactivity: Subtypes, states and functions in CNS innate immunity. *Trends in immunology*, *41*(9), 758-770. <https://doi.org/10.1016/J.IT.2020.07.004>
- Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, *119*(1), 7-35. <https://doi.org/10.1007/S00401-009-0619-8>
- Song, Z., Levin, B. E., McArdle, J. J., Bakhos, N., & Routh, V. H. (2001). Convergence of pre- and postsynaptic influences on glucosensing neurons in the ventromedial hypothalamic nucleus. *Diabetes*, *50*(12), 2673-2681. <https://doi.org/10.2337/DIABETES.50.12.2673>
- Sookoian, S., Gemma, C., Gianotti, T. F., Burgueño, A., Castaño, G., & Pirola, C. J. (2008). Genetic variants of Clock transcription factor are associated with individual susceptibility to obesity. *The American journal of clinical nutrition*, *87*(6), 1606-1615. <https://doi.org/10.1093/AJCN/87.6.1606>
- Spiegel, K., Leproult, R., & Van Cauter, E. (1999). Impact of sleep debt on metabolic and endocrine function. *Lancet (London, England)*, *354*(9188), 1435-1439. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(99\)01376-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(99)01376-8)
- Spiegelman, B. M., & Flier, J. S. (2001). Obesity and the regulation of energy balance. *Cell*, *104*(4), 531-543. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00240-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00240-9)
- Ståhlberg, A., Andersson, D., Aurelius, J., Faiz, M., Pekna, M., Kubista, M., & Pekny, M. (2011). Defining cell populations with single-cell gene expression profiling: correlations and identification of astrocyte subpopulations. *Nucleic Acids Research*, *39*(4), e24-e24. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1182>
- Stamatakis, K. A., & Punjabi, N. M. (2010). Effects of sleep fragmentation on glucose metabolism in normal subjects. *Chest*, *137*(1), 95-101. <https://doi.org/10.1378/CHEST.09-0791>
- Stenvers, D. J., Scheer, F. A. J. L., Schrauwen, P., la Fleur, S. E., & Kalsbeek, A. (2019). Circadian clocks and insulin resistance. *Nature Reviews Endocrinology*, *15*(2), 75-89. <https://doi.org/10.1038/s41574-018-0122-1>
- Stephan, F. K., & Zucker, I. (1972). Circadian Rhythms in Drinking Behavior and Locomotor Activity of Rats Are Eliminated by Hypothalamic Lesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *69*(6), 1583-1586. <https://doi.org/10.1073/PNAS.69.6.1583>
- Stokkan, K. A., Yamazaki, S., Tei, H., Sakaki, Y., & Menaker, M. (2001). Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science*, *291*(5503), 490-

493.
<https://doi.org/10.1126/SCIENCE.291.5503.490/ASSET/4EEEEB4D7-E496-4CC4-98420F9770.JPEG>
- Stoppa, G. R., Cesquini, M., Roman, E. A., Prada, P. O., Torsoni, A. S., Romanatto, T., Saad, M. J., Velloso, L. A., & Torsoni, M. A. (2008). Intracerebroventricular injection of citrate inhibits hypothalamic AMPK and modulates feeding behavior and peripheral insulin signaling. *Journal of Endocrinology*, *198*(1), 157-168. <https://doi.org/10.1677/JOE-07-0428>
- Storch, K. F., Lipan, O., Leykin, I., Viswanathan, N., Davis, F. C., Wong, W. H., & Weitz, C. J. (2002). Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart. *Nature* *2002* *417*:6884, *417*(6884), 78-83. <https://doi.org/10.1038/nature744>
- Stratmann, M., Suter, D. M., Molina, N., Naef, F., & Schibler, U. (2012). Circadian Dbp Transcription Relies on Highly Dynamic BMAL1-CLOCK Interaction with E Boxes and Requires the Proteasome. *Molecular Cell*, *48*(2), 277-287. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.08.012>
- Su, Y., Foppen, E., Zhang, Z., Fliers, E., & Kalsbeek, A. (2016). Effects of 6-meals-a-day feeding and 6-meals-a-day feeding combined with adrenalectomy on daily gene expression rhythms in rat epididymal white adipose tissue. *Genes to Cells*, *21*(1), 6-24. <https://doi.org/10.1111/gtc.12315>
- Suh, J., & Jackson, F. R. (2007). Drosophila ebony activity is required in glia for the circadian regulation of locomotor activity. *Neuron*, *55*(3), 435-447. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2007.06.038>
- Sul, J. Y., Orosz, G., Givens, R. S., Haydon, P. G., & Haydon, P. G. (2004). Astrocytic Connectivity in the Hippocampus. *Neuron glia biology*, *1*(1), 3-11. <https://doi.org/10.1017/S1740925X04000031>
- Sun, M., Feng, W., Wang, F., Li, P., Li, Z., Li, M., Tse, G., Vlaanderen, J., Vermeulen, R., & Tse, L. A. (2018). Meta-analysis on shift work and risks of specific obesity types. *Obesity Reviews*, *19*(1), 28-40. <https://doi.org/10.1111/obr.12621>
- Świątkiewicz, I., Woźniak, A., & Taub, P. R. (2021). Time-Restricted Eating and Metabolic Syndrome: Current Status and Future Perspectives. *Nutrients* *2021*, Vol. 13, Page 221, *13*(221), 1-24. <https://doi.org/10.3390/NU13010221>
- Szewczyk-Golec, K., Woźniak, A., & Reiter, R. J. (2015). Inter-relationships of the chronobiotic, melatonin, with leptin and adiponectin: Implications for obesity. *Journal of Pineal Research*, *59*(3), 277-291. <https://doi.org/10.1111/JPL.12257>
- Takahashi, J. (2017). Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock. *Nature reviews. Genetics*, *18*(3), 164-179. <https://doi.org/10.1038/NRG.2016.150>
- Takahashi, Y., Okamura, H., Yanaihara, N., Hamada, S., Fujita, S., & Ibata, Y. (1989). Vasoactive intestinal peptide immunoreactive neurons in the rat suprachiasmatic nucleus demonstrate diurnal variation. *Brain research*, *497*(2), 374-377. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(89\)90283-7](https://doi.org/10.1016/0006-8993(89)90283-7)

- Tanida, M., Yamamoto, N., Morgan, D. A., Kurata, Y., Shibamoto, T., & Rahmouni, K. (2015). Leptin Receptor Signaling in the Hypothalamus Regulates Hepatic Autonomic Nerve Activity via Phosphatidylinositol 3-Kinase and AMP-Activated Protein Kinase. *The Journal of Neuroscience*, 35(2), 474-484. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1828-14.2015>
- Tanida, M., Yamamoto, N., Shibamoto, T., & Rahmouni, K. (2013). Involvement of Hypothalamic AMP-Activated Protein Kinase in Leptin-Induced Sympathetic Nerve Activation. *PLoS ONE*, 8(2), 1-11. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0056660>
- Taoka, T., Jost, G., Frenzel, T., Naganawa, S., & Pietsch, H. (2018). Impact of the Glymphatic System on the Kinetic and Distribution of Gadodiamide in the Rat Brain. *Investigative Radiology*, 53(9), 529-534. <https://doi.org/10.1097/RLI.0000000000000473>
- Tasker, J. G., Oliet, S. H. R., Bainsà, J. S., Brown, C. H., & Stern, J. E. (2012). Glial Regulation of Neuronal Function: From Synapse to Systems Physiology. *Journal of Neuroendocrinology*, 24(4), 566-576. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2011.02259.x>
- Thaler, J. P., Yi, C. X., Schur, E. A., Guyenet, S. J., Hwang, B. H., Dietrich, M. O., Zhao, X., Sarruf, D. A., Izgur, V., Maravilla, K. R., Nguyen, H. T., Fischer, J. D., Matsen, M. E., Wisse, B. E., Morton, G. J., Horvath, T. L., Baskin, D. G., Tschöp, M. H., & Schwartz, M. W. (2012). Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(1), 153-162. <https://doi.org/10.1172/JCI59660>
- Tian, G.-F., Takano, T., H-C Lin, J., Wang, X., Bekar, L., & Nedergaard, M. (2006). Imaging of cortical astrocytes using 2-photon laser scanning microscopy in the intact mouse brain. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58(7), 773-787. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2006.07.001>
- Tso, C. F., Simon, T., Greenlaw, A. C., Puri, T., Mieda, M., & Herzog Correspondence, E. D. (2017). Astrocytes Regulate Daily Rhythms in the Suprachiasmatic Nucleus and Behavior. *Current Biology*, 27(7), 1055-1061. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.02.037>
- Turek, F. W., Joshu, C., Kohsaka, A., Lin, E., Ivanova, G., McDearmon, E., Laposky, A., Losee-Olson, S., Easton, A., Jensen, D. R., Eckel, R. H., Takahashi, J. S., & Bass, J. (2005). Obesity and Metabolic Syndrome in Circadian Clock Mutant Mice. *Science*, 308(5724), 1043-1045. <https://doi.org/10.1126/science.1108750>
- Ulgherait, M., Midoun, A. M., Park, S. J., Gatto, J. A., Tener, S. J., Siewert, J., Klickstein, N., Canman, J. C., Ja, W. W., & Shirasu-Hiza, M. (2021). Circadian autophagy drives iTRF-mediated longevity. *Nature*, 598(7880), 353-358. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03934-0>
- Um, J., Yang, S., Yamazaki, S., Kang, H., Viollet, B., Foretz, M., & Chung, J. H. (2007). Activation of 5'-AMP-activated kinase with diabetes drug metformin induces casein kinase Iε (CKIε)-dependent degradation of clock protein mPer2. *Journal of Biological Chemistry*, 282(29), 20794-20798. <https://doi.org/10.1074/JBC.C700070200>
- Um, J. H., Pendergast, J. S., Springer, D. A., Foretz, M., Viollet, B., Brown, A., Kim, M. K., Yamazaki, S., & Chung, J. H. (2011). AMPK Regulates Circadian Rhythms in a Tissue-and Isoform-Specific Manner. *PLoS One*, 6(3), 1-10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018450>

- Valdearcos, M., Robblee, M. M., Benjamin, D. I., Nomura, D. K., Xu, A. W., & Koliwad, S. K. (2014). Microglia Dictate the Impact of Saturated Fat Consumption on Hypothalamic Inflammation and Neuronal Function. *Cell reports*, 9(6), 2124-2138. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2014.11.018>
- Valdebenito, R., Ruminot, I., Garrido-Gerter, P., Fernández-Moncada, I., Forero-Quintero, L., Alegría, K., Becker, H. M., Deitmer, J. W., & Barros, L. F. (2016). Targeting of astrocytic glucose metabolism by beta-hydroxybutyrate. *Journal of cerebral blood flow and metabolism*, 36(10), 1813-1822. <https://doi.org/10.1177/0271678X15613955>
- Varela, L., Kim, J. G., Fernández-Tussy, P., Aryal, B., Liu, Z. W., Fernández-Hernando, C., & Horvath, T. L. (2021). Astrocytic lipid metabolism determines susceptibility to diet-induced obesity. *Science Advances*, 7(50), 1-12. https://doi.org/10.1126/SCIADV.ABJ2814/SUPPL_FILE/SCIADV.ABJ2814_SM.PDF
- Verkhatsky, A., Ho, M. S., Zorec, R., Parpura, V., & Verkhatsky, A. (2019). The Concept of Neuroglia HHS Public Access. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1175, 1-13. https://doi.org/10.1007/978-981-13-9913-8_1
- Verkhatsky, A., & Nedergaard, M. (2018). Physiology of astroglia. *Physiological Reviews*, 98(1), 239-389. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00042.2016>
- Versteeg, R. I., Stenvers, D. J., Visintainer, D., Linnenbank, A., Tanck, M. W., Zwanenburg, G., Smilde, A. K., Fliers, E., Kalsbeek, A., Serlie, M. J., La Fleur, S. E., & Bisschop, P. H. (2017). Acute Effects of Morning Light on Plasma Glucose and Triglycerides in Healthy Men and Men with Type 2 Diabetes. *Journal of biological rhythms*, 32(2), 130-142. <https://doi.org/10.1177/0748730417693480>
- Vetter, C., Dashti, H. S., Lane, J. M., Anderson, S. G., Schernhammer, E. S., Rutter, M. K., Saxena, R., & Scheer, F. A. J. L. (2018). Night Shift Work, Genetic Risk, and Type 2 Diabetes in the UK Biobank. *Diabetes care*, 41(4), 762-769. <https://doi.org/10.2337/DC17-1933>
- Vieira, E., Nilsson, E. C., Nerstedt, A., Ormestad, M., Long, Y. C., Garcia-Roves, P. M., Zierath, J. R., & Mahlapuu, M. (2008). Relationship between AMPK and the transcriptional balance of clock-related genes in skeletal muscle. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 295(5), E1032-E1037. <https://doi.org/10.1152/AJPENDO.90510.2008>
- Vielhaber, E., Eide, E., Rivers, A., Gao, Z.-H., & Virshup, D. M. (2000). Nuclear entry of the circadian regulator mPER1 is controlled by mammalian casein kinase I epsilon. *Molecular and cellular biology*, 20(13), 4888-4899. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.13.4888-4899.2000>
- Villarroya, F., & Vidal-Puig, A. (2013). Beyond the Sympathetic Tone: The New Brown Fat Activators. *Cell Metabolism*, 17(5), 638-643. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2013.02.020>
- Wada, N., Hirako, S., Takenoya, F., Kageyama, H., Okabe, M., & Shioda, S. (2014). Leptin and its receptors. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 61, 191-199. <https://doi.org/10.1016/J.JCHEMNEU.2014.09.002>

- Wang, Y., Sonobe, J. S., Cheng, Y., & Horiuchi, Y. (2014). Interleukin-1b Induces Blood-Brain Barrier Disruption by Downregulating Sonic Hedgehog in Astrocytes. *PLoS ONE*, 9(10), 1-8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110024>
- Wefers, J., Van Moorsel, D., Hansen, J., Connell, N. J., Havekes, B., Hoeks, J., Van Marken Lichtenbelt, W. D., Duez, H., Phielix, E., Kalsbeek, A., Boekschoten, M. V., Hooiveld, G. J., Hesselink, M. K. C., Kersten, S., Staels, B., Scheer, F. A. J. L., & Schrauwen, P. (2018). Circadian misalignment induces fatty acid metabolism gene profiles and compromises insulin sensitivity in human skeletal muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(30), 7789-7794. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1722295115>
- Wen, S., Ma, D., Zhao, M., Xie, L., Wu, Q., Gou, L., Zhu, C., Fan, Y., Wang, H., & Yan, J. (2020). Spatiotemporal single-cell analysis of gene expression in the mouse suprachiasmatic nucleus. *Nature Neuroscience*, 23(3), 456-467. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-0586-x>
- Wheeler, M. A., Clark, I. C., Tjon, E. C., Li, Z., Zandee, S. E. J., Couturier, C. P., Watson, B. R., Scalisi, G., Alkwai, S., Rothhammer, V., Rotem, A., Heyman, J. A., Thaploo, S., Sanmarco, L. M., Ragoussis, J., Weitz, D. A., Petrecca, K., Moffitt, J. R., Becher, B., ... Quintana, F. J. (2020). MAFG-driven astrocytes promote CNS inflammation. *Nature*, 578(7796), 593-599. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-1999-0>
- Whittle, A. J., Carobbio, S., Martins, L., Slawik, M., Hondares, E., Vázquez, M. J., Morgan, D., Csikasz, R. I., Gallego, R., Rodriguez-Cuenca, S., Dale, M., Virtue, S., Villarroya, F., Cannon, B., Rahmouni, K., López, M., & Vidal-Puig, A. (2012). BMP8B increases brown adipose tissue thermogenesis through both central and peripheral actions. *Cell*, 149(4), 871-885. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2012.02.066>
- Wilkinson, M. J., Manoogian, E. N. C., Zadourian, A., Lo, H., Fakhouri, S., Shoghi, A., Wang, X., Fleischer, J. G., Navlakha, S., Panda, S., & Taub, P. R. (2020). Ten-Hour Time-Restricted Eating Reduces Weight, Blood Pressure, and Atherogenic Lipids in Patients with Metabolic Syndrome. *Cell Metabolism*, 31(1), 92-104.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.11.004>
- Williams, G., Bing, C., Cai, X. J., Harrold, J. A., King, P. J., & Liu, X. H. (2001). The hypothalamus and the control of energy homeostasis: Different circuits, different purposes. *Physiology and Behavior*, 74(4-5), 683-701. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(01\)00612-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(01)00612-6)
- Williams, L. M. (2000). Hypothalamic dysfunction in obesity. *Proceedings of the Nutrition Society*, 71, 521-533. <https://doi.org/10.1017/S002966511200078X>
- Woods, A., Dickerson, K., Heath, R., Hong, S.-P., Momcilovic, M., Johnstone, S. R., Carlson, M., & Carling, D. (2005). Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase-β acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell Metabolism*, 2(1), 21-33. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.06.005>
- Woods, A., Johnstone, S. R., Dickerson, K., Leiper, F. C., Fryer, L. G. D., Neumann, D., Schlattner, U., Wallimann, T., Carlson, M., & Carling, D. (2003). LKB1 Is the Upstream Kinase in the AMP-Activated Protein Kinase Cascade. *Current Biology*, 13(22), 2004-2008. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2003.10.031>

- Woon, P. Y., Kaisaki, P. J., Bragança, J., Bihoreau, M. T., Levy, J. C., Farrall, M., & Gauguier, D. (2007). Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like (BMAL1) is associated with susceptibility to hypertension and type 2 diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(36), 14412-14417. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0703247104>
- Xiao, B., Heath, R., Saiu, P., Leiper, F. C., Leone, P., Jing, C., Walker, P. A., Haire, L., Eccleston, J. F., Davis, C. T., Martin, S. R., Carling, D., & Gamblin, S. J. (2007). Structural basis for AMP binding to mammalian AMP-activated protein kinase. *Nature*, *449*(7161), 496-500. <https://doi.org/10.1038/nature06161>
- Xiao, B., Sanders, M. J., Carmena, D., Bright, N. J., Haire, L. F., Underwood, E., Patel, B. R., Heath, R. B., Walker, P. A., Hallen, S., Giordanetto, F., Martin, S. R., Carling, D., & Gamblin, S. J. (2013). Structural basis of AMPK regulation by small molecule activators. *Nature Communications*, *4*, 1-10. <https://doi.org/10.1038/ncomms4017>
- Xiao, B., Sanders, M. J., Underwood, E., Heath, R., Mayer, F. V., Carmena, D., Jing, C., Walker, P. A., Eccleston, J. F., Haire, L. F., Saiu, P., Howell, S. A., Aasland, R., Martin, S. R., Carling, D., & Gamblin, S. J. (2011). Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP. *Nature*, *472*(7342), 230-233. <https://doi.org/10.1038/NATURE09932>
- Xie, Y., Tang, Q., Chen, G., Xie, M., Yu, S., Zhao, J., & Chen, L. (2019). New Insights Into the Circadian Rhythm and Its Related Diseases. *Frontiers in Physiology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00682>
- Xue, B., Pulinilkunnil, T., Murano, I., Bence, K. K., He, H., Minokoshi, Y., Asakura, K., Lee, A., Haj, F., Furukawa, N., Catalano, K. J., Delibegovic, M., Balschi, J. A., Cinti, S., Neel, B. G., & Kahn, B. B. (2009). Neuronal Protein Tyrosine Phosphatase 1B Deficiency Results in Inhibition of Hypothalamic AMPK and Isoform-Specific Activation of AMPK in Peripheral Tissues. *Molecular and Cellular Biology*, *29*(16), 4563-4573. <https://doi.org/10.1128/MCB.01914-08>
- Yang, C. S., Lam, C. K. L., Chari, M., Cheung, G. W. C., Kokorovic, A., Gao, S., Leclerc, I., Rutter, G. A., & Lam, T. K. T. (2010). Hypothalamic AMP-Activated Protein Kinase Regulates Glucose Production. *Diabetes*, *59*(10), 2435-2443. <https://doi.org/10.2337/DB10-0221>
- Yang, L., Qi, Y., & Correspondence, Y. Y. (2015). Astrocytes Control Food Intake by Inhibiting AGRP Neuron Activity via Adenosine A 1 Receptors. *Cell Reports*, *11*, 798-807. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.04.002>
- Yavari, A., Stocker, C. J., Cawthorne, M. A., Watkins, H., & Ashrafian, H. (2016). Chronic Activation of γ 2 AMPK Induces Obesity and Reduces β Cell Function. *Cell Metabolism*, *23*, 821-836. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.04.003>
- Yoo, S.-H., Yamazaki, S., Lowrey, P. L., Shimomura, K., Ko, C. H., Buhr, E. D., Siepka, S. M., Hong, H. K., Oh, W. J., Yoo, O. J., Menaker, M., & Takahashi, J. S. (2004). PERIOD2:LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent

- circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(15), 5339-5346. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308709101>
- Yu, E. A., & Weaver, D. R. (2011). Disrupting the circadian clock: Gene-specific effects on aging, cancer, and other phenotypes. *Aging*, 3(5), 479-493. <https://doi.org/10.18632/aging.100323>
- Zador, Z., Stiver, S., Wang, V., & Manley, G. T. (2009). Role of Aquaporin-4 in Cerebral Edema and Stroke. En *Aquaporins* (pp. 159-170). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-79885-9_7
- Zamanian, J. L., Xu, L., Foo, L. C., Nouri, N., Zhou, L., Giffard, R. G., & Barres, B. A. (2012). Genomic Analysis of Reactive Astroglia. *The Journal of Neuroscience*, 32(18), 6391-6410. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6221-11.2012>
- Zhang, C.-S., Hawley, S. A., Zong, Y., Li, M., Wang, Z., Gray, A., Ma, T., Cui, J., Feng, J.-W., Zhu, M., Wu, Y.-Q., Li, T. Y., Ye, Z., Lin, S.-Y., Yin, H., Piao, H.-L., Hardie, D. G., & Lin, S.-C. (2017). Fructose-1,6-bisphosphate and aldolase mediate glucose sensing by AMPK. *Nature*, 548(7665), 112-116. <https://doi.org/10.1038/nature23275>
- Zhao, L., & Burt, A. D. (2007). The diffuse stellate cell system. *Journal of Molecular Histology*, 38(1), 53-64. <https://doi.org/10.1007/s10735-007-9078-5>
- Zhou, B., Zuo, Y. X., & Jiang, R. T. (2019). Astrocyte morphology: Diversity, plasticity, and role in neurological diseases. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 25(6), 665-673. <https://doi.org/10.1111/CNS.13123>
- Zimmet, P., Alberti, K. G. M. M., Stern, N., Bilu, C., El-Osta, A., Einat, H., & Kronfeld-Schor, N. (2019). The Circadian Syndrome: is the Metabolic Syndrome and much more! *Journal of Internal Medicine*, 286(2), 181-191. <https://doi.org/10.1111/JOIM.12924>

ANEXOS

RESOLUCIÓN DE AUTORIZACIÓN DE PROXECTO DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

Expediente núm.: 15012/2020/010

Data de inicio do expediente: 26.10.2020

Persoa solicitante: Anxo Vidal Figueroa

Procedemento: resolución de autorización

Forma de inicio: solicitude da persoa interesada

ANTECEDENTES

Anxo Vidal Figueroa, en representación do Centro de Biomedicina Experimental (CEBEGA), presentou con data 26.10.2020 unha solicitude para a realización do proxecto de experimentación animal (entrada no Rexistro Electrónico da Xunta de Galicia 2020/2052958), cuxos datos se detallan a continuación:

Denominación do proxecto: *Mecanismos neuroendocrinos de regulación do balance enerxético*

Nome do centro usuario: Centro de Biomedicina Experimental (CEBEGA) da Universidade de Santiago de Compostela

Persoa responsable do proxecto: Miguel Anotnio López Pérez

Establecemento onde se realizarán os procedementos do proxecto (ou lugar xeográfico no caso de traballos de campo): Centro de Biomedicina Experimental (CEBEGA)

Clasificación do proxecto : Tipo I Tipo II Tipo III

CONSIDERACIÓNS LEGAIS E TÉCNICAS

1 O Real decreto 53/2013, de 1 de febreiro (BOE 34, do 8 de febreiro), polo que se establecen as normas básicas aplicables para a protección dos animais utilizados en experimentación e outros fins científicos, incluíndo a docencia, establece no seu artigo 33 as condicións de autorizacións dos proxectos con animais de experimentación.

2 O artigo 88 da Lei 39/2015, de 1 de outubro, do procedemento administrativo común das administracións públicas (BOE 236, do 2 de outubro de 2015) establece que a resolución que poña fin o procedemento decidirá todas as cuestións expostas polos interesados e aquelas outras derivadas deste.

CVE: atbF-uqgLDQ
Verificación: <https://sede.xunta.gal/ore>



UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA



3 O Servizo de Gandaría da Coruña revisou a documentación achegada na solicitude e o resultado favorable da avaliación do proxecto realizada polo órgano habilitado, a Sección de Experimentación Animal do Comité de Bioética da Universidade de Santiago de Compostela.

Esta xefatura territorial é competente para ditar unha resolución, de conformidade co Decreto 149/2018, do 5 de decembro, polo que se establece a estrutura orgánica da Consellería do Medio Rural e se modifica parcialmente o Decreto 177/2016, do 15 de decembro, polo que se fixa a estrutura orgánica da Vicepresidencia e das consellerías da Xunta de Galicia (DOG 235, do 11 de novembro).

De acordo con todo o indicado, RESOLVO:

- 1 Autorizar o proxecto solicitado.
- 2 O proxecto precisa someterse a unha avaliación retrospectiva cando este finalice.
- 3 A autorización deste proxecto terá unha duración de cinco anos e unha vez transcorrido este tempo deberá ser renovada.

A citada autorización é unicamente válida nas condicións que figuran no expediente. Ante calquera cambio significativo no proxecto que poida ter efectos negativos sobre o benestar dos animais, deberá solicitar a confirmación da autorización ao Servizo Provincial de Gandaría.

Esta autorización poderá ser suspendida no caso de que o proxecto non se leve a cabo de acordo coas condicións de autorización e retirada, previo expediente tramitado ao que se lle dará audiencia.

Contra a presente resolución, que non pon fin á vía administrativa, poderá interpoñer un recurso de alzada ante o conselleiro de Medio Rural. O prazo comezará a contar dende o día seguinte ao da recepción desta resolución. Todo isto, segundo o disposto nos artigos 121 e 122 da citada Lei 39/2015.

Mediante este escrito notifícaselle a Anxo Vidal Figueroa esta resolución segundo o esixido no artigo 40.1 da antedita Lei 39/2015.





Certificado de capacitación en materia de protección de animais utilizados, criados ou subministrados con fins de experimentación e outros fins científicos, incluíndo a docencia conforme coa Orde ECC/566/2015 de 20 de marzo.

Certificado de capacitación en materia de protección de animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia conforme con la Orden ECC/566/2015 de 20 de marzo.

1. IDENTIFICACIÓN		
1.1. Apelidos / Apellidos / Surname: SILVEIRA LOUREIRO		
1.2. Nome / Nombre / First names: MARIA		DNI / IDNI / Identity card number: 35608375M
1.3. Categoría / Categoría / Category: “b”	1.4. Especies / Especies / Species: ROEDORES	1.5. Válido ata / válido hasta / expires: 16/04/2027
2. Nº DO CERTIFICADO / Nº DEL CERTIFICADO / CERTIFICATE NUMBER		
b385		
3. ORGANISMO QUE EXPIDE O CERTIFICADO / ORGANISMO QUE EXPIDE EL CERTIFICADO / BODY ISSUING THE CERTIFICATE:		
3.1. Nome e enderezo do organismo que expide o certificado / Nombre y dirección del organismo que expide el certificado / Name and address of the body issuing the certificate: CONSELLERÍA DO MEDIO RURAL – XUNTA DE GALICIA AXENCIA GALEGA DA CALIDADE ALIMENTARIA Avda. Do Camiño Francés, 10 baixo 15781 Santiago de Compostela A Coruña (España)		
3.2. Teléfono / Teléfono / Telephone: 981 546 654	3.3. FAX / Fax / Fax: 981 546 651	3.4. Correo electrónico / Correo electrónico / Email: formacion.cmrm@xunta.es
3.5. Data / Fecha / Date: 10/05/2019	3.6. Lugar / Lugar / Place: Santiago de Compostela	
3.7. Nome e sinatura / Nombre y firma / Name and signature		
  Asdo. Manuel Rodríguez Vázquez Director da Axencia Galega da Calidade Alimentaria		



MÓDULOS FUNDAMENTAIS OU TRONCAIS E ESPECÍFICOS CORRESPONDENTES Á CATEGORÍA "B" EUTANASIA DOS ANIMAIS – ORDE ECC/566/2015, DE 20 DE MARZO

MÓDULOS FUNDAMENTAIS OU TRONCAIS

- 1.- *Lexislación nacional (1 hora).*
- 2.- *Ética, benestar animal e as "tres erres", nivel 1 (2 horas).*
- 3.- *Bioloxía básica e adecuada, nivel 1 (3 horas).*
- 4.- *Coidado, saúde e manexo dos animais, nivel 1 (5 horas).*
- 5.- *Recoñecemento do dolor, o sufrimento e a angustia (3 horas).*
- 6.- *Métodos incruentos de sacrificio, nivel 1 (2 horas)*

MÓDULOS ESPECÍFICOS DA CATEGORÍA "B"

- 1.- *Bioloxía básica e adecuada, nivel 2 (3 horas)*
- 2.- *Métodos incruentos de sacrificio, nivel 2 (3 horas)*

MÓDULOS FUNDAMENTALES O TRONCALES

- 1.- *Legislación nacional (1 hora).*
- 2.- *Ética, bienestar animal y las "tres erres", nivel 1 (2 horas).*
- 3.- *Biología básica y adecuada, nivel 1 (3 horas).*
- 4.- *Cuidado, salud y manejo de los animales, nivel 1 (5 horas).*
- 5.- *Reconocimiento del dolor, el sufrimiento y la angustia (3 horas).*
- 6.- *Métodos incruentos de sacrificio, nivel 1 (2 horas)*

MÓDULOS ESPECÍFICOS DE LA CATEGORÍA "B"

- 1.- *Biología básica y adecuada, nivel 2 (3 horas)*
- 2.- *Métodos incruentos de sacrificio, nivel 2 (3 horas)*



Certificado de capacitación en materia de protección de animais utilizados, criados ou subministrados con fins de experimentación e outros fins científicos, incluíndo a docencia conforme coa Orde ECC/566/2015 de 20 de marzo.

Certificado de capacitación en materia de protección de animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia conforme con la Orden ECC/566/2015 de 20 de marzo.

1. IDENTIFICACIÓN		
1.1. Apellidos / Apellidos / Surname: SILVEIRA LOUREIRO		
1.2. Nome / Nombre / First names: MARÍA		DNI / IDNI / Identity card number: 35608375M
1.3. Categoría / Categoría / Category: "C"	1.4. Especies / Especies / Species: ROEDORES	1.5. Válido ata / válido hasta / expires: 16/04/2027
2. Nº DO CERTIFICADO / Nº DEL CERTIFICADO / CERTIFICATE NUMBER c430		
3. ORGANISMO QUE EXPIDE O CERTIFICADO / ORGANISMO QUE EXPIDE EL CERTIFICADO / BODY ISSUING THE CERTIFICATE:		
3.1. Nome e endereço do organismo que expide o certificado / Nombre y dirección del organismo que expide el certificado / Name and address of the body issuing the certificate: CONSELLERÍA DO MEDIO RURAL – XUNTA DE GALICIA AXENCIA GALEGA DA CALIDADE ALIMENTARIA Avda. Do Camiño Francés, 10 baixo 15781 Santiago de Compostela A Coruña (España)		
3.2. Teléfono / Teléfono / Telephone: 981 546 654	3.3. FAX / Fax / Fax: 981 546 651	3.4. Correo electrónico / Correo electrónico / Email: fomacion.cmm@xunta.es
3.5. Data / Fecha / Date: 10/05/2019	3.6. Lugar / Lugar / Place: Santiago de Compostela	
3.7. Nome e sinatura / Nombre y firma / Name and signature  Asdo.: Manuel Rodríguez Vázquez Director da Axencia Galega da Calidade Alimentaria		





MÓDULOS FUNDAMENTAIS OU TRONCAIS E ESPECÍFICOS CORRESPONDENTES Á CATEGORÍA "C" REALIZACIÓN DOS PROCEDEMENTOS – ORDE ECC/566/2015, DE 20 DE MARZO

MÓDULOS FUNDAMENTAIS OU TRONCAIS

- 1.- *Lexislación nacional (1 hora).*
- 2.- *Ética, benestar animal e as "tres erres", nivel 1 (2 horas).*
- 3.- *Bioloxía básica e adecuada, nivel 1 (3 horas).*
- 4.- *Coidado, saúde e manexo dos animais, nivel 1 (5 horas).*
- 5.- *Recoñecemento do dolor, o sufrimento e a angustia (3 horas).*
- 6.- *Métodos incruentos de sacrificio, nivel 1 (2 horas)*

MÓDULOS ESPECÍFICOS DA CATEGORÍA "C"

- 1.- *Bioloxía básica e adecuada, nivel 2 (3 horas)*
 - 2.- *Procedementos minimamente invasores sen anestesia, nivel 1 (5 horas)*
 - 3.- *Procedementos minimamente invasores sen anestesia, nivel 2 (10 horas)*
 - 4.- *Anestesia para procedementos menores (5 horas)*
 - 5.- *Anestesia avanzada para intervencións cirúrxicas ou procedementos prolongados (8 horas)*
 - 6.- *Principios de cirurxía (5 horas)*
-

MÓDULOS FUNDAMENTALES O TRONCALES

- 1.- *Legislación nacional (1 hora).*
- 2.- *Ética, bienestar animal y las "tres erres", nivel 1 (2 horas).*
- 3.- *Biología básica y adecuada, nivel 1 (3 horas).*
- 4.- *Cuidado, salud y manejo de los animales, nivel 1 (5 horas).*
- 5.- *Reconocimiento del dolor, el sufrimiento y la angustia (3 horas).*
- 6.- *Métodos incruentos de sacrificio, nivel 1 (2 horas)*

MÓDULOS ESPECÍFICOS DE LA CATEGORÍA "C"

- 1.- *Biología básica y adecuada, nivel 2 (3 horas)*
- 2.- *Procedimientos mínimamente invasivos sin anestesia, nivel 1 (5 horas)*
- 3.- *Procedimientos mínimamente invasivos sin anestesia, nivel 2 (10 horas)*
- 4.- *Anestesia para procedimientos menores (5 horas)*
- 5.- *Anestesia avanzada para intervenciones quirúrgicas o procedimientos prolongados (8 horas)*
- 6.- *Principios de cirugía (5 horas)*



AGRADECIMIENTOS

Despois de cinco longos anos, aquí chegamos ao final desta etapa. Posiblemente á viaxe máis desexada e á vez máis dura á que nunca me enfrontei. Quen lle ía dicir á María de hai uns anos que ao final o ía conseguir? Son moitas as persoas (e ratiños) que me acompañaron ao longo desta viaxe e sen as cales agora non estaría escribindo estas liñas.

En primeiro lugar, aos meus directores de tese, os Profesores Miguel López e Olga Barca, por amosarme o verdadeiro mundo da ciencia.

A Iara, canto lle teño que agradecer!! Lembro perfectamente o día en que nos coñecemos e os meus pensamentos naquel intre. Tan diferentes e tan semellantes. O seu sorriso e a súa alegría contaxiáronme por completo e, despois de catro anos como veciñas de poiata e de escritorio, converteuse na miña mellor amiga, compañeira de viaxes e aventuras (barranquismo, *rafting*, *kayak*, sendeirismo, escalada... que nos queda por probar?). Entendémonos coas verbas e cos silencios, cunha soa ollada de confianza incondicional que so comparten as persoas da familia que escollemos.

A Vero, que completa o noso pequeno *puzzle* de tres pezas. Xuntas creamos unha piña de risas, bágoas e tolemias. Polos nosos “Ven a cear comigo”, polos lugares nos que nunca estivemos, polas comidas dos xoves e por ser o meu mellor equipo da morte.

A Ánxela, a miña capitana dentro e fora do campo. Por ensinarme todo o que sei sobre ratos, por tranquilizarme nas circunstancias nas que todo parecía non ter solución e por ser sempre o meu salvavidas no laboratorio. Por pornos ao día coas últimas tendencias en *makeup*, alargar as xornadas no lab cos seus grandes coñecementos en *realitys* e sempre estar disposta a unha boa tarde de xogos.

Aos integrantes de GliaTime, os compañeiros máis leais e traballadores (é un pouquiño desastres e caóticos as veces) cos que tiven o pracer de compartir os meus dous últimos anos no CiMUS. María, Antía, Marco e Natalia, non imaxinades canto vos agradezo que me defendédeses nos peores momentos. Seguíde sendo unha piña e celebrando xuntos as moitas vitorias que están por vir. A Lucía e Aloia, ás que por desgraza empecei a coñecer tarde, pero coas que encaixei moi rápido e me fan sentir unha máis do grupo.

A Cris Contreras, por aguantarme con tanta paciencia durante aquel agosto de 2018 no que cheguei como estudante de prácticas a NeurObesity. Aínda que nunca llo dixen, se volví un ano máis tarde para comezar a tese foi sen dúbida grazas a todo o que me transmitiu durante aquel verán. Ao longo destes anos segue sendo para min un gran referente de humanidade e compañeirismo.

Aos demais compañeiros do POL2, aos que xa marcharon, aos que continúan e aos que aínda lles queda un longo camiño por percorrer. Aos que están (Óscar, Amanda, Paola, Nico, Jane e Carlos) deséxovos moita sorte e moito ánimo nesta aventura, e aos veteranos que xa voaron (Eva, Laura, Valentina, Sayani, Patri, Nathalia, Edward, Isma) por compartir xuntos tantas festas das esterotaxias e por deixarme facer maxia coas colañas dos ratos no meu primeiro ano.

Á gran familia de P0LES. Con especial cariño a Cris, a persoa máis traballadora do CiMUS, sempre disposta a rescatarme coas células e a darme bos consellos, exemplo de como

realmente se debe facer ciencia. A Sara, compartir habitación en Baeza permitiume apreciar en maior medida a importancia da lealdade entre compañeiros. A Violeta por vir a darme cháchara polas tardes e facernos rir tanto coas súas tolemias. A Marta pola súa eterna crítica e facer que me plantexe todo sempre. A Tadeu, Alberto, Paola, Sabela e Mari por botarme unha man ou una boa conversa sempre que o precisei.

A todo o persoal do CEBEGA, especialmente a Manuel, David, Belén, Silvia, Gloria, Ana e Bernardo, aos que lles debo mil favores, que velan polo benestar de nosos animais e que nos últimos meses me acolleron como unha máis do equipo.

Tamén teño que agradecer a todas as persoas fora do laboratorio que co seu cariño, apoio e comprensión fixeron esta viaxe máis sinxela. Din que sobran os dedos dunha man para contar os verdadeiros amigos que atopas ao longo da vida. Estes anos demostráronme que teño a sorte de ratificalo. A Ali, por unha infancia e adolescencia con cheiro a cloro turrando unha da outra largo a largo. A Gala, porque podemos afirmar que o mundo é un pano e que as mellores casualidades existen. A Sandra, exemplo de superación onde os haxa. A Jerry, non so o mellor profesor de inglés que tiveron o pracer de coñecer, senon unha persoa que, a pesar dos miles de km de distancia, me transmite unhas gañas terribles de comerme o mundo e que me permitiu afrontar os martes cun extra de enerxía.

Grazas David, por todo. Por ser a miña áncora coa realidade e non deixarme afundir nas tebras. Por lembrarme sempre que a persoa na que máis debo confiar é en min mesma. Xuntos cerraremos esta etapa e percorrерemos todas as que están por vir.

Por último, e sen dúbida máis importante, á miña familia. A avoa Lola, o meu maior exemplo de afouteza que cos seus 90 anos segue atentamente todas as novas sobre avances científicos e que sempre me sorprende coa súa gran curiosidade sobre a anatomía dos ratos. A avoa Nieves, que nos deixou hai pouco. Nunca esqueceré a súa ollada cando me contaba que, a pesar da súa gran intelixencia e valía, á súa condición de irmá maior non lle permitiu continuar os seus estudos e traballar nun laboratorio. So espero que esté orgullosa de que a súa neta conseguira o que a ela lle negaron. Os meus avós Marcial e Paulino. Aos meus tíos Marci e Marcela, que a pesar da distancia sempre estiveron ao meu carón alegrando o ambiente coa súa gracia gaditana e cos que compartín, e espero seguir compartindo, increíbles aventuras arredor do mundo. Ao pequeno Julen, que co seu morno sorriso ilumina as nosas vidas. Por suposto, o máis profundo agradecemento que podo facer. A mamá, papá, Javi e Rebe, por facerme ser quen son, por apoiarme desde sempre e ensinarme o que é realmente importante na vida. Por axudarme a non rendirme. Sen eles nada disto sería posible.

No te rindas que la vida es eso,

continuar el viaje,

perseguir tus sueños,

destrabar el tiempo,

correr los escombros,

y destapar el cielo.

Mario Benedetti



En esta tesis doctoral se investiga el papel de la señalización de AMPK en los astrocitos sobre el control de los patrones de comportamiento circadiano y la homeostasis energética en ratones. Para ello, hemos generado ratones condicionales inducibles con delección de la subunidad reguladora AMPK γ 2 en astrocitos, así como ratones con ablación específica de AMPK γ 2 en astrocitos del núcleo ventromedial del hipotálamo. Nuestros hallazgos revelan que la activación de AMPK en los astrocitos altera la sincronización de los ritmos circadianos a la luz y al patrón de alimentación, así como la homeostasis energética. Este descubrimiento arroja luz sobre la compleja interacción entre los ritmos circadianos, la señalización de AMPK y la regulación de la energía en el organismo.