



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**REGULACIÓN DE CANALES DE CALCIO POR LEPTINA EN EL NÚCLEO ARCUATO  
DE RATA**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
DOCTORA EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**KARINA BERMEO MORA**

**DIRECTOR DE TESIS**

**DR. DAVID ERASMO GARCÍA DÍAZ**  
**FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR**

**DRA. ELVIRA GALARRAGA PALACIO**  
**INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR**

**DR. ARTURO HERNÁNDEZ CRUZ**  
**INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# Índice

Agradecimientos.....	1
Resumen .....	3
Abreviaturas .....	4
1. Introducción.....	5
2. Antecedentes .....	5
2.1 Canales de calcio dependientes de voltaje.....	5
2.2 Leptina.....	8
2.3 Receptores de leptina.....	9
2.4 La leptina regula la actividad de canales iónicos .....	12
2.5 El núcleo ARC.....	12
2.6 Participación de AMPK en la regulación de conducta de ingesta .....	14
3. Planteamiento del problema .....	16
4. Hipótesis.....	16
5. Objetivos .....	16
6. Material y métodos.....	17
6.1 Neuronas disociadas del núcleo arcuato.....	17
6.2 Registros electrofisiológicos .....	18
6.3 Inmunofluorescencia .....	19
6.4 Análisis de datos.....	19
7. Resultados .....	20
7.1 Diferencias morfológicas en las neuronas disociadas del ARC .....	20
7.2 Identificación de células NPY y receptor de leptina por inmunocitoquímica .....	21
7.3 La leptina disminuye la amplitud de la corriente producida por VDCCs.....	23
7.4 La leptina no modifica la dependencia al voltaje en las células orexigénicas del ARC.....	25
7.5 Caracterización farmacológica de los tipos de VDCCs presentes en neuronas orexigénicas del ARC .....	28
7.6 La leptina inhibe la amplitud de la corriente de calcio vía AMPK .....	30
8. Discusión.....	34
8.1 Identificación de neuronas del ARC por leptina y su efecto en la amplitud de la corriente de calcio .....	34
8.2 La leptina regula al canal de calcio tipo L sin cambios en la dependencia al voltaje.....	35
8.3 Modulación de los canales de calcio por AMPK .....	35
9. Conclusiones .....	39
10. Perspectivas .....	39
11. Referencias .....	40

## **Agradecimientos**

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Fisiología en la Facultad de Medicina, de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la dirección del Dr. David E. García Díaz. Gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) (Proyecto IN216119) y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (Proyecto 255635).

Al Dr. David García, por la dirección de este trabajo y la formación que me brindó, a los miembros de mi Comité Tutor, la Dra. Elvira Galarraga y al Dr. Arturo Hernández, por sus valiosas aportaciones y sugerencias para el desarrollo de este proyecto.

A mis sinodales por sus sugerencias y críticas para mejorar este escrito.

A la Biol. Isabel Arenas, a la Dra. Julieta Garduño y al Dr. Héctor Castro, por su apoyo en la parte experimental, técnica y conceptual en la realización de este proyecto.

## **Agradecimientos**

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas (PDCB) por mi formación.

Al Dr. David por transmitirme su experiencia en estos años, por su apoyo constante y guía.

A Isabel y a Luis, por siempre ayudar y tener las palabras adecuadas en momentos complejos.

A los integrantes del laboratorio, por las discusiones académicas.

A mi familia, porque siempre están presentes y nunca dejaré de agradecerles su cariño, apoyo incondicional, comprensión y amor. En especial a mi mamá, gracias, por tanto.

A los amigos, porque siempre están para animar los momentos difíciles y por tantas risas.

A Héctor, por estos años tan divertidos, llenos de aprendizaje, de motivación y tanto cariño.

## **Resumen**

El control neuronal de la homeostasis energética es determinante para lograr un equilibrio calórico en el organismo. Una de las estructuras que participa en este balance es el núcleo arcuato del hipotálamo, que funciona como un integrador de señales a nivel central y periférico del organismo. Este núcleo se compone principalmente de dos tipos celulares, los cuales se clasifican de acuerdo con el tipo de péptidos que liberan y su función asociada. El primer grupo está formado por neuronas orexigénicas, que liberan NPY/AgRP, mientras que el grupo de neuronas anorexigénicas, liberan POMC/CART. Ambos tipos son blancos de regulación de la leptina, que es una hormona liberada principalmente por el tejido adiposo blanco, la cual produce cambios en la actividad eléctrica de estas células, mediante la regulación de la actividad de los canales iónicos. Particularmente los canales de calcio sensibles al voltaje, que son determinantes para la liberación de neurotransmisores y hormonas, son blanco de la regulación ejercida por esta hormona. Se ha mostrado que en neuronas orexigénicas, la leptina produce la inhibición de la corriente de calcio; sin embargo, los mecanismos que subyacen a esta inhibición no son del todo conocidos. La leptina produce su efecto anorexigénico mediante la inhibición de AMPK, una cinasa que funciona como sensor energético del organismo. De manera interesante, esta cinasa puede modular la actividad de canales iónicos sensibles al voltaje. Estos antecedentes dieron lugar a la pregunta de investigación que aborda este trabajo: ¿Es AMPK la proteína cinasa mediante la cual la leptina inhibe la amplitud de la corriente de calcio en neuronas orexigénicas de rata?

Para responder esta pregunta, la corriente de calcio se registró mediante la técnica de patch-clamp en configuración de célula completa, en cultivos de células disociadas del núcleo arcuato. Las neuronas orexigénicas se identificaron con base en su morfología, capacitancia y respuesta a la leptina, la cual inhibió la amplitud de la corriente de calcio. Para identificar la participación de AMPK en esta inhibición, se emplearon un activador y un inhibidor de esta cinasa, AICAR y Compuesto C, respectivamente. Ambos compuestos reducen significativamente el efecto inhibitorio de la leptina sobre la corriente de calcio. Asimismo, la leptina no modifica la dependencia al voltaje de los canales de calcio, ni tiene efecto sobre la cinética de la corriente. Finalmente, se encontró que la hormona regula preferentemente a los canales de calcio tipo-L. Estos resultados sugieren que AMPK participa en el mantenimiento y la regulación de la corriente de calcio en neuronas orexigénicas del núcleo ARC.

## Abreviaturas

AgRP	Péptido relacionado con el gen <i>Agouti</i>
AMPK	Proteína cinasa activada por AMP
ARC	Núcleo arcuato
CART	Transcrito regulado por cocaína y anfetamina
HVA	Canales activados por alto umbral
JAK-2	Janus cinasa-2
LVA	Canales activados por bajo umbral
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógeno
NPY	Neuropéptido Y
ObR	Receptor de leptina
PI3K	Fosfatidilinositol-3-cinasa
POMC	Pro-opiomelanocortina
VDCCs	Canales de calcio sensibles al voltaje

## **1. Introducción**

La conducta de ingesta es un fenómeno determinante para la supervivencia del organismo, que se encuentra regulada por factores a nivel periférico y central, por lo que requiere de la organización de las señales que proporcionan los nutrientes, las hormonas y los neurotransmisores, entre otras. La desorganización de estas señales puede dar lugar a un balance energético inapropiado, que puede estar vinculado con patologías como la obesidad, el síndrome metabólico y la diabetes tipo II, que se han convertido en un problema de salud pública a nivel mundial (Saklayen, 2018). Estas patologías son de alta prevalencia particularmente en México (Barquera & White, 2018; DiBonaventura et al., 2017).

Las señales que reflejan el estado energético del organismo se detectan e integran en el sistema nervioso central, en particular en el hipotálamo, que es una estructura que integra información a nivel autonómico y hormonal, la cual va a desencadenar conductas vinculadas a las necesidades energéticas del organismo (Routh et al., 2014). El hipotálamo está conformado por una serie de núcleos que tienen a su cargo diversas funciones fisiológicas. Particularmente, el núcleo arcuato (ARC) detecta e integra las señales energéticas del organismo (Huisman et al., 2019). Este núcleo contiene neuronas orexigénicas y anorexigénicas, que modifican su actividad eléctrica en función de las señales energéticas que las regulen, es decir, péptidos y hormonas. Una de las señales más relevantes en torno al estado energético del organismo es la producida por la leptina, que se asocia con saciedad a largo plazo (Perry & Wang, 2012), además de tener un papel clave en la regulación de la ingesta de alimentos y el balance energético del organismo. Esta molécula ha sido ampliamente estudiada y se ha logrado correlacionar cambios en la síntesis y alteraciones en su cascada de señalización, con patologías como las antes descritas. Actualmente se siguen descubriendo nuevas funciones de esta hormona, entre ellas, la regulación de canales iónicos, tales como los canales de calcio dependientes de voltaje (VDCCs).

## **2. Antecedentes**

### **2.1 Canales de calcio dependientes de voltaje**

El calcio es un ion que participa en una gran variedad de funciones de la célula, ya que altera la conformación de distintas proteínas, así como el campo eléctrico local, que son las dos herramientas universales de la transducción de señales (Clapham, 2007). Se ha encontrado que



este ion participa en funciones como: el inicio de la contracción en células del músculo liso y cardiaco, la secreción de hormonas en células endocrinas, iniciación de transmisión sináptica en neuronas, regulación de actividad enzimática, expresión génica y otros procesos bioquímicos (William A. Catterall, 2011), como se muestra en la Fig. 1.

El calcio se encuentra en el interior como en el exterior de la célula y está distribuido en diferentes concentraciones. Se ha estimado que la concentración intracelular de este ion oscila alrededor de 100 nM (calcio libre), mientras que en el medio extracelular se encuentra en el orden de mM. Dado que este ion es determinante para los procesos fisiológicos antes mencionados, el influjo y eflujo, así como el intercambio de calcio con almacenes intracelulares es crucial para la célula, y, por lo tanto, es un proceso altamente regulado. Uno de los principales mecanismos de flujo desde el exterior hacia el interior de la célula son los VDCCs, los cuales participan en la generación de la actividad eléctrica de las neuronas.

Los VDCCs son proteínas localizadas en la membrana plasmática, que aumentan su probabilidad de apertura ante cambios en el potencial de membrana. Clásicamente, y de acuerdo con esta propiedad, pueden clasificarse en dos tipos, los activados por alto umbral (HVA) y los activados por bajo umbral (LVA). Los primeros aumentan su probabilidad de apertura en respuesta a despolarizaciones de membrana mayores, mientras que los LVA se abren ante cambios menores en el voltaje de membrana (Simms & Zamponi, 2014; Yaari et al., 1987).

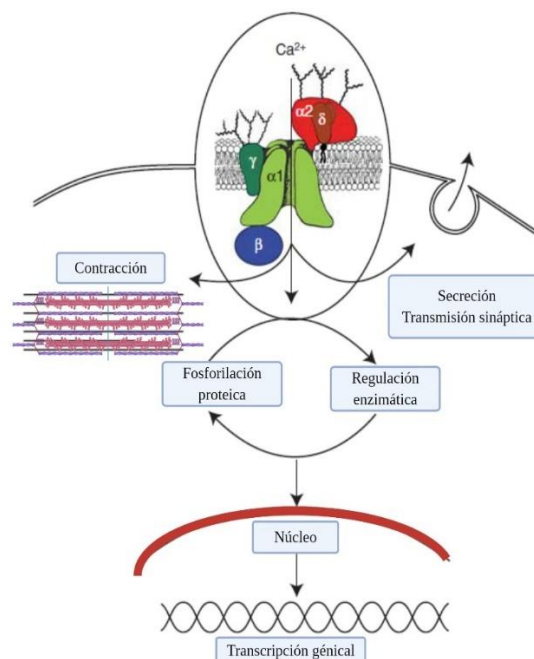


Figura 1. Conformación y transducción de señales de los canales de calcio sensibles al voltaje. Los VDCCs están compuestos por cuatro subunidades ( $\alpha_1$ ,  $\beta$ ,  $\alpha_2\delta$  y  $\gamma$ ). La entrada de calcio por medio de estas proteínas a la célula inicia una gran variedad de procesos intracelulares, tales como: contracción, secreción, transmisión sináptica,

regulación enzimática, fosforilación / desfosforilación proteica y transcripción génica. Modificada de Catterall (William A. Catterall, 2011). Figura creada mediante BioRender.

Otra clasificación de los VDCCs es la farmacológica, con la que se pueden identificar los siguientes tipos: canales de calcio tipo-L, sensibles a dihidropiridinas, como la nifedipina, el canal de calcio tipo-N, sensible a  $\omega$ -conotoxina GVIA ( $\omega$ -ConGVIA), los canales de calcio tipo-P/Q, sensibles a  $\omega$ -Agatoxina IVA ( $\omega$ -AgaIVA), y finalmente los canales tipo-R, que presentan mayor afinidad por el antagonista SNX-482 (Bourinet et al., 2001; Dolphin, 2018; Llinás et al., 1989; Nowycky et al., 1985; Tsien et al., 1988), como se observa en el Cuadro 1.

Se ha mostrado que los VDCCs son un complejo proteico conformado por la subunidad  $\alpha 1$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , y  $\alpha 2\delta$  (Fig. 1). La principal unidad transmembranal del canal está formada por la subunidad  $\alpha 1$ , la cual forma al poro y contiene al sensor de voltaje. Las subunidades  $\beta$  y  $\alpha 2\delta$  influyen en la dependencia al voltaje del canal, mientras que la subunidad  $\gamma$  tiene poca participación en estos procesos (William A. Catterall, 2011). Particularmente el dímero  $\alpha 2\delta$  participa en el tráfico y función de los Cav1 y Cav2 (tipo-L y N), en el tráfico de los canales hacia sitios específicos de la célula e influyen en las propiedades biofísicas del canal, así como en la transmisión sináptica y en procesos de sinaptogénesis (Dolphin, 2018).

Cuadro 1. Resumen de las principales características de los canales de calcio sensibles al voltaje

Canal (subunidad $\alpha$ )	Rango de voltaje de activación	Tipo de corriente	Principal bloqueador	Localización primaria	Función
<b>Ca<sub>v</sub>1.1</b>	HVA	L	Dihidropiridinas	Músculo esquelético	Acoplamiento excitación – contracción Regulación génica
<b>Ca<sub>v</sub>1.2</b>	HVA	L	Dihidropiridinas	Músculo cardíaco	Acoplamiento excitación – contracción Secreción de hormonas Regulación génica
<b>Ca<sub>v</sub>1.3</b>	HVA	L	Dihidropiridinas	Células endocrinas Neuronas	Secreción de hormonas Regulación génica
<b>Ca<sub>v</sub>1.4</b>	HVA	L	Dihidropiridinas	Retina	Liberación tónica de neurotransmisor
<b>Ca<sub>v</sub>2.1</b>	HVA	P/Q	$\omega$ -AgaIVA $\omega$ -Con-MV	Terminales nerviosas Dendritas	Liberación de neurotransmisor

					Transitorios dendríticos de calcio
<b>Ca<sub>v</sub>2.2</b>	HVA	N	$\omega$ -ConGVIA	Terminales nerviosas Dendritas	Liberación de neurotransmisor Transitorios dendríticos de calcio
<b>Ca<sub>v</sub>2.3</b>	HVA	R	SNX-482	Cuerpos celulares Dendritas Terminales nerviosas	Potenciales de acción dependientes de calcio Liberación de neurotransmisor
<b>Ca<sub>v</sub>3.1</b>	LVA	T	Mibefradil	Neuronas Músculo cardíaco	Marcapasos Disparos repetitivos
<b>Ca<sub>v</sub>3.2</b>	LVA	T	Mibefradil	Riñón Músculo cardíaco Neuronas	Marcapasos Disparos repetitivos
<b>Ca<sub>v</sub>3.3</b>	LVA	T	Mibefradil	Neuronas	Marcapasos Disparos repetitivos

Abreviaturas:  $\omega$ -AgaIVA,  $\omega$ -agatoxina IVA;  $\omega$ -Con-MV,  $\omega$ -conotoxina MV;  $\omega$ -ConGVIA,  $\omega$ -conotoxina GVIA; SNX-482, versión sintética de la toxina de la tarántula *Hysterocrates gigas*. Adaptada de Catterall (W. A. Catterall, 2000; William A. Catterall et al., 2005).

Los VDCCs son proteínas reguladas que interactúan con otras moléculas, como son: señales dependientes de receptores, proteínas G, calmodulina, el propio calcio como segundo mensajero, el ácido araquidónico y fosfolípidos de membrana (Castro et al., 2020; Dolphin, 2003; Garcia et al., 1998; Simms & Zamponi, 2014; Suh et al., 2010). Es sabido que una gran variedad de hormonas, entre ellas la leptina, pueden modificar la actividad los canales iónicos.

## 2.2 Leptina

La leptina es una hormona anorexigénica, producto del gen *ob*, producida principalmente por el tejido adiposo blanco (Frederich et al., 1995); sin embargo, se ha encontrado que también se expresa en otros tejidos como: la placenta, la mucosa gástrica, la médula ósea, el epitelio mamario, el músculo esquelético, la glándula pituitaria, el hipotálamo y en huesos (Frühbeck, 2006). Su nombre proviene del griego *leptos* que significa delgado, es una proteína no glucosilada de 16 KDa, conformada por 167 aminoácidos, incluyendo una secuencia secretoria (de 21 aminoácidos), la cual se escinde al entrar a circulación (Cammisotto & Bendayan, 2007). Su estructura cristalográfica muestra que está formada por cuatro  $\alpha$ -hélices antiparalelas

conectadas entre sí. Posee dos residuos de cisteína, que forman puentes disulfuro, que son cruciales para su estabilidad, secreción y actividad biológica. Estas características estructurales, han permitido clasificar a la leptina dentro del grupo de citocinas de cadena larga (Wauman et al., 2017; F. Zhang et al., 1997).

La leptina tiene efectos pleiotrópicos en el organismo, así como tejido-específicos. Entre los ejemplos de funciones reguladas por esta hormona, además de la ingesta, están: angiogénesis (Tahergorabi & Khazaei, 2015), regulación del sistema inmunológico (Pérez-Pérez et al., 2017), contribuye al desarrollo de tumores en cáncer (Angelucci et al., 2020), entre muchos otros. Además, la leptina tiene efectos sobre el sistema nervioso, por ejemplo, facilita la inducción de plasticidad sináptica dependiente del receptor *N-metil-D-aspartato* (NMDA), ya que aumenta el flujo de calcio a través de este receptor-canal (Shanley et al., 2001). Udagawa y cols. (Udagawa et al., 2007) mostraron que embriones de ratones deficientes en la producción de leptina (*ob/ob*) contienen un menor número de células en el neuroepitelio, lo cual puede ser restablecido con una inyección intracerebroventricular de la hormona. Con esto concluyeron que la leptina participa en el desarrollo de células gliales y neuronas. También se ha mostrado que la leptina es un potente inhibidor de la actividad epileptiforme en neuronas del hipocampo (Shanley et al., 2002). Por lo tanto, desde su descubrimiento (Y. Zhang et al., 1994), el estudio de los efectos de la leptina se han convertido en un área de investigación relevante en fisiología.

### 2.3 Receptores de leptina

La leptina se une a receptores en la membrana de las células para lograr sus efectos. Estos receptores se han localizado y diferenciado a nivel periférico y central.

Se han identificado seis isoformas del receptor de leptina (a - f), son generadas por splicing alternativo y tienen en común el dominio extracelular para la unión de la hormona. Estos receptores se han dividido en tres grupos con características propias: isoforma secretada, isoforma corta e isoforma larga (Kwon et al., 2016).

Las isoformas corta y larga poseen un dominio transmembranal, por lo que se clasifican dentro la familia de receptores tipo I de citocinas, que se caracterizan por poseer residuos conservados de cisteína y el sitio de unión WSXWS (Tartaglia et al., 1995). Se ha mostrado que la forma larga o tipo b (ObRb) posee un dominio intracelular largo (302 aminoácidos), que está acoplado a diversas proteínas que se fosforilan y encienden cascadas de señalización, como se muestra en la Fig. 2. Una vez que la leptina llega a la célula, el receptor se homodimeriza mediante

uniones disulfuro en el dominio extracelular (White & Tartaglia, 1999). Este evento desencadena la fosforilación la proteína Janus cinasa 2 (JAK-2), que a su vez fosforila al receptor de leptina y una serie de efectores río abajo, entre los cuales destacan tres residuos de tirosina (Y985, Y1077 y Y1138). Cada uno de estos residuos, está vinculado a diferentes vías de señalización, que se asocian con el efecto de la leptina en el organismo.

La fosforilación del residuo Y985 activa a la proteína scr-homologa del dominio 2 (SHP-2) y la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK). Estas vías median al sistema de retroalimentación negativo para la señalización de la leptina, debido a que es el sitio de unión para el supresor de señalización de citocinas 3 (SOCS-3) (Bjørbaek et al., 1998; Björnholm et al., 2007). El residuo Y1077 activa al transductor de señal y activador de la transcripción 5 (STAT5), cuya función fisiológica no ha sido entendida (Pan et al., 2019; Yiyang Zhang & Chua, 2017). Finalmente, Y1138 activa al transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3), que media la homeostasis energética, las funciones neuroendocrinas ejercidas por la hormona, y juega un papel relevante en la reproducción. Las mutaciones en este sitio generan un fenotipo de obesidad, y, por lo tanto, media los efectos metabólicos de la leptina (Bates et al., 2003). Posterior a la fosforilación, se recluta a STAT3, el cual se une a los promotores de neuropéptido Y y del péptido relacionado con el gen *Agouti* (*npy/agrp*), así como a los promotores de pro-opiomelanocortina y del transcrito regulado por cocaína y anfetamina (*pomc/cart*), para inhibir y aumentar la expresión de estos neuropéptidos, respectivamente (Gong et al., 2008).

Aunque se han mostrado diversas vías intracelulares activadas por el receptor, que están ligadas con la fosforilación de los residuos de tirosina, aún se desconoce cómo se vincula la actividad del receptor con muchas otras cascadas de señalización. No se sabe cuáles son las vías que subyacen a la activación o inhibición de proteínas y factores de transcripción, como son la diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR), proteína cinasa activada por AMP (AMPK), entre otras, tal como se muestra en la Fig. 2.

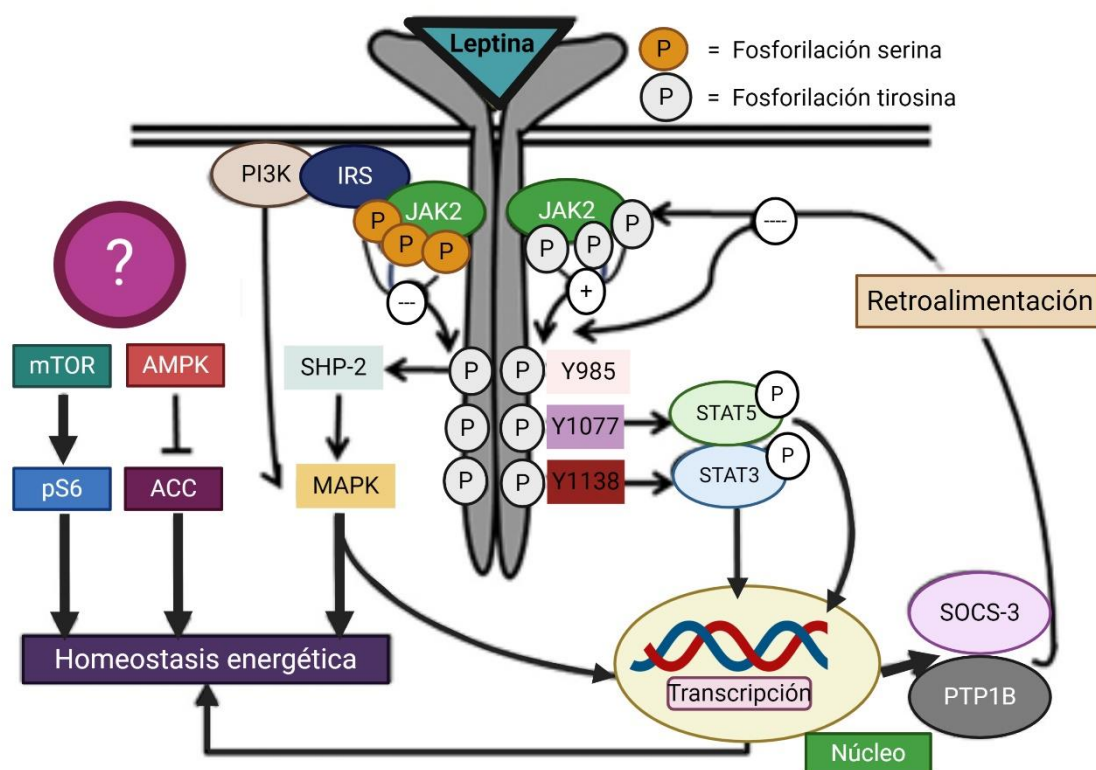


Figura. 2. Vías de señalización activadas por ObRb en el hipotálamo. PI3K = fosfatidilinositol-3-cinasa; IRS = sustrato del receptor de insulina; JAK2 = janus cinasa-2; STAT = transductor de señal y activador de la transcripción; SOCS-3 = supresor de la señalización de citoquinas 3; PTP1B = fosfotirosina fosfatasa 1B; mTOR = diana de rapamicina en células de mamífero; pS6 = proteína ribosomal fosforilada S6; AMPK = proteína cinasa activada por AMP; ACC = acetil-CoA carboxilasa; SHP-2 = proteína scr-homologa del dominio 2; MAPK = proteína cinasa activada por mitógeno. Figura modificada de Münzberg & Morrison (Münzberg & Morrison, 2015). Figura creada mediante BioRender.

Se ha mostrado que la expresión de ObRb se da predominantemente en el hipotálamo; sin embargo, también se ha encontrado expresado en cerebelo, sustancia nigra, núcleo del tracto olfatorio lateral, distintos núcleos del tálamo, núcleo geniculado lateral, hipocampo, plexos coroideos, meninges, alrededor de vasos sanguíneos (Elmqvist et al., 1998; Shioda et al., 1998) y astrocitos, cuya regulación por parte de la leptina se ha asociado con los efectos antiinflamatorios e inflamatorios de la hormona, que resultan clave en patologías como la obesidad (Hsuchou et al., 2009).

Como se mencionó anteriormente, el estudio de la leptina y sus implicaciones fisiológicas continúan siendo un área activa de estudio. De manera interesante, se ha mostrado que la leptina regula la actividad de una gran variedad de proteínas de membrana, entre las cuales destacan los canales iónicos.

## 2.4 La leptina regula la actividad de canales iónicos

La leptina regula mediante la activación de fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K) la actividad de canales iónicos (Gavello et al., 2016), aunque se han descrito la participación de otras vías dependiendo del subtipo de canal iónico que se explore. En células  $\beta$ -pancreáticas, se ha mostrado que esta hormona inhibe la secreción de insulina mediante el aumento de la densidad de canales de potasio sensibles a ATP ( $K_{ATP}$ ), y del canal rectificador tardío de potasio  $K_v2.1$ . La leptina activa a AMPK y a la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA), lo que conlleva a la despolimerización de filamentos de actina. La leptina también aumenta la densidad de corriente en los canales  $K_v2.1$ ; por lo tanto, coordina la disponibilidad en la membrana de ambos canales iónicos y con esto, regula parte del acoplamiento entre la inhibición de la excitabilidad y la secreción de insulina en las células  $\beta$ -pancreáticas (Wu et al., 2015). En células gonadotropas, se ha mostrado que la leptina aumenta la expresión de los canales de calcio tipo-L, que repercute en el aumento de la liberación de la hormona luteinizante (Avelino-Cruz et al., 2009).

La leptina regula canales iónicos en el sistema nervioso central. Esta hormona inhibe la actividad de neuronas de hipocampo mediante la activación de los canales de potasio de alta conductancia dependientes de calcio (BK) (Shanley et al., 2001, 2002). Asimismo, se ha mostrado que la leptina regula el tráfico y la activación de los canales de potencial transitorio (TRPs), en el mismo tipo celular (Dhar et al., 2014). Particularmente, en neuronas del hipotálamo, la leptina inhibe a los  $K_{ATP}$  (Spanswick et al., 1997).

En neuronas anorexigénicas del ARC, la amplitud de la corriente de calcio aumenta en presencia de leptina, debido a la activación de vías dependientes de PI3K. Por el contrario, en las neuronas orexigénicas la amplitud de la corriente de calcio disminuye (J.-H. Wang et al., 2008). La regulación de las neuronas del ARC es determinante para la detección de las hormonas provenientes de la periferia, que impactan en la actividad eléctrica de estas células.

## 2.5 El núcleo ARC

El ARC es una estructura que forma parte del hipotálamo y participa en la regulación del balance energético del organismo, que es la diferencia entre la ingesta de alimentos y el gasto energético (Schwartz & Morton, 2002). El ARC produce esta regulación de dos formas, la primera es mediada por la secreción de factores tróficos hacia el sistema porta hipofisiario, con

el fin de regular la secreción de hormonas por parte de la glándula pituitaria (van den Pol et al., 2019), mientras que la segunda engloba a la regulación de la conducta de ingesta (Lazzarino et al., 2019; van den Pol et al., 2019). El ARC se localiza contiguo a la eminencia media y rodeando al tercer ventrículo; asimismo, tiene la característica de encontrarse en un sitio con una barrera hematoencefálica particular, en la cual el endotelio está formado por capilares fenestrados (Kohno & Yada, 2012). Gracias a estas características, el ARC detecta señales centrales por medio del líquido cefalorraquídeo, así como señales periféricas por medio de la sangre (R. D. Cone et al., 2001; Roger D. Cone, 2005; Sohn, 2015), tal como se muestra en la Fig. 3.

El ARC está formado principalmente por dos tipos celulares. Esta división ha sido propuesta por el tipo de péptido y la función en la regulación de la ingesta de alimentos con la que se asocia. El primer grupo, está formado por neuronas que sintetizan POMC y CART, ambos péptidos se relacionan con la disminución de la ingesta de alimentos, por lo tanto, son neuronas anorexigénicas. Se ha mostrado que ratones knockout de POMC muestran hiperfagia y obesidad (Yaswen et al., 1999); asimismo se ha establecido que a partir de POMC, se genera la hormona estimulante de melanocitos alfa ( $\alpha$ -MSH), que media la activación de vías anorexigénicas (Romanova et al., 2018). El segundo grupo de células está formado por neuronas que sintetizan AgRP y NPY, ambos péptidos son inductores de la ingesta de alimentos. Se ha mostrado por medio de técnicas en optogenética, que la activación de las células que expresan estos péptidos induce la ingesta de alimento, incluso cuando el roedor se encuentra saciado; por lo tanto, son neuronas orexigénicas (Aponte et al., 2011).

Ambos grupos neuronales son blanco de neurotransmisores y hormonas que regulan su funcionamiento y actividad eléctrica, cuyo resultado fisiológico dependerá del tipo neuronal y del tipo de péptido u hormona que tenga contacto con estas neuronas, ya que, como se muestra en la Fig. 3, expresan una gran cantidad de receptores. La ghrelina, por ejemplo, es una hormona orexigénica sintetizada principalmente por el estómago. La administración intraperitoneal o intracerebroventricular de esta hormona hay un aumento en la ingesta de alimento y el peso corporal total en roedores, así como una disminución del gasto energético (Tschöp et al., 2000). Por el contrario, la insulina y la leptina son hormonas anorexigénicas que se encargan de informar al cerebro del estado de los almacenes energéticos a largo plazo, de esta manera funcionan como factores de saciedad a largo plazo, en especial la leptina.



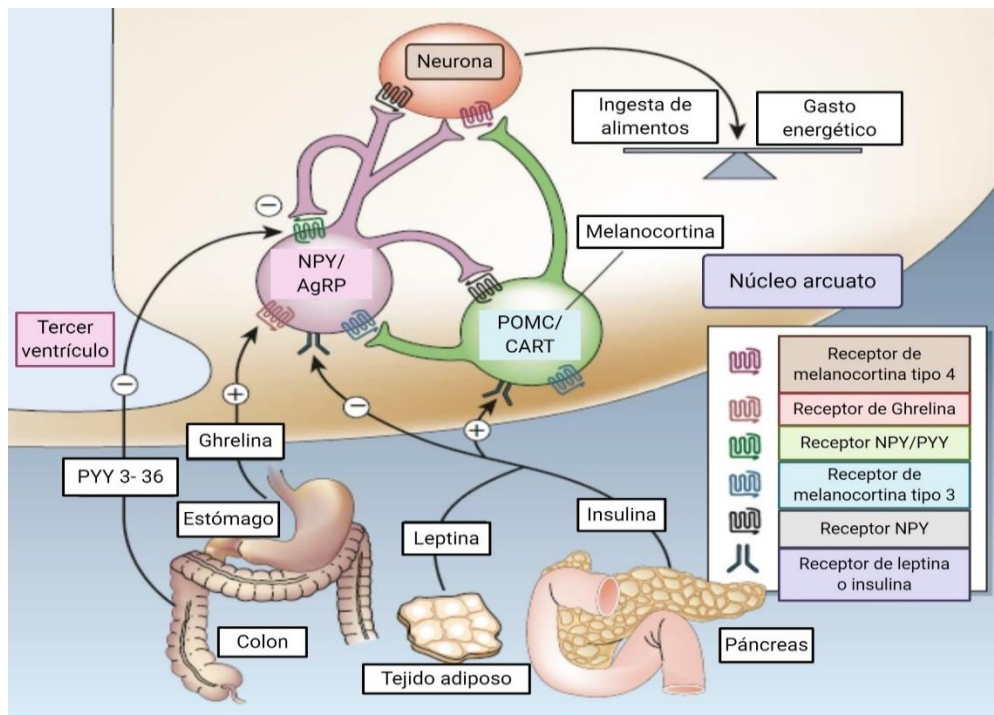


Figura. 3. El núcleo arcuato y las hormonas que regulan la ingesta de alimentos. La leptina y la insulina son hormonas anorexigénicas, las cuales disminuyen la actividad eléctrica de las neuronas orexigénicas e impactan en la disminución de la conducta de ingesta, al igual PYY 3-36, participa en esta disminución. Las hormonas orexigénicas, como la ghrelina, aumentan la actividad eléctrica de las neuronas orexigénicas, y producen la liberación de NPY/AgRP. Estas hormonas son detectadas por los diferentes receptores expresados en estas neuronas, para NPY, ghrelina, melanocortina, leptina e insulina. Modificado de Schwartz & Morton (Schwartz & Morton, 2002). Figura creada mediante BioRender.

Una de las proteínas que participan de forma activa en la detección del estado energético del organismo, y que se encuentra altamente expresadas en el ARC, es AMPK.

## 2.6 Participación de AMPK en la regulación de conducta de ingesta

AMPK es una proteína trimérica que tiene una gran variedad de funciones, entre las cuales se encuentran: regulación de vías metabólicas, regulación energética a partir de la información proveniente de hormonas, péptidos, neurotransmisores y nutrientes (Minokoshi et al., 2008); por lo que se ha destacado su papel como sensor del estado energético de las células (Lin & Hardie, 2018b; Shen et al., 2014). Esta proteína está formada por la subunidad  $\alpha$ -catalítica, y las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$  regulatorias (Hardie, 2007). Se ha mostrado que esta proteína, dada su relevancia para la supervivencia de la célula, cuenta con diversos mecanismos de regulación. El primero es el que involucra la fosforilación de sitios serina/treonina, particularmente el sitio treonina-172 (Thr-172), ubicado en la subunidad  $\alpha$ -catalítica (Crute et al., 1998). Este sitio puede ser fosforilado por cinasas río arriba, como la cinasa hepática B1 (LKB1) (Shaw et al., 2004) y calcio calmodulina cinasa II (CaMKII) (Hawley et al., 2005).

El segundo mecanismo de regulación implica la unión de los nucleótidos de adenosina AMP, ADP y ATP, a la subunidad  $\gamma$  de AMPK, siendo el principal agonista el AMP. Dado que la proporción disponible de estos nucleótidos pueden activar o inhibir a AMPK, no resulta sorprendente que la privación de glucosa sea uno de los factores que active a este sensor en el hipotálamo, y que con ello impacte en la conducta de ingesta (Andersson et al., 2004; Mountjoy et al., 2007; Su et al., 2012). Este mecanismo es uno de los más investigados, ya que se puede activar por estrés energético en las células, debido a la interferencia en la producción de ATP o porque la célula activo vías que implican un consumo energético elevado. En este escenario, AMPK puede ser activada mediante: 1) la unión de AMP o ADP promueve la fosforilación de Thr-172 mediante la proteína LKB1; 2) la unión de AMP o ADP inhibe la desfosforilación de Thr-172 mediante proteínas fosfatasas; 3) la unión de AMP, pero no de ATP, causan la activación alostérica de la proteína y 4) la activación por CaMKII (Fogarty et al., 2010; Lin & Hardie, 2018a), debido a la liberación de pozas intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ . Este último mecanismo es principalmente mediado por hormonas.

Además de estas vías activadas por nucleótidos, se han descrito vías no canónicas para la activación de AMPK; es decir, que no requieren de cambios en la concentración de estos nucleótidos. En fibroblastos de ratón con altas concentraciones de glucosa disponible, se ha encontrado la activación de AMPK en ausencia de modificaciones en la concentración de AMP/ATP o ADP/ATP (Yiyang Zhang & Chua, 2017; Y.-L. Zhang et al., 2013).

La actividad de AMPK está estrechamente ligada con la actividad de la leptina, de hecho, ha surgido como una molécula clave para que esta hormona pueda llevar a cabo sus efectos anorexigénicos (Tanida et al., 2015). Se ha mostrado que la cinasa p70S6 es clave para mediar los efectos de la leptina sobre AMPK, ya que, una vez activado el ObRb, la cinasa p70S6 es activada, lo cual produce la fosforilación de la serina-491 (Ser-491) en la subunidad  $\alpha$ -catalítica de AMPK. Esta cascada promueve la inhibición de AMPK en células del hipotálamo (Dagon et al., 2012; Kong et al., 2016).

De forma interesante, se ha reportado que AMPK puede modular la actividad de canales iónicos activados por voltaje, tales como los BK (Föller et al., 2012) y los canales de calcio tipo-L (Huang et al., 2015); sin embargo, el mecanismo por el cual AMPK hace esta regulación no se conoce.

### **3. Planteamiento del problema**

El ARC modula la conducta de ingesta a través de hormonas que informan del estado energético del organismo, tales como la leptina. Una pieza clave para que esta hormona ejerza sus efectos anorexigénicos es la inhibición de AMPK. Esta cinasa modula la actividad de canales iónicos sensibles al voltaje. En neuronas orexigénicas la leptina disminuye la amplitud de la corriente de calcio por un mecanismo desconocido. Por lo tanto, este trabajo propone la siguiente pregunta de investigación:

¿La leptina disminuye la amplitud de la corriente de calcio mediante la participación de AMPK en neuronas orexigénicas de rata?

### **4. Hipótesis**

Los canales de calcio de las neuronas orexigénicas del ARC son regulados por leptina mediante AMPK.

### **5. Objetivos**

Objetivo general

- Determinar la vía de señalización mediante la cual la corriente de calcio es inhibida por leptina en neuronas orexigénicas del ARC de rata.

Objetivos particulares

- Identificar la presencia de NPY en cultivos primarios obtenidos por disociación aguda.
- Identificar el efecto de la leptina sobre la corriente de calcio en las células en cultivo.
- Caracterizar la vía de señalización mediante la cual la leptina inhibe la corriente de calcio en neuronas orexigénicas de rata.
- Identificar los subtipos de canales de calcio que se encuentran en las neuronas orexigénicas del ARC.
- Caracterizar las propiedades biofísicas de los canales de calcio que responden con inhibición por leptina.

## 6. Material y métodos

### 6.1 Neuronas disociadas del núcleo arcuato

Las neuronas del ARC se aislaron de acuerdo con trabajos previos (Bargas et al., 1994; Hernández-Flores et al., 2015), con algunas modificaciones. Para obtener las células disociadas, se emplearon ratas Wistar de 10 días posnatal, las cuales fueron anestesiadas por medio de una inyección intraperitoneal con pentobarbital sódico (40 mg/kg). Las ratas fueron perfundidas con una solución alta en sacarosa, compuesta por (mM): 234 sacarosa, 28 NaHCO<sub>3</sub>, 7 glucosa, 4.5 ácido pirúvico, 0.2 de ácido ascórbico, 2.5 KCl, 7 MgCl<sub>2</sub>, 1.4 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 0.4 CaCl<sub>2</sub>. El cerebro fue rápidamente extraído y colocado en la solución alta en sacarosa previamente descrita a punto de congelación. Se obtuvieron rebanadas coronales del cerebro de 300 µm de grosor mediante un vibratomo (Leica VT 1200S). Solo se seleccionaron las rebanadas que contenían al ARC. Como referencia para localizar al núcleo, se identificaron las rebanadas con el hipocampo (en posición horizontal), el tercer ventrículo y la eminencia media, como se muestra en la Fig. 4. Las rebanadas fueron mantenidas en una solución KREBS a temperatura ambiente, por un tiempo de 30 a 40 min, la solución contenía (mM): 126 NaCl, 15 glucosa, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 0.2 thiourea, 0.2 ácido ascórbico, 3.5 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 1.2 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 1 CaCl<sub>2</sub>. Para obtener las células disociadas, el ARC fue bilateralmente disecado de las rebanadas y devuelto a una solución salina alta en Ca<sup>2+</sup> (2 mM) y 10 U/mL de papaína (Sigma Aldrich) a 34°C. Después de 20 minutos de digestión enzimática, el tejido fue lavado tres veces con una solución baja en Ca<sup>2+</sup>, (0.25 mM) a una temperatura de -4°C. Al finalizar los lavados, el tejido fue dispersado mecánicamente mediante pipetas pasteur, previamente flameadas, con tres calibres distintos. Al contenido se agregó 400 µl de medio neurobasal, suplementado con 10% de suero bovino fetal y 2% de B27. Las células se colocaron en vidrios previamente tratados con poly-L-lisina y finalmente, fueron colocadas dentro de un incubador a 37°C durante 30 minutos para su posterior registro.

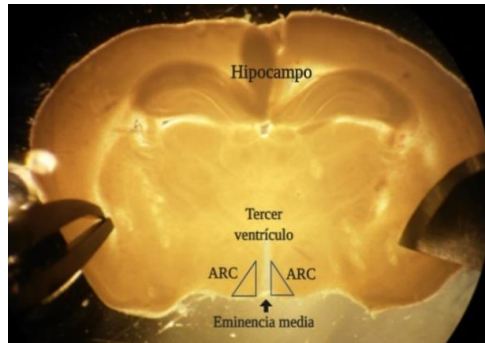


Figura 4. Micrografía de rebanada coronal obtenida de cerebro de ratona. La rebanada muestra las estructuras clave que se identificaron para localizar las rebanadas que contenían al ARC, que son: el hipocampo (en forma horizontal), el tercer ventrículo y la eminencia media. El ARC se muestra dentro de los triángulos azules, que corresponden a la zona de la cual se realizó la disección.

## 6.2 Registros electrofisiológicos

Se empleó la técnica de fijación de voltaje en micro áreas de membrana (patch-clamp), para registrar la  $I_{Ba^{2+}}$  en configuración de célula completa (Hamill et al., 1981) con el amplificador HEKA EPC-9 (HEKA Elektronik, Lambrecht/Pfalz, Germany) a temperatura ambiente. Se usaron pipetas de borosilicato, con una resistencia de 3 a 4 M $\Omega$ . Las resistencias en serie fueron compensadas a >50%. Las corrientes fueron adquiridas a 3 kHz y analizadas mediante Igor Pro (versión 6.1).

Para medir la  $I_{Ba^{2+}}$  se emplearon soluciones para minimizar otros tipos de corrientes iónicas. La corriente  $I_{Ba^{2+}}$  fue definida como el componente sensible a 100  $\mu$ M de CdCl<sub>2</sub>. Se usó Ba<sup>2+</sup> como acarreador de carga, con el objetivo de amplificar el tamaño de la corriente y bloquear corrientes generadas por K<sup>+</sup>. Los componentes de la solución externa fueron (mM): 148.5 TEA-Cl, 10 BaCl<sub>2</sub>, 8 glucosa, 10 HEPES, 1 MgCl<sub>2</sub> and 0.0001 TTX, mientras que la solución interna se compuso de (mM): 32 TEA-Cl, 140 CsCl, 10 HEPES, 0.1 BAPTA-Cs, 1 MgCl<sub>2</sub>, 4 MgATP, 0.3 Na<sub>2</sub>GTP y 0.1 leupeptina. La leptina fue reconstruida en Tris HCL y aplicada por perfusión. El porcentaje de inhibición por leptina sobre la  $I_{Ba^{2+}}$  fue cuantificada como se describe en trabajos previos (Cruzblanca et al., 1998).

### 6.3 Inmunofluorescencia

Para la identificación del NPY y el ObR, las células se fijaron con paraformaldehído (4%) durante 20 minutos, posteriormente se realizaron lavados con KPBS y se inició con el procedimiento inmunohistoquímico. Los anticuerpos que se utilizaron fueron los siguientes: anti-NPY-sheep (Cat. AB1583, Millipore, dilución 1:1000), anti-donkey FITC (Cat. AP184F, Millipore, dilución 1:250), anti-ObR (B-3)-mouse (Cat. Sc-8391, Santa Cruz Biotechnology, concentración 1:500) y anti-mouse-Alexa Fluor 680 (Cat. Sc-516610, Santa Cruz Biotechnology, concentración 1:125). Las muestras se observaron y fotografiaron en un microscopio confocal (Zeiss LSM 800).

### 6.4 Análisis de datos

El análisis estadístico fue realizado mediante el programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA), las gráficas fueron construidas por IGOR Pro (Versión 6.1.2.1, WaveMetrics, Portland, OR, USA, 2009). Los datos son representados como la media  $\pm$  error estándar de la media (SEM). Cada grupo se analizó mediante la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk y mediante análisis ROUT para identificar la presencia de valores atípicos en la muestra; sin embargo, en ningún caso se encontró algún dato con estas características. Las diferencias estadísticas al comparar dos grupos se obtuvieron mediante la prueba *t* de Student (pareada) en caso de una distribución normal, si la distribución no cumplió estas características, se realizó mediante la prueba de Wilcoxon. Al comparar tres condiciones, el análisis se realizó mediante ANOVA de una vía para una muestra normal, seguido de la prueba post-hoc Tuckey. De igual forma, se realizó la prueba de Friedman al no tener una distribución normal, seguido de la prueba de Sidak como post-hoc en el caso de medidas repetidas o prueba Kruskal-Wallis cuando se realizaron mediciones independientes, seguido de la prueba de Dunn como post-hoc. Finalmente, en las curvas corriente – voltaje (I-V) se realizó ANOVA de dos vías, seguido de la prueba de Sidak como post-hoc, ya que el objetivo fue explorar las diferencias de forma pareada y entre grupos, con el objetivo de conocer la región de voltaje en la cual se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas.

La curva dosis – respuesta, fue ajustada con la ecuación de Hill, que se muestra a continuación (Ecuación 1):

$$R = base + (max - base) / \left\{ 1 + \left[ \frac{IC_{50}}{C} \right]^H \right\}$$

donde  $R$  es la inhibición de la corriente,  $C$  es la concentración probada,  $IC_{50}$  corresponde a la concentración de leptina que produce la mitad de la máxima inhibición sobre la corriente y  $H$  es el coeficiente de Hill.

La relación I-V, fue ajustada con la ecuación de Boltzmann modificada, como se muestra a continuación (Ecuación 2):

$$I = (V_m - V_{rev}) * g_{max} / \left( 1 + \exp \left( \frac{V_{1/2} - V_m}{k} \right) \right)$$

Donde  $I$  es la amplitud de la corriente medida en el potencial de membrana de prueba,  $V_{rev}$  es el potencial de reversión,  $g_{max}$  es la máxima conductancia,  $V_{1/2}$  es el potencial de membrana al cual se obtiene la mitad de la activación.

Las curvas de activación e inactivación fueron ajustadas con la ecuación de Boltzmann (Ecuación 3):

$$I/I_{max} = \left( 1 + \exp \left( (V_{1/2} - V_m) / (k) \right) \right)^{-1}$$

donde  $I/I_{max}$  corresponde a la amplitud de corriente normalizada al potencial de membrana ( $V_m$ ),  $V_{1/2}$  es el voltaje medio de la máxima activación e inactivación y  $k$  representa la pendiente.

## 7. Resultados

### 7.1 Diferencias morfológicas en las neuronas disociadas del ARC

Se ha descrito que las neuronas del ARC tienen características morfológicas distintas entre sí, de acuerdo con el tipo de péptidos que sintetizan. Las neuronas orexigénicas, suelen ser monopares o bipolares, con un cuerpo celular triangular de tamaño pequeño, mientras que las neuronas anorexigénicas son multipolares con un soma mediano (J.-H. Wang et al., 2008). Al disociar las neuronas de esta estructura, se apreciaron los tres tipos de morfología previamente descritos, como se muestra en la siguiente figura (Fig. 5).

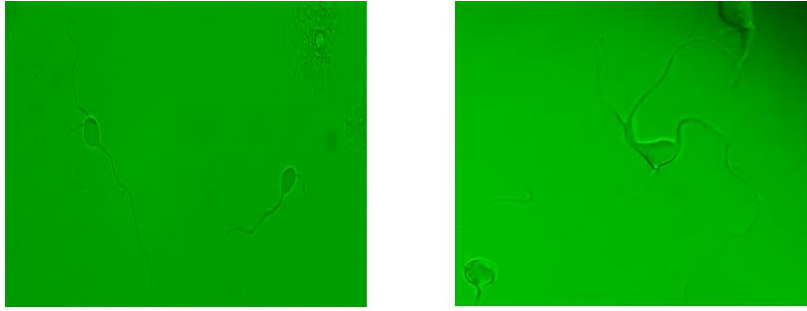


Figura. 5. Diferencias morfológicas en las neuronas disociadas del ARC. Neuronas monopolares y bipolares obtenidas de por medio de disociación aguda.

La obtención de estas células por el método de disociación aguda tiene como ventaja que las neuronas conservan sus procesos principales, como se observa en la Fig. 5, por lo que las células a registrar se pueden seleccionar de acuerdo con sus características morfológicas. Dado que este trabajo tiene como objetivo explorar el efecto de la leptina sobre las neuronas orexigénicas, se optó por registrar únicamente las células monopolares o bipolares después de la dispersión enzimática y mecánica. Aunque estas células conservaron sus procesos principales, se observó una fijación de voltaje adecuada, evaluada después de compensar la resistencia en serie. Esta afirmación se apoya con los trazos obtenidos en las colas de corriente y las curvas de activación de acuerdo con otros trabajos (Bargas et al., 1994; Hernández-Cruz & Pape, 1989). Una vez observadas estas características, se confirmó la presencia del péptido orexigénico NPY y del ObR en los cultivos celulares.

## 7.2 Identificación de células NPY y receptor de leptina por inmunocitoquímica

Con el objetivo de confirmar la presencia del NPY, las células se procesaron mediante inmunohistoquímica. Como se observa en la Fig. 6, en las células disociadas del ARC se detectó la presencia de NPY, así como del ObR; asimismo, en la neurona que se muestra en la Fig. 6A, hay coincidencia con las características morfológicas representativas de una neurona bipolar, las cuales, junto con las células monopolares, se eligieron para este trabajo. Al registrar la corriente de las células, se realizaron mediciones de capacitancia. Se ha documentado que las células de este núcleo se encuentran en un rango de 10 a 20 pF de capacitancia (Sohn et al., 2013), por lo que se empleó esta característica como criterio de inclusión. Como se muestra en la Fig. 6B, de 260 células registradas, 188 se consideraron para este análisis, ya que estuvieron dentro del rango previamente descrito. La media de capacitancia en estas células fue de  $14.75 \pm 0.24$  pF.



Una vez que se identificada la presencia del NPY, ObR y la capacitancia de las células, se realizaron los registros electrofisiológicos mediante patch-clamp, en configuración de célula completa. Se ha estimado que aproximadamente el 50% de las células orexigénicas del ARC expresan al ObR (Rupp et al., 2018; Vong et al., 2011), contrario a las neuronas anorexigénicas, de las cuales el 100% expresan este receptor. Por lo tanto, al registrar las neuronas monopolares o bipolares, se obtuvieron tres grupos de neuronas de acuerdo con su respuesta sobre la corriente de calcio en presencia de leptina. El 10.04% ( $n = 22$ ) no cambio su amplitud de corriente, el 10.05% ( $n = 23$ ) aumentó la amplitud de la corriente de calcio y en el 51.14% ( $n = 103$ ) de las células registradas, la corriente de calcio redujo su amplitud en respuesta a la leptina, como se muestra en la Fig. 6C. El último grupo de neuronas que se muestra en la Figura (Fig. 6C), corresponde al grupo de células cuyo contenido de la solución interna fue modificado, al agregar un inhibidor o un activador de AMPK, que corresponde a 28.77% de las células registradas.

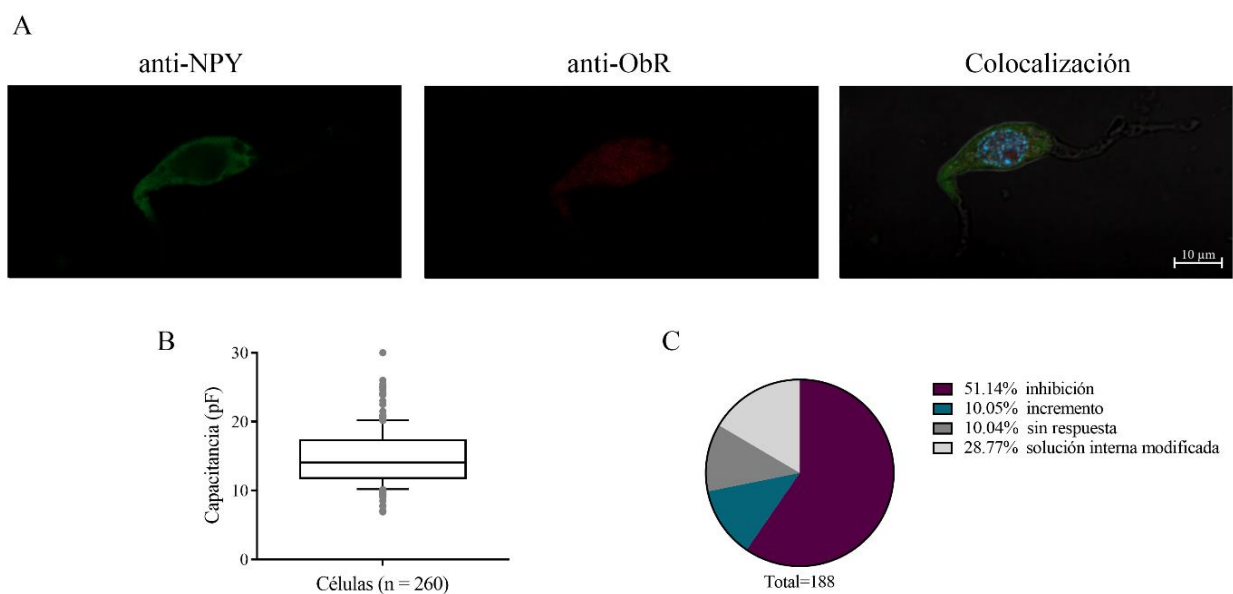


Figura 6. Identificación inmunohistoquímica de neuronas NPY y el ObR. A) Microfotografía representativa de una neurona bipolar reactiva a anti-NPY (verde), anti-ObR (rojo), y la colocalización, con DAPI (azul). B) Gráfica de caja y bigotes que representa a las células consideradas dentro del análisis de este estudio, las cuales se encuentran en un rango de 10 a 20 pF. C) Grupos celulares y proporción de células registradas, de acuerdo con su respuesta a la leptina.

Por lo tanto, obtener las neuronas de este núcleo mediante disociación aguda es un método apropiado para identificar células orexigénicas, debido a las diferencias morfológicas entre ambos tipos celulares. Una vez identificada la presencia del péptido y la respuesta a la leptina, se estudiaron las características de la inhibición ejercida por esta hormona en las células disociadas.

### 7.3 La leptina disminuye la amplitud de la corriente producida por VDCCs

Con el objetivo de evaluar las características de inhibición de la corriente de calcio producida por la leptina, se registraron estas corrientes. Primero se realizó una curva dosis – respuesta para conocer la  $IC_{50}$  y el coeficiente de Hill de la hormona sobre la preparación. La leptina disminuye la amplitud de la corriente en neuronas dissociadas del ARC de manera dosis – dependiente. La  $IC_{50}$  fue de  $11.4 \pm 0.46$  nM, mientras que el coeficiente de Hill fue de  $0.47 \pm 0.004$ , como se muestra en la Fig. 7. Sin embargo, para obtener una mayor respuesta de inhibición de la corriente, se empleó una concentración de 30 nM de leptina, en acuerdo con otros trabajos previamente publicados (J.-H. Wang et al., 2008).

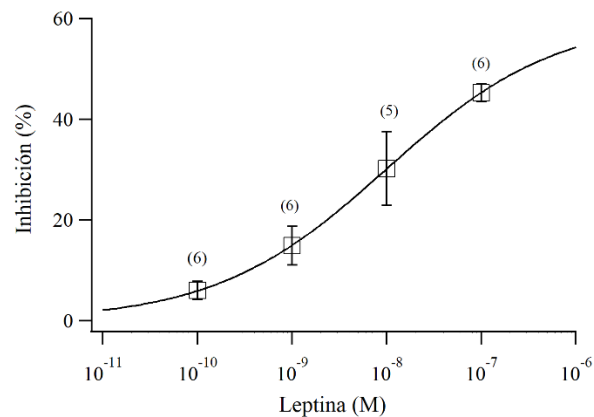


Figura 7. Curva dosis – respuesta de la inhibición producida por leptina. La leptina produce la inhibición de la corriente de forma dosis dependiente. Cada cuadrado representa el promedio de inhibición  $\pm$  SEM, en concentraciones de 0.1 a 100 nM. El número de células registradas se indica en cada punto. La línea representa el mejor ajuste mediante la Ecuación 1 a los datos.

Una vez obtenida la curva dosis–respuesta, se caracterizó la instalación del efecto de la leptina sobre la inhibición de la corriente de calcio. La corriente fue provocada mediante un pulso cuadrado despolarizante, de -80 a -10 mV y fue sensible a la inhibición de 100 mM de  $Cd^{2+}$ , como se muestra en la Fig. 8A. Posterior a la obtención de los trazos control y obtener una corriente estable, se agregó leptina (30 nM), la cual inhibe la amplitud de la corriente de calcio (Fig. 8B). Finalmente, se aprecia que esta inhibición se lleva a cabo a los 5 segundos de la aplicación, y que este efecto se mantiene en el tiempo, incluso al retirar la leptina de la solución de baño, como se muestra en el curso temporal (Fig. 8C).

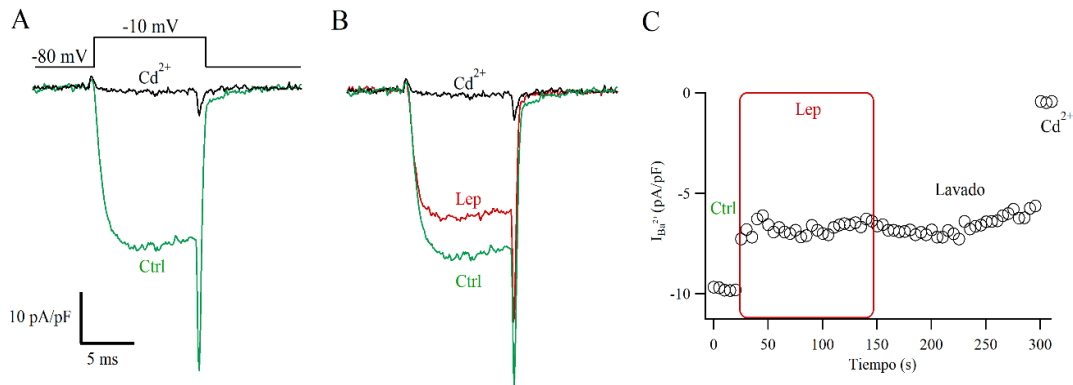


Figura 8. La leptina disminuye la amplitud de la corriente de calcio en células orexigénicas del ARC. A) Trazo representativo de un corriente de calcio en condiciones control (verde) y con Cd<sup>2+</sup> (negro). La corriente fue producida por medio de un pulso cuadrado, mostrado arriba del trazo. B) La amplitud de la corriente de calcio disminuye en presencia de 30 nM de leptina (rojo) en comparación con el trazo control (verde). C) Curso temporal representativo de la inhibición producida por leptina en neuronas orexigénicas del ARC.

Por lo tanto, podemos concluir que la leptina es una hormona que produce inhibición de la amplitud de la corriente de calcio de forma irreversible. De acuerdo con lo mencionado en la introducción y en la Fig. 6, el núcleo ARC también se compone de células anorexigénicas, las cuales aumentan la amplitud de su corriente de calcio en presencia de leptina. Este grupo celular también se logró identificar en las células registradas, las cuales son de tipo anorexigénico. Como se muestra en la Fig. 9A, la leptina aumenta la amplitud de la corriente; asimismo, se observa que el efecto de aumento de la corriente no se lava al retirar a la hormona de la solución externa (Fig. 9B). Las diferencias en el aumento de la corriente son estadísticamente significativas, en comparación con la amplitud en condiciones control. Los datos fueron analizados, y se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ( $*p \leq 0.05$ ). Finalmente, se muestra el aumento de la corriente de calcio en presencia de leptina en una relación corriente – voltaje (I-V). Este conjunto de datos, son un indicador adicional de que la zona en la cual se realizó la disección corresponde al núcleo ARC preferentemente; asimismo, muestra que las neuronas de este tipo se obtuvieron en menor proporción en comparación con las inhibidas por leptina, por lo que las diferencias morfológicas son un método apropiado para elegir entre células orexigénicas o anorexigénicas. Es relevante mencionar que estas células no fueron de interés en este estudio, ya que la vía por la cual aumentan la amplitud de la corriente ha sido más estudiada, y, por lo tanto, se conoce el mecanismo (Hill et al., 2008; J.-H. Wang et al., 2008), en comparación con las células orexigénicas inhibidas por leptina, cuyo mecanismo de inhibición se desconoce y son el objetivo de este estudio.

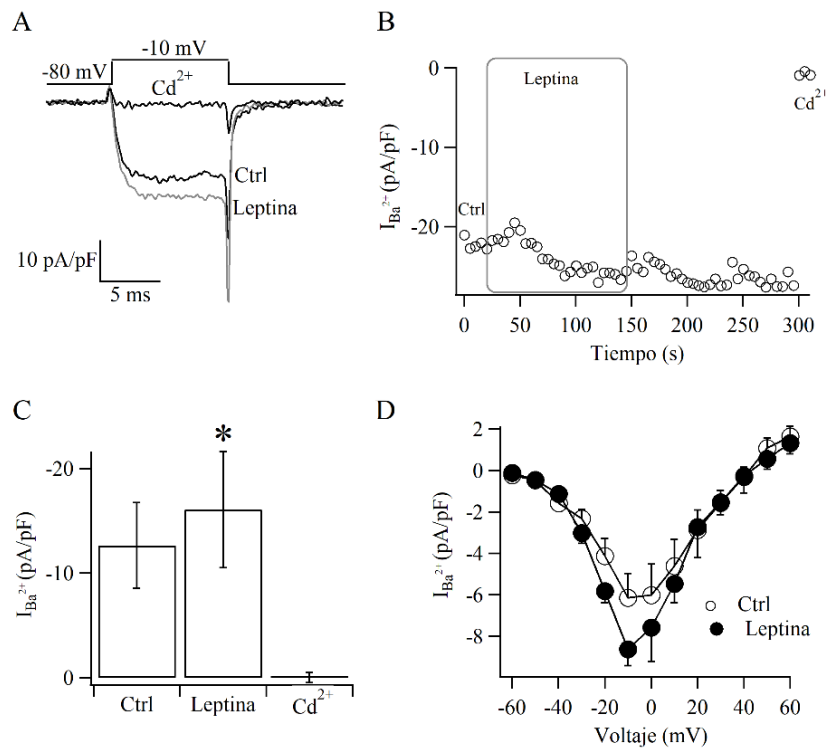


Figura 9. La leptina aumenta la amplitud de la corriente en neuronas anorexigénicas del ARC. A) Trazo representativo en condiciones control (Ctrl), en presencia de leptina y  $\text{Cd}^{2+}$ . B) Curso temporal representativo en control, con leptina, lavado y con  $\text{Cd}^{2+}$ . C) Las barras representan la media de la densidad de corriente  $\pm$  SEM. Los datos fueron analizados mediante la prueba de Wilcoxon ( $z = -21$ ,  $n=6$ ,  $*p \leq 0.05$ ). D) Relación corriente – voltaje en condiciones control y en presencia de leptina ( $n = 4$ ).

Una vez evaluado este efecto, y teniendo como indicador adicional que la leptina ejerce inhibición o aumento en la amplitud de la corriente, se evaluó si la leptina produce cambios en la dependencia al voltaje de los canales de calcio en células inhibidas por esta hormona.

#### 7.4 La leptina no modifica la dependencia al voltaje en las células orexigénicas del ARC

Una vez identificada la inhibición por parte de la leptina sobre la corriente de calcio, y con el objetivo de comparar la cinética de la corriente en condiciones control y durante la aplicación de leptina, se aplicó un pulso despolarizante largo de -80 a -10 mV durante 500 ms. Los trazos fueron normalizados y superpuestos para su comparación. La leptina no produce cambios en la cinética de la corriente, como se aprecia en la Fig. 10A. Para continuar con el análisis de los posibles cambios en la dependencia al voltaje por la leptina, se realizaron experimentos para mostrar si existía algún corrimiento en el voltaje ante pulsos despolarizantes por medio de la curva I-V.

La curva I-V fue evocada de -60 a + 60 mV, en incrementos de 10 mV durante 10 ms, los valores de la media obtenidos se observan en la Fig. 10B; posteriormente, se realizó un ajuste a los datos con la Ecuación 2. La inhibición por parte de la leptina fue estadísticamente significativa desde -10 a +20 mV, en ausencia de cambios en la dependencia al voltaje ( $V_{1/2}$   $17.14 \pm 0.004$  mV para Control,  $19.08 \pm 0.005$  mV para leptina,  $n = 10$ ;  $V_{Rev}$   $41.2 \pm 0.002$  para Control y  $37.6 \pm 0.002$  para leptina,  $n = 10$ ). Asimismo, se observa la presencia de un solo componente en la curva I-V, lo que sugiere preferentemente la presencia de canales de calcio HVA. La Fig. 10C muestra trazos representativos obtenidos de la curva I-V a +30, 0 y -10 mV, en condiciones control y con leptina, en los cuales se observa la disminución en la amplitud de la corriente producida por esta hormona. Con el objetivo de confirmar la dependencia al voltaje por parte de los canales registrados, se obtuvieron corrientes de calcio por medio de la aplicación de un protocolo de rampa, de -80 a + 60 mV (0.7 mV/ms), como se muestra en la Fig. 10D. Se observa un corrimiento en la corriente máxima a la izquierda, durante la aplicación de leptina, lo cual coincide con un corrimiento observado desde la obtención de la curva I-V (Fig. 10B); sin embargo, estos cambios no son estadísticamente significativos.

Finalmente, se examinaron las curvas de activación e inactivación. La curva de inactivación fue evocada en un rango de voltaje de -100 a +40 mV, en incrementos de 10 mV, desde un potencial de mantenimiento de -80 mV. La corriente al pico normalizada fue graficada en función del voltaje despolarizante y posteriormente la Ecuación 3 fue ajustada a los datos experimentales. Se obtuvo una  $V_{1/2}$  de  $-43.4 \text{ mV} \pm 0.004$  para la condición control y  $-34.6 \pm 0.002$  mV para la medición con leptina (Fig. 10E). Las curvas de activación se obtuvieron a partir de la cola de corriente de la curva I-V, a partir de un rango de voltaje de -60 a +60 mV. Posteriormente los datos fueron graficados y ajustados con la Ecuación 3. Para la curva de activación la  $V_{1/2}$  mostró diferencias estadísticamente significativas,  $-10.1 \pm 0.003$  para el control y  $-16.0 \pm 0.003$  mV con leptina. Los datos fueron analizados y se muestran diferencias significativas ( $*p \leq 0.05$ ). Por lo tanto, la leptina produce un corrimiento en la curva de activación hacia potenciales negativos de 6 mV.

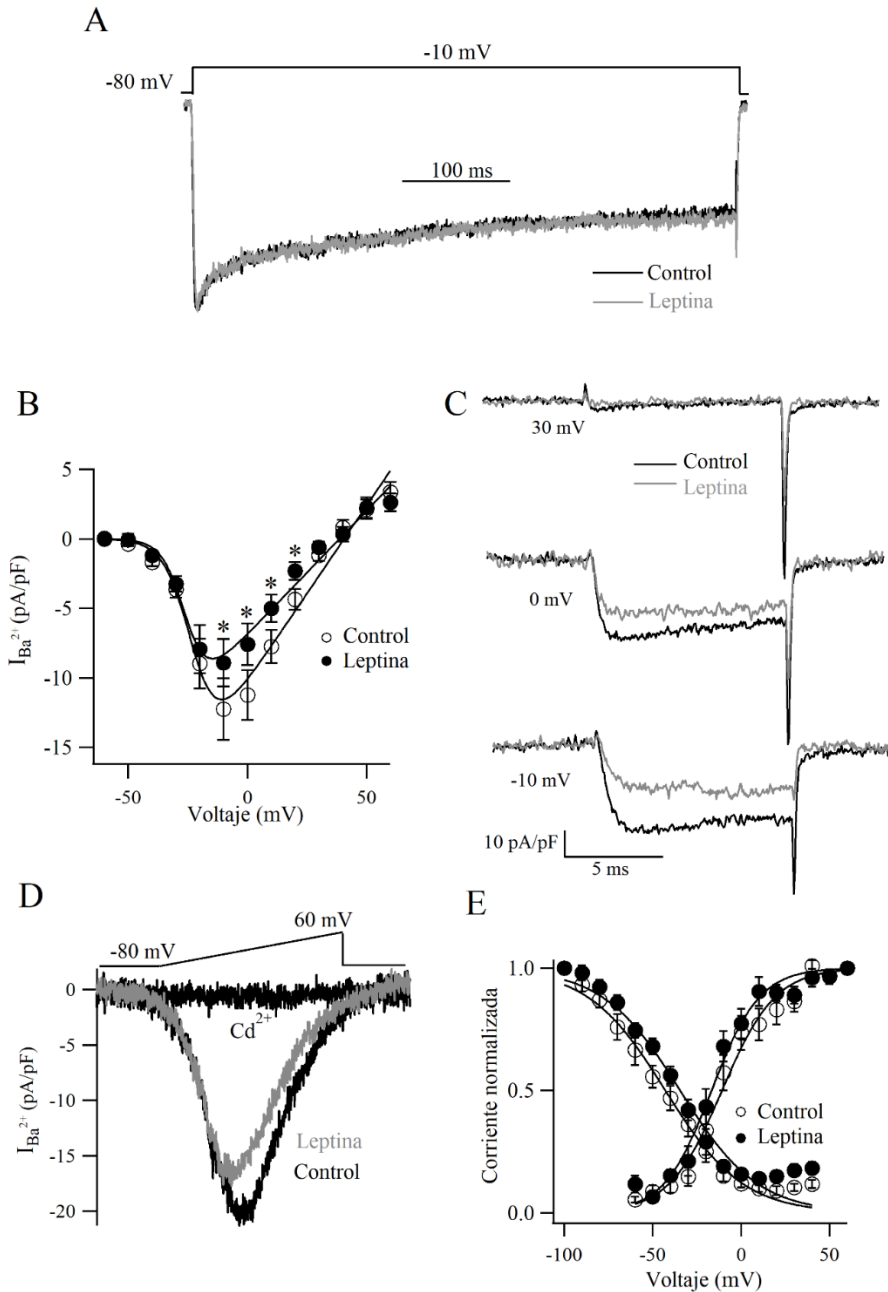


Figura 10. La leptina regula a la corriente de calcio en ausencia de modificaciones a la dependencia al voltaje. A) Corriente de calcio normalizada en control y en presencia de leptina, evocada mediante un pulso despolarizante largo (500 ms). B) Relación I-V en condiciones control y con leptina. La curva representa el mejor ajuste de la ecuación de Boltzmann modificada (Ecuación 2), y cada punto representa la media  $\pm$  SEM. Los datos fueron analizados mediante ANOVA de dos vías ( $F_{(1,9)} = 48.93$ ,  $n=10$ ,  $*p \leq 0.05$ ). C) Trazos representativos obtenidos de la curva I-V en condiciones control y con leptina a +30, 0 y -10 mV. D) Trazos representativos de corrientes control y con leptina obtenidas mediante un protocolo de rampa (0.7 mV/ms). E) Curvas de activación e inactivación en condiciones control (círculos blancos) y en presencia de leptina (círculos negros). Las líneas representan el mejor ajuste mediante la ecuación de Boltzmann (Ecuación 3). Cada punto representa la media  $\pm$  SEM. Los datos fueron analizados mediante la prueba de Wilcoxon ( $z = -26$ ,  $n=10$ ,  $*p \leq 0.05$ ).

La leptina produjo un corrimiento a la izquierda en la curva de activación hacia voltajes hiperpolarizantes de 6 mV; sin embargo, en la curva de inactivación I-V no se mostraron diferencias estadísticamente significativas en esta propiedad. Asimismo, en la curva de inactivación y al superponer los trazos en el pulso largo en ambas condiciones, no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

Como se observó previamente, la curva I-V mostró la presencia de un componente, por lo que el siguiente objetivo de este trabajo fue identificar mediante herramientas farmacológicas, el tipo de canales HVA que da lugar a la corriente de calcio en esta preparación.

#### 7.5 Caracterización farmacológica de los tipos de VDCCs presentes en neuronas orexigénicas del ARC

Uno de los objetivos planteados en este trabajo, fue examinar los subtipos de VDCCs presentes en este tipo celular. Para lograr este objetivo, se emplearon diversas toxinas, las cuales tienen mayor afinidad por ciertos tipos de VDCCs. Es importante resaltar que, para estos resultados, únicamente fueron consideradas las células que presentaron una inhibición de la corriente en presencia de leptina, la cual se realizó posterior a la aplicación de la toxina. Primero, se exploró la proporción de corriente producida por los canales tipo-L, mediante la aplicación de 5  $\mu$ M de nifedipina (Nif). Este compuesto, inhibe una proporción similar a la producida por leptina ( $43.75 \pm 7.4\%$ ), como se muestra en la Fig. 11A. La corriente se recuperó después del lavado, confirmando la naturaleza orexigénica de las células registradas, como se muestra en la Fig. 11B.  $\omega$ -Con GVIA (1  $\mu$ M) inhibió cerca de  $33.87 \pm 3.2\%$  de la corriente, revelando el componente formado por los canales tipo-N, posterior a la aplicación de la toxina, se aplicó a la leptina, y se muestra que la corriente se inhibe (Fig. 11C). Por otro lado, los fármacos  $\omega$ -Aga-IVA (500 nM) y SNX-482 (50 nM), inhibieron  $3.5 \pm 5.5\%$  y  $11.08 \pm 2.6\%$ , respectivamente, como se muestra en la Fig. 11D y E. Finalmente, se muestra que la corriente está formada predominantemente por el tipo-L y tipo-N, con poca contribución por parte de los canales P/Q y R, como se muestra en la Fig. 11F. Únicamente se probaron fármacos que permitieran caracterizar el componente HVA, con base en los resultados obtenidos previamente en las pruebas realizadas para explorar la dependencia al voltaje en estas células.

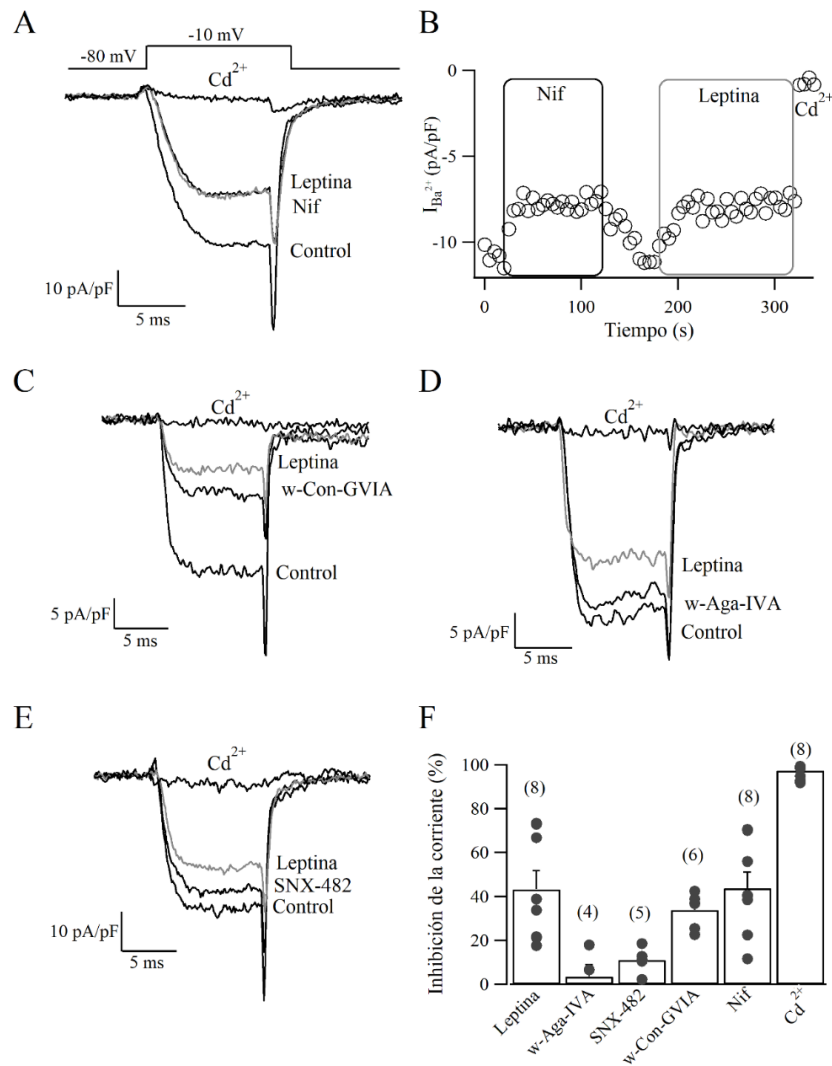


Figura 11. La leptina inhibe a la corriente tipo-L en neuronas orexigénicas del ARC. A) Trazos representativos de corriente de calcio en condiciones control, nifedipina, leptina y  $\text{Cd}^{2+}$ . La corriente fue evocada con un pulso cuadrado, el cual se observa sobre los trazos representativos. B) Curso temporal representativo en condiciones control, en presencia de nifedipina (Nif) y con leptina. C-E) Trazos representativos en condiciones control, leptina,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\omega$ -Con-GVIA,  $\omega$ -AGA-IVA y SNX-482, respectivamente. F) Inhibición de la corriente con las toxinas previamente mencionadas. Las barras representan la inhibición de la corriente de calcio (%) en cada condición. Los datos se presentan como la media  $\pm$  SEM, la  $n$  para cada condición es mostrada sobre las barras, los puntos representan los valores individuales.

Estos resultados sugieren que la leptina ejerce su efecto inhibitorio, predominantemente sobre los canales de calcio tipo-L, aunque no se descarta que también pueda regular a otros canales HVA, por lo que, para los siguientes experimentos, se emplearon registros con la corriente de calcio total.

El siguiente objetivo fue probar la participación de AMPK sobre la regulación de la corriente de calcio, así como su posible participación en la regulación de los VDCCs por leptina.



## 7.6 La leptina inhibe la amplitud de la corriente de calcio vía AMPK

Con el objetivo de identificar la participación de AMPK sobre la inhibición de la corriente de calcio, se realizaron experimentos en condiciones control y modificando la composición de la solución interna, al agregar un activador de AMPK, AICAR, o un inhibidor de la cinasa, Compuesto C. Antes de probar estos compuestos se valió el decaimiento de la corriente con la solución interna control, AICAR y Compuesto C en ausencia de leptina, con el objetivo de comprobar si por sí solos, estos compuestos regulan a los VDCCs. En la siguiente figura (Fig. 12) se muestra el promedio de registros realizados en las condiciones previamente mencionadas durante 300 s. En el curso temporal en condiciones control, se observa que la corriente permanece estable durante los 300 s, además de un escaso decaimiento de la corriente (Fig. 12A). Posteriormente, los registros se realizaron en presencia de Compuesto C, en los cuales se observa que en promedio la corriente comienza a decaer después de 100 s de registro, como se muestra en la Fig. 12B, este decaimiento es más evidente a los 300 s. Finalmente, la corriente fue registrada en presencia de AICAR, como se muestra en el curso temporal de la Fig. 12C, en la cual se observa un crecimiento en la amplitud de la corriente, que posteriormente se mantiene a lo largo del registro.

La corriente fue medida a los 150 y 300 s con el objetivo de obtener el decaimiento en la amplitud de la corriente a la mitad y hacia el final del registro. Como se muestra en la Fig. 12D, la corriente muestra una mayor proporción de decaimiento en presencia del Compuesto C, sobre todo a los 300 s del registro. De igual forma, la amplitud de la corriente al inicio del registro aumentó con AICAR, mientras que, con Compuesto C, la densidad de corriente es menor.

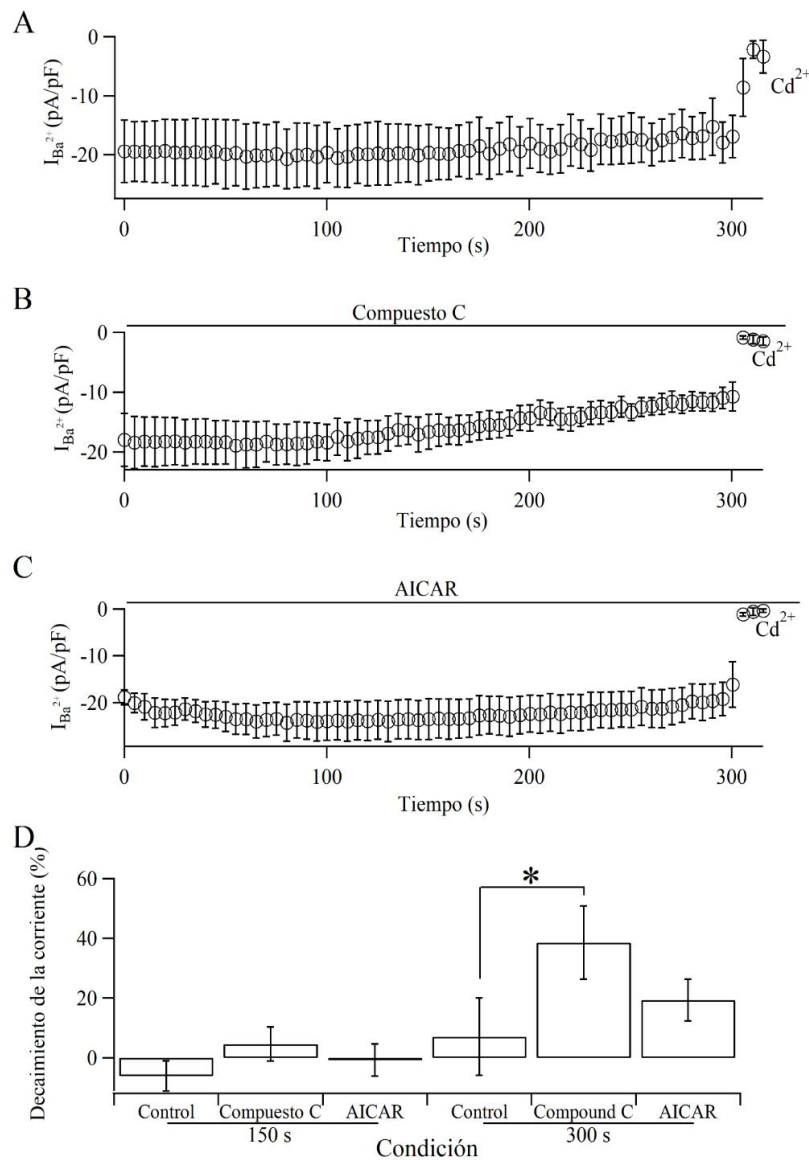


Figura 12. Regulación de AMPK sobre la corriente de calcio. A) Curso temporal obtenido con solución interna control (n = 4). B) Curso temporal obtenido en presencia de Compuesto C en la solución interna (n = 6). C) Curso temporal obtenido en presencia de AICAR (n = 6). D) Decaimiento de la corriente en las tres condiciones previamente mencionadas, medido a los 150 y 300 s. Las barras representan la media  $\pm$  SEM del decaimiento de la corriente. Los datos fueron analizados mediante ANOVA de dos vías con la prueba de Tukey como post hoc ( $F_{(1,13)} = 24.83$ ;  $*p \leq 0.05$ ).

Con base en estos resultados, se sugiere que ambos fármacos regulan de forma intrínseca la actividad de los VDCCs, por un lado, el Compuesto C produce un mayor decaimiento de la corriente, mientras que el AICAR disminuye este efecto. Una vez que la actividad de ambos fármacos se probó en condiciones control, se agregaron a la solución interna para evaluar el efecto con la leptina.

En condiciones control, la leptina inhibe la amplitud de la corriente de calcio  $34 \pm 5.07\%$  ( $*p \leq 0.05$ ). Posteriormente, se evaluó el efecto del Compuesto C, con el cual la inhibición ejercida por parte de la leptina se redujo a  $9.7 \pm 2.9\%$ , como se muestra en el curso temporal y en los trazos representativos de la Fig. 13 (C-D). De forma similar, el efecto de la leptina fue evaluado al agregar a la solución interna AICAR. En esta condición, la corriente de calcio permaneció con una amplitud de corriente similar a la condición control, produciendo una inhibición de  $11.14 \pm 2.3\%$  de la corriente, como se muestra en el curso temporal y los trazos representativos en la Fig. 13 (E-F). Asimismo, se realizaron experimentos con DMSO, ya que ambos reactivos fueron diluidos en este compuesto. No se observaron cambios en la inhibición producida por la leptina en presencia de DMSO, como se muestra en la Fig. 13G ( $*p \leq 0.05$ ). En resumen, los cambios producidos por la activación o inhibición de AMPK, ocluyen, en el caso de Compuesto C, o mimetizan, en el caso de AICAR, los efectos de esta hormona sobre la inhibición de la corriente de calcio. Estos cambios son estadísticamente significativos al compararlos con los resultados en condiciones control (Fig. 13G).

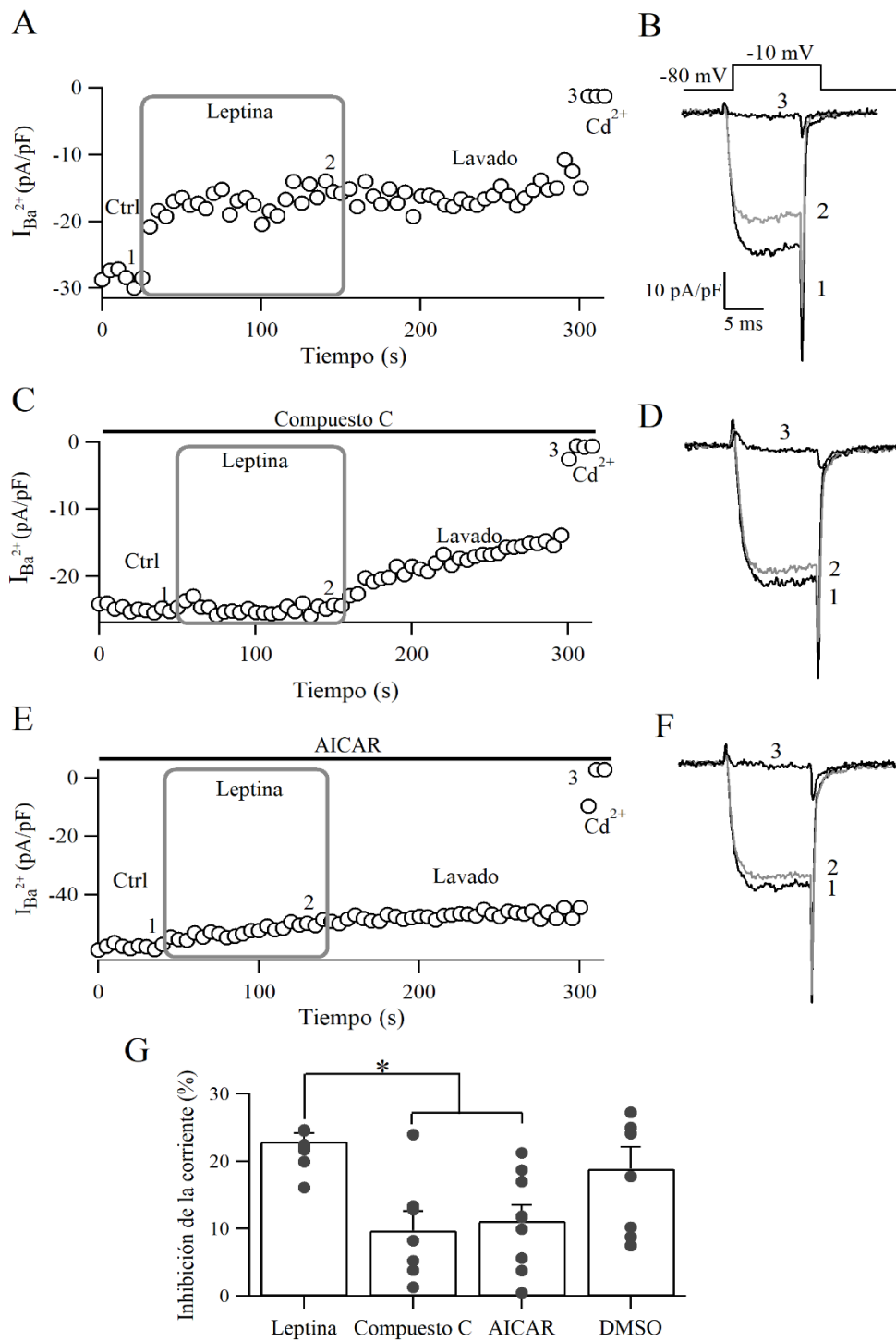


Figura 13. La leptina regula la amplitud de la corriente de calcio mediante AMPK en neuronas orexigénicas de rata. A-B) Curso temporal y trazos representativos en condiciones control (1), en presencia de leptina (2) y con  $\text{Cd}^{2+}$  (3), que muestran la inhibición producida por leptina con solución interna control. La corriente fue evocada con el protocolo que se muestra en la parte superior de los trazos. C-D) Curso temporal y trazos representativos en presencia de Compuesto C en la solución interna, en condiciones control (1), al agregar leptina (2) y con  $\text{Cd}^{2+}$  (3). E-F) Curso temporal y trazos representativos en presencia de AICAR en la solución interna, en condiciones control (1), al agregar leptina (2) y con  $\text{Cd}^{2+}$  (3). G) Porcentaje de inhibición, presentado como la media  $\pm$  SEM en cada condición. Los puntos representan los valores individuales. Los datos fueron analizados mediante la prueba estadística Kruskal-Wallis ( $\chi^2 = 12.94$ ,  $n = 9$  para leptina,  $n = 7$  para Compuesto C,  $n = 9$  para AICAR y  $n = 9$  para DMSO  $*p \leq 0.05$ ).

## 8. Discusión

La leptina contribuye al control metabólico y es uno de los factores que participa en la generación de saciedad del organismo. Las vías de señalización que regulan la actividad de los canales iónicos en presencia de esta hormona resultan determinantes para la activación de circuitos neuronales que influyen en la conducta de ingesta y el balance energético.

### 8.1 Identificación de neuronas del ARC por leptina y su efecto en la amplitud de la corriente de calcio

En este trabajo se muestra la colocalización del ObR con la expresión del NPY en el soma y las dendritas de una célula monopolar, como se muestra en la Fig. 6, en acuerdo con reportes previos (Ha et al, 2013). Las células que se consideraron para obtener los registros fueron monopolares y bipolares, como se muestra en la Fig. 5. Además de la morfología, se consideró la capacitancia y el efecto inhibitorio sobre la corriente de calcio. En conjunto, estas características permitieron diferenciar a las células orexigénicas del resto de la población.

La acción de la leptina es crítica para la actividad de los canales iónicos, que impacta en la sinapsis y la excitabilidad neuronal (Sohn, 2013). Clásicamente, la leptina hiperpolariza a las neuronas orexigénicas e inhibe a las anorexigénicas. Recientemente, Lee y cols (Lee et al., 2015) mostraron que esta hormona puede hiperpolarizar células anorexigénicas (POMC) mediante la inhibición de AMPK y el aumento en la liberación de GABA. Este efecto se encontró en condiciones de baja glucosa, lo que indica que la concentración extracelular de este monosacárido influye en la respuesta de la leptina, independiente del tipo celular. Sin embargo, el efecto de la leptina únicamente sobre la corriente de calcio ha permitido identificar el tipo neuronal del ARC. En este trabajo, cerca del 50% de las neuronas mostraron una inhibición de la amplitud de la corriente de calcio por leptina, lo que permite sugerir que son neuronas NPY/AgRp. Estas neuronas envían colaterales a células anorexigénicas, lo que produce que estas últimas estén inhibidas. Ante la activación del ObRb en las células orexigénicas disminuyen su actividad y la liberación de GABA (Rupp et al., 2018; Vong et al., 2011). En concordancia con estos resultados, se ha mostrado que en el ARC cerca del 40% de neuronas NPY y sensibles a ghrelina son inhibidas por leptina (Kohno et al., 2007). Estos hallazgos sugieren que esta población de células orexigénicas participa en la saciedad mediante la disminución de la liberación de NPY/AgRP y GABA. De esta manera, la leptina podría evitar el aumento en la conducta de ingesta y generar un balance energético.

Distintas hormonas regulan la actividad de AMPK. La ghrelina incrementa la concentración de calcio intracelular, la fosforilación de CaMKII y con ello, la fosforilación de Thr172 y el aumento en la actividad de AMPK (B. Wang & Cheng, 2018). En la actualidad AMPK ha surgido como un regulador molecular del efecto de la leptina (Andersen & Rasmussen, 2012; Lang & Föller, 2014). En este estudio, se propone a AMPK como pieza clave en la regulación de la inhibición producida por esta hormona anorexigénica. Se ha propuesto que la leptina regula la actividad de canales iónicos mediante la activación de PI3K, y en el caso de los VDCCs, mediante MAPK (Gavello et al., 2016; Kohno et al., 2007; J.-H. Wang et al., 2008). Los resultados de este trabajo muestran otra pieza clave de la regulación de la leptina, que es la inhibición de AMPK. Por lo tanto, los VDCCs regulan su actividad en las células orexigénicas mediante esta cinasa, que regula principalmente al canal de calcio tipo-L.

## 8.2 La leptina regula al canal de calcio tipo L sin cambios en la dependencia al voltaje

La leptina regula preferentemente al canal de calcio tipo-L, como se muestra en la Fig. 11, y en acuerdo con otros trabajos (Huang et al., 2015; J.-H. Wang et al., 2008). El canal tipo-L es blanco de la regulación por cinasas, tales como PKA y PKC (Kamp & Hell, 2000). Se ha mostrado que a través de la fosforilación en las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  del canal de calcio tipo-L, ambas cinasas producen un aumento en la amplitud de la corriente (Bray & Mynlieff, 2011; Bünemann et al., 1999; McHugh et al., 2000). En contraste, un proceso de desfosforilación puede resultar en la inhibición de la amplitud de la corriente de calcio tipo-L, sin cambios en la dependencia al voltaje (Mahapatra et al., 2012), tal como se mostró en este trabajo. Estos resultados sugieren que la actividad de AMPK es necesaria para mantener la amplitud de la corriente de calcio en neuronas orexigénicas. En presencia de leptina, AMPK es inhibida, lo que produce la reducción en la amplitud de la corriente de calcio.

## 8.3 Modulación de los canales de calcio por AMPK

AMPK modula la actividad de canales iónicos mediante fosforilación directa (Andersen & Rasmussen, 2012; Lang & Föller, 2014), lo que produce cambios en la cinética y amplitud de la corriente. Como se observa en la Fig. 12, la amplitud de la corriente en los VDCCs se modifica con el inhibidor (Fig. 12B) y el activador (Fig. 12C) de AMPK. En presencia de Compuesto C, la amplitud de la corriente disminuye desde los primeros pulsos, y se hace más evidente después de los primeros 100 s de registro. El efecto contrario se observa en presencia de AICAR, ya que la amplitud de la corriente aumenta en los primeros pulsos y se mantiene a

lo largo del registro. Por lo tanto, se sugiere que AMPK regula la actividad de los VDCCs de forma basal. AICAR ocluye la inhibición por leptina sobre los canales de calcio, mientras que esta respuesta es mimetizada por la aplicación del Compuesto C, como se muestra en la Fig. 13. Además de la inhibición de leptina sobre la amplitud de la corriente de calcio, se muestran otras características, como son: una respuesta inhibitoria dependiente de la concentración, la ausencia de la recuperación en la amplitud de la corriente posterior al lavado de la leptina y cambios mínimos en la dependencia al voltaje, como se muestra en la Fig. 10. Estos resultados indican que la regulación de la leptina sobre el canal es dependiente de un proceso de fosforilación.

El ObRb fosforila a la cinasa p70S6, que a su vez produce la fosforilación del residuo de Ser-491, ubicado en la subunidad  $\alpha$ -catalítica de AMPK (Dagon et al., 2012). Esta cascada produce la inhibición de AMPK y de esta forma, la leptina ejerce su efecto anorexigénico a nivel hipotalámico (Dagon et al., 2012; Minokoshi et al., 2004). La activación de esta vía impacta en la amplitud de la corriente de calcio, resultando en su inhibición, como se propone en la Fig. 14. Este efecto puede ser ocluido o mimetizado por la presencia de Compuesto C y de AICAR, respectivamente. La disminución en la amplitud de la corriente puede generarse de manera directa por la interacción AMPK-VDCCs, o bien, mediante algún otro tipo de proteína que funcione como intermediaria entre AMPK y los VDCCs.

En este trabajo, la concentración de glucosa extracelular usada en los registros es de 8 mM; es decir, que este valor está por encima de la concentración que se ha encontrado en el cerebro (3 – 5 mM) (Garduño et al., 2019; Routh et al., 2014); asimismo, la concentración de ATP (4 mM) fue la misma durante todos los registros. En estas condiciones, la tasa de intercambio AMP - ATP sería baja, con lo que la actividad de AMPK disminuiría. Otros trabajos han mostrado que la leptina modula la actividad de canales iónicos con concentraciones similares a las empleadas en este trabajo, e incluso mayores (20 mM de glucosa) (Huang et al., 2015; J.-H. Wang et al., 2008). En estas condiciones experimentales, se observa que una fracción de AMPK está disponible para activarse o inhibirse, de acuerdo con lo observado en los resultados con Compuesto C y AICAR (Fig. 12). La actividad de AMPK puede regularse independientemente del intercambio AMP-ATP, como es mediante la activación de CaMKII (Fogarty et al., 2010; Lin & Hardie, 2018b), la actividad de otras hormonas anorexigénicas (Minokoshi et al., 2008) y diacilglicerol (Jiang et al., 2016). Estas vías no canónicas, no fueron descartadas en este trabajo, por lo que alguna de ellas puede estar mediando la inhibición de los VDCCs.

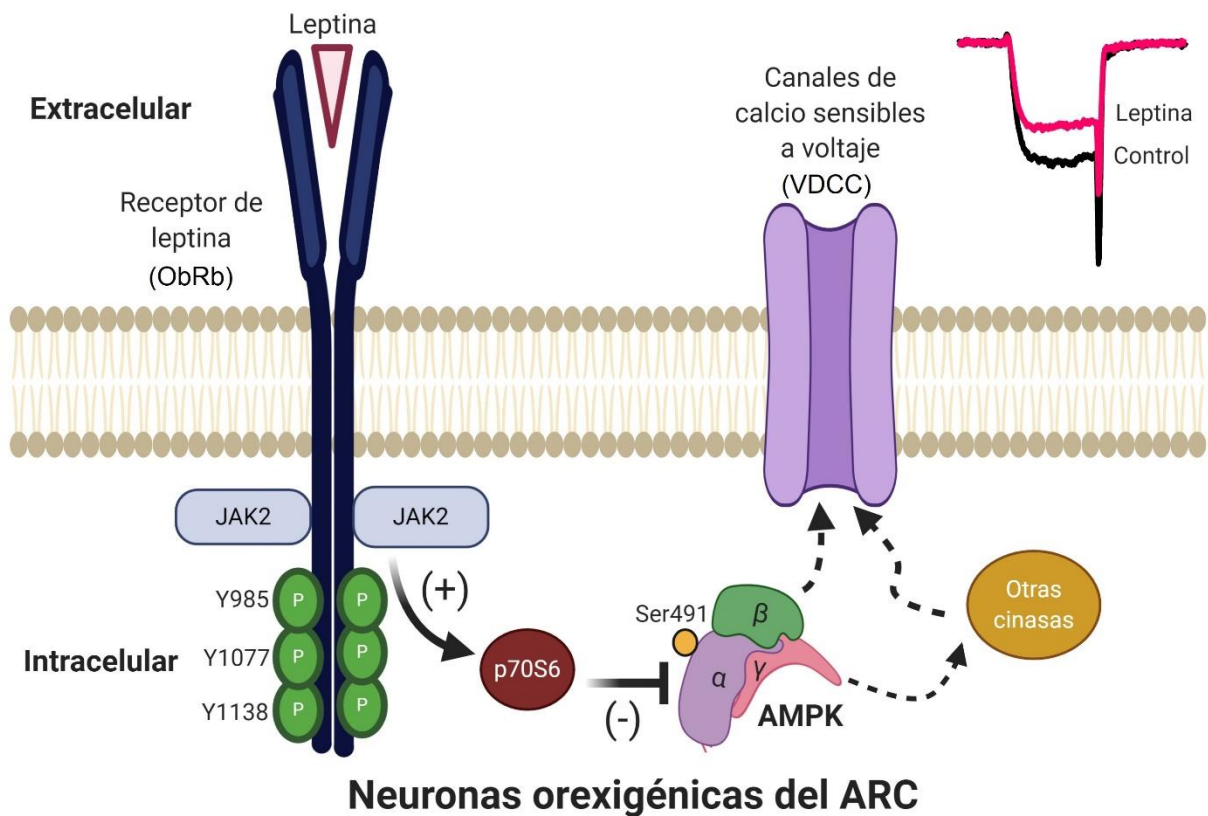


Figura. 14. Modelo explicativo sobre la inhibición del canal de calcio por leptina en neuronas orexigénicas de rata. Figura creada mediante BioRender.

La actividad de AMPK ha sido relacionada con la homeostasis energética, que en parte es modulada por hormonas. La leptina disminuye la liberación de AgRP/NPY en neuronas orexigénicas (Breen et al., 2005). Este efecto puede ser mediado por la disminución en la amplitud de la corriente de los VDCCs, que impacta en la actividad de los circuitos neuronales encargados de la conducta de ingesta y con ello en el balance energético, como se propone en la Fig. 15. Asimismo, la regulación de los canales de calcio tipo-L podría impactar en regulación génica de AgRP/NPY. La entrada de calcio a través de estas proteínas resulta crucial para una gran variedad de procesos, como son liberación de neurotransmisores, transmisión sináptica, homeostasis celular, excitabilidad, entre otras (Hille, 1986). Particularmente, los canales de calcio tipo-L están involucrados en la secreción de hormonas, señalización celular y regulación de la transcripción génica (Simms & Zamponi, 2014).



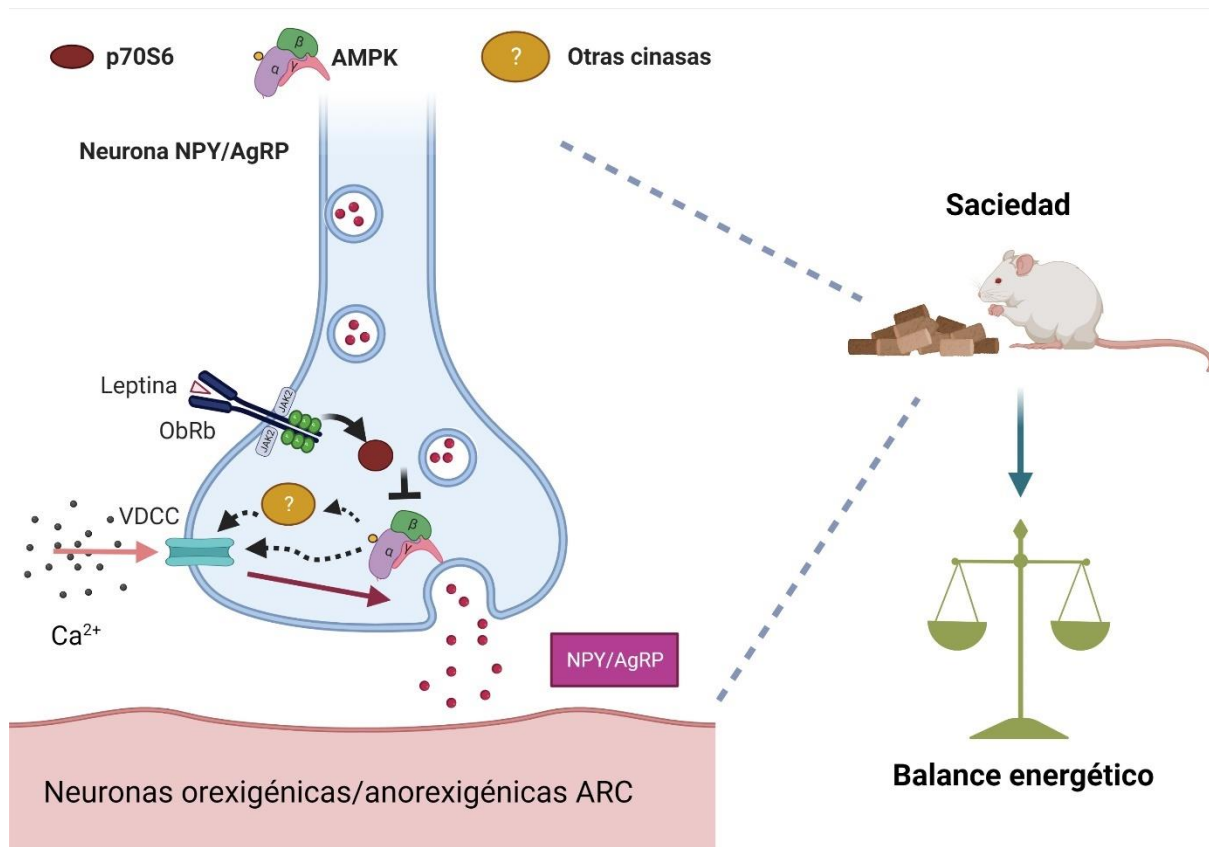


Figura 15. La leptina modula la actividad de AMPK y el balance energético. Figura creada mediante BioRender.

En los trastornos alimenticios se genera una desregulación de la actividad de AMPK y las hormonas que controlan el balance energético, como la ghrelina, la insulina y la leptina. En la obesidad, por ejemplo, se desarrolla una condición de resistencia a la insulina y a la leptina (Arch et al., 1998; Gruzdeva et al., 2019). En modelos de roedores que consumen una dieta alta en grasa, la leptina deja de inhibir a AMPK en el hipotálamo, lo que sugiere que contribuye al desarrollo de obesidad (Martin et al., 2006). En condiciones como anorexia, aumenta la liberación de péptidos vinculados con saciedad y disminuye la producción de péptidos orexigénicos (NPY/AgRP). Se ha encontrado evidencia de que estos cambios producen fallas en la actividad de AMPK, aunado a la presencia de factores de inflamación como  $TNF-\alpha$  e  $IL-1\beta$ , lo cual repercute en la conducta de ingesta (Ropelle et al., 2007). La actividad de AMPK es determinante en la regulación del estado energético de las células, y es la molécula que integra la información de la disponibilidad de energía del organismo. La actividad de esta cinasa repercute en la regulación de canales iónicos y con ello, en la actividad eléctrica de circuitos que regulan el balance energético.

## 9. Conclusiones

Los VDCCs son proteínas altamente reguladas por una serie de moléculas, tales como la leptina, la cual desempeña un papel clave en la regulación de la conducta de ingesta a nivel del núcleo ARC. En este trabajo se ha mostrado que:

- I. La leptina produce inhibición de la amplitud de la corriente de calcio en neuronas orexigénicas del ARC.
- II. La leptina produce cambios en la amplitud de la corriente de calcio sin corrimientos en el eje de voltaje y en ausencia de cambios en la cinética de la corriente.
- III. Las neuronas orexigénicas del ARC expresan preferentemente canales de calcio HVA.
- IV. La leptina ejerce su efecto inhibitorio predominantemente en los canales de calcio tipo-L.
- V. La leptina inhibe la corriente de calcio mediante la inhibición de AMPK. Este efecto se ocluye por la aplicación del Compuesto C, un inhibidor de AMPK, y se mimetiza por la aplicación de AICAR, un activador de AMPK.

## 10. Perspectivas

De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, se proponen las siguientes perspectivas:

- Evaluar el efecto de la leptina sobre las neuronas orexigénicas, modificando la concentración intracelular de ATP y de glucosa extracelular.
- Evaluar el mecanismo de regulación de AMPK sobre los VDCCs.
- Evaluar el efecto de leptina y AMPK en neuronas del ARC de animales con síndrome metabólico o diabetes tipo II.

## 11. Referencias

- Andersen, M. N., & Rasmussen, H. B. (2012). AMPK: A regulator of ion channels. *Communicative & Integrative Biology*, 5(5), 480-484.  
<https://doi.org/10.4161/cib.21200>
- 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>
- Angelucci, A., Clementi, L., & Alesse, E. (2020). Leptin in Tumor Microenvironment. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1259, 89-112.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-030-43093-1\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-030-43093-1_6)
- Aponte, Y., Atasoy, D., & Sternson, S. M. (2011). AGRP neurons are sufficient to orchestrate feeding behavior rapidly and without training. *Nature Neuroscience*, 14(3), 351-355.  
<https://doi.org/10.1038/nn.2739>
- Arch, J., Stock, M., & Trayhurn, P. (1998). Leptin resistance in obese humans: Does it exist and what does it mean? *International Journal of Obesity*, 22(12), 1159-1163.  
<https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0800779>
- Avelino-Cruz, J. E., Flores, A., Cebada, J., Mellon, P. L., Felix, R., & Monjaraz, E. (2009). Leptin increases L-type Ca<sup>2+</sup> channel expression and GnRH-stimulated LH release in LβT2 gonadotropes. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 298(1), 57-65.  
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.09.003>
- Bargas, J., Howe, A., Eberwine, J., Cao, Y., & Surmeier, D. J. (1994). Cellular and molecular characterization of Ca<sup>2+</sup> currents in acutely isolated, adult rat neostriatal neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 14(11 Pt 1), 6667-6686.

- Barquera, S., & White, M. (2018). Treating Obesity Seriously in Mexico: Realizing, Much Too Late, Action Must Be Immediate. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 26(10), 1530-1531. <https://doi.org/10.1002/oby.22296>
- Bates, S. H., Stearns, W. H., Dundon, T. A., Schubert, M., Tso, A. W. K., Wang, Y., Banks, A. S., Lavery, H. J., Haq, A. K., Maratos-Flier, E., Neel, B. G., Schwartz, M. W., & Myers, M. G. (2003). STAT3 signalling is required for leptin regulation of energy balance but not reproduction. *Nature*, 421(6925), 856-859. <https://doi.org/10.1038/nature01388>
- Bjørbaek, C., Elmquist, J. K., Frantz, J. D., Shoelson, S. E., & Flier, J. S. (1998). Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance. *Molecular Cell*, 1(4), 619-625. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80062-3](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80062-3)
- Björnholm, M., Münzberg, H., Leshan, R. L., Villanueva, E. C., Bates, S. H., Louis, G. W., Jones, J. C., Ishida-Takahashi, R., Bjørbaek, C., & Myers, M. G. (2007). Mice lacking inhibitory leptin receptor signals are lean with normal endocrine function. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(5), 1354-1360. <https://doi.org/10.1172/JCI30688>
- Bourinet, E., Stotz, S. C., Spaetgens, R. L., Dayanithi, G., Lemos, J., Nargeot, J., & Zamponi, G. W. (2001). Interaction of SNX482 with domains III and IV inhibits activation gating of alpha(1E) (Ca(V)2.3) calcium channels. *Biophysical Journal*, 81(1), 79-88.
- Bray, J. G., & Mynlieff, M. (2011). Involvement of PKC and PKA in the enhancement of L-type calcium current by GABAB receptor activation in neonatal hippocampus. *Neuroscience*, 179, 62-72. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.01.054>
- Breen, T. L., Conwell, I. M., & Wardlaw, S. L. (2005). Effects of fasting, leptin, and insulin on AGRP and POMC peptide release in the hypothalamus. *Brain Research*, 1032(1), 141-148. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.11.008>
- Bünemann, M., Gerhardstein, B. L., Gao, T., & Hosey, M. M. (1999). Functional Regulation of L-type Calcium Channels via Protein Kinase A-mediated Phosphorylation of the  $\beta$ 2

- Subunit. *Journal of Biological Chemistry*, 274(48), 33851-33854.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.274.48.33851>
- Cammisotto, P. G., & Bendayan, M. (2007). Leptin secretion by white adipose tissue and gastric mucosa. *Histology and Histopathology*, 22(2), 199-210.  
<https://doi.org/10.14670/HH-22.199>
- Castro, H., Bermeo, K., Arenas, I., & Garcia, D. E. (2020). Maintenance of CaV2.2 channel-current by PIP2 unveiled by neomycin in sympathetic neurons of the rat. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 682, 108261. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108261>
- Catterall, W. A. (2000). Structure and regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 16, 521-555.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.16.1.521>
- Catterall, William A. (2011). Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(8), a003947. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003947>
- Catterall, William A., Perez-Reyes, E., Snutch, T. P., & Striessnig, J. (2005). International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacological Reviews*, 57(4), 411-425.  
<https://doi.org/10.1124/pr.57.4.5>
- Clapham, D. E. (2007). Calcium Signaling. *Cell*, 131(6), 1047-1058.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.028>
- Cone, R. D., Cowley, M. A., Butler, A., Fan, W., Marks, D., & Low, M. (2001). The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. *International Journal of Obesity*. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0801913>
- Cone, Roger D. (2005). Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nature Neuroscience*, 8(5), 571-578. <https://doi.org/10.1038/nn1455>
- Crute, B. E., Seefeld, K., Gamble, J., Kemp, B. E., & Witters, L. A. (1998). Functional domains of the alpha1 catalytic subunit of the AMP-activated protein kinase. *The*

- Journal of Biological Chemistry*, 273(52), 35347-35354.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.273.52.35347>
- Cruzblanca, H., Koh, D.-S., & Hille, B. (1998). Bradykinin inhibits M current via phospholipase C and Ca<sup>2+</sup> release from IP<sub>3</sub>-sensitive Ca<sup>2+</sup> stores in rat sympathetic neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(12), 7151-7156.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.95.12.7151>
- Dagon, Y., Hur, E., Zheng, B., Wellenstein, K., Cantley, L. C., & Kahn, B. B. (2012). P70S6 kinase phosphorylates AMPK on serine 491 to mediate leptin's effect on food intake. *Cell Metabolism*, 16(1), 104-112. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.05.010>
- Dhar, M., Wayman, G. A., Zhu, M., Lambert, T. J., Davare, M. A., & Appleyard, S. M. (2014). Leptin-Induced Spine Formation Requires TrpC Channels and the CaM Kinase Cascade in the Hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, 34(30), 10022-10033. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2868-13.2014>
- DiBonaventura, M. D., Meincke, H., Le Lay, A., Fournier, J., Bakker, E., & Ehrenreich, A. (2017). Obesity in Mexico: Prevalence, comorbidities, associations with patient outcomes, and treatment experiences. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, 11, 1-10. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S129247>
- Dolphin, A. C. (2003). G protein modulation of voltage-gated calcium channels. *Pharmacological Reviews*, 55(4), 607-627. <https://doi.org/10.1124/pr.55.4.3>
- Dolphin, A. C. (2018). Voltage-gated calcium channel  $\alpha 2\delta$  subunits: An assessment of proposed novel roles. *F1000Research*, 7.  
<https://doi.org/10.12688/f1000research.16104.1>
- 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. *The Journal of Comparative Neurology*, 395(4), 535-547.

- Fogarty, S., Hawley, S. A., Green, K. A., Saner, N., Mustard, K. J., & Hardie, D. G. (2010). Calmodulin-dependent protein kinase kinase- $\beta$  activates AMPK without forming a stable complex: Synergistic effects of Ca<sup>2+</sup> and AMP. *Biochemical Journal*, 426(Pt 1), 109-118. <https://doi.org/10.1042/BJ20091372>
- Föller, M., Jaumann, M., Dettling, J., Saxena, A., Pakladok, T., Munoz, C., Ruth, P., Sopjani, M., Seebohm, G., Rüttiger, L., Knipper, M., & Lang, F. (2012). AMP-activated protein kinase in BK-channel regulation and protection against hearing loss following acoustic overstimulation. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 26(10), 4243-4253. <https://doi.org/10.1096/fj.12-208132>
- Frederich, R. C., Hamann, A., Anderson, S., Löllmann, B., Lowell, B. B., & Flier, J. S. (1995). Leptin levels reflect body lipid content in mice: Evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nature Medicine*, 1(12), 1311-1314. <https://doi.org/10.1038/nm1295-1311>
- Frühbeck, G. (2006). Intracellular signalling pathways activated by leptin. *The Biochemical Journal*, 393(Pt 1), 7-20. <https://doi.org/10.1042/BJ20051578>
- Garcia, D. E., Brown, S., Hille, B., & Mackie, K. (1998). Protein Kinase C Disrupts Cannabinoid Actions by Phosphorylation of the CB1 Cannabinoid Receptor. *Journal of Neuroscience*, 18(8), 2834-2841. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-08-02834.1998>
- Garduño, J., Hernández-López, S., Rolón, D. C., de la Cruz, L., Hernández-Vázquez, F., Reyes-Vaca, A., Arenas, I., Bravo-Martínez, J., & Garcia, D. E. (2019). Electrophysiological characterization of glucose sensing neurons in the hypothalamic arcuate nucleus of male rats. *Neuroscience Letters*, 703, 168-176. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.03.041>

- Gavello, D., Carbone, E., & Carabelli, V. (2016). Leptin-mediated ion channel regulation: PI3K pathways, physiological role, and therapeutic potential. *Channels (Austin, Tex.)*, *10*(4), 282-296. <https://doi.org/10.1080/19336950.2016.1164373>
- Gong, L., Yao, F., Hockman, K., Heng, H. H., Morton, G. J., Takeda, K., Akira, S., Low, M. J., Rubinstein, M., & MacKenzie, R. G. (2008). Signal Transducer and Activator of Transcription-3 Is Required in Hypothalamic Agouti-Related Protein/Neuropeptide Y Neurons for Normal Energy Homeostasis. *Endocrinology*, *149*(7), 3346-3354. <https://doi.org/10.1210/en.2007-0945>
- Gruzdeva, O., Borodkina, D., Uchasova, E., Dyleva, Y., & Barbarash, O. (2019). Leptin resistance: Underlying mechanisms and diagnosis. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, *12*, 191-198. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S182406>
- Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., & Sigworth, F. J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv*, *391*(2), 85-100. <https://doi.org/10.1007/BF00656997>
- Hardie, D. G. (2007). AMP-activated/SNF1 protein kinases: Conserved guardians of cellular energy. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *8*(10), 774-785. <https://doi.org/10.1038/nrm2249>
- Hawley, S. A., Pan, D. A., Mustard, K. J., Ross, L., Bain, J., Edelman, A. M., Frenguelli, B. G., & Hardie, D. G. (2005). Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell Metabolism*, *2*(1), 9-19. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.05.009>
- Hernández-Cruz, A., & Pape, H. C. (1989). Identification of two calcium currents in acutely dissociated neurons from the rat lateral geniculate nucleus. *Journal of Neurophysiology*, *61*(6), 1270-1283. <https://doi.org/10.1152/jn.1989.61.6.1270>



- Hernández-Flores, T., Hernández-González, O., Pérez-Ramírez, M. B., Lara-González, E., Arias-García, M. A., Duhne, M., Pérez-Burgos, A., Prieto, G. A., Figueroa, A., Galarraga, E., & Bargas, J. (2015). Modulation of direct pathway striatal projection neurons by muscarinic M<sub>4</sub>-type receptors. *Neuropharmacology*, *89*, 232-244. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.09.028>
- Hill, J. W., Williams, K. W., Ye, C., Luo, J., Balthasar, N., Coppari, R., Cowley, M. A., Cantley, L. C., Lowell, B. B., & Elmquist, J. K. (2008). Acute effects of leptin require PI3K signaling in hypothalamic proopiomelanocortin neurons in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, *118*(5), 1796-1805. <https://doi.org/10.1172/JCI32964>
- Hille, B. (1986). Ionic channels: Molecular pores of excitable membranes. *Harvey Lectures*, *82*, 47-69.
- Hsueh, H., He, Y., Kastin, A. J., Tu, H., Markadakis, E. N., Rogers, R. C., Fossier, P. B., & Pan, W. (2009). Obesity induces functional astrocytic leptin receptors in hypothalamus. *Brain: A Journal of Neurology*, *132*(Pt 4), 889-902. <https://doi.org/10.1093/brain/awp029>
- Huang, C. C. Y., Shi, L., Lin, C.-H., Kim, A. J., Ko, M. L., & Ko, G. Y.-P. (2015). A new role for AMP-activated protein kinase in the circadian regulation of L-type voltage-gated calcium channels in late-stage embryonic retinal photoreceptors. *Journal of Neurochemistry*, *135*(4), 727-741. <https://doi.org/10.1111/jnc.13349>
- Huisman, C., Cho, H., Brock, O., Lim, S. J., Youn, S. M., Park, Y., Kim, S., Lee, S.-K., Delogu, A., & Lee, J. W. (2019). Single cell transcriptome analysis of developing arcuate nucleus neurons uncovers their key developmental regulators. *Nature Communications*, *10*(1), 3696. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11667-y>
- Jiang, L. Q., de Castro Barbosa, T., Massart, J., Deshmukh, A. S., Löfgren, L., Duque-Guimaraes, D. E., Ozilgen, A., Osler, M. E., Chibalin, A. V., & Zierath, J. R. (2016). Diacylglycerol kinase- $\delta$  regulates AMPK signaling, lipid metabolism, and skeletal

- muscle energetics. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 310(1), E51-E60. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00209.2015>
- Kamp, T. J., & Hell, J. W. (2000). Regulation of cardiac L-type calcium channels by protein kinase A and protein kinase C. *Circulation Research*, 87(12), 1095-1102. <https://doi.org/10.1161/01.res.87.12.1095>
- Kohno, D., Nakata, M., Maekawa, F., Fujiwara, K., Maejima, Y., Kuramochi, M., Shimazaki, T., Okano, H., Onaka, T., & Yada, T. (2007). Leptin Suppresses Ghrelin-Induced Activation of Neuropeptide Y Neurons in the Arcuate Nucleus via Phosphatidylinositol 3-Kinase- and Phosphodiesterase 3-Mediated Pathway. *Endocrinology*, 148(5), 2251-2263. <https://doi.org/10.1210/en.2006-1240>
- Kohno, D., & Yada, T. (2012). Arcuate NPY neurons sense and integrate peripheral metabolic signals to control feeding. *Neuropeptides*, 46(6), 315-319. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2012.09.004>
- Kong, D., Dagon, Y., Campbell, J. N., Guo, Y., Yang, Z., Yi, X., Aryal, P., Wellenstein, K., Kahn, B. B., Sabatini, B. L., & Lowell, B. B. (2016). A Postsynaptic AMPK→p21-Activated Kinase Pathway Drives Fasting-Induced Synaptic Plasticity in AgRP Neurons. *Neuron*, 91(1), 25-33. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.05.025>
- Kwon, O., Kim, K. W., & Kim, M.-S. (2016). Leptin signalling pathways in hypothalamic neurons. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 73(7), 1457-1477. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2133-1>
- Lang, F., & Föller, M. (2014). Regulation of ion channels and transporters by AMP-activated kinase (AMPK). *Channels*, 8(1), 20-28. <https://doi.org/10.4161/chan.27423>
- Lazzarino, G. P., Acutain, M. F., Canesini, G., Andreoli, M. F., & Ramos, J. G. (2019). Cafeteria diet induces progressive changes in hypothalamic mechanisms involved in food intake control at different feeding periods in female rats. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 498, 110542. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2019.110542>

- Lee, D. K., Jeong, J. H., Chun, S.-K., Chua, S., & Jo, Y.-H. (2015). Interplay between glucose and leptin signalling determines the strength of GABAergic synapses at POMC neurons. *Nature Communications*, 6, 6618. <https://doi.org/10.1038/ncomms7618>
- Lin, S.-C., & Hardie, D. G. (2018a). 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>
- Lin, S.-C., & Hardie, D. G. (2018b). 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>
- Llinás, R. R., Sugimori, M., & Cherksey, B. (1989). Voltage-Dependent Calcium Conductances in Mammalian Neurons. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 560(1), 103-111. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1989.tb24084.x>
- Mahapatra, S., Marcantoni, A., Zuccotti, A., Carabelli, V., & Carbone, E. (2012). Equal sensitivity of Cav1.2 and Cav1.3 channels to the opposing modulations of PKA and PKG in mouse chromaffin cells. *The Journal of Physiology*, 590(Pt 20), 5053-5073. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.236729>
- 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. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(28), 18933-18941. <https://doi.org/10.1074/jbc.M512831200>
- McHugh, D., Sharp, E. M., Scheuer, T., & Catterall, W. A. (2000). Inhibition of cardiac L-type calcium channels by protein kinase C phosphorylation of two sites in the N-terminal domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(22), 12334-12338. <https://doi.org/10.1073/pnas.210384297>
- Minokoshi, Y., Alquier, T., Furukawa, N., Kim, Y.-B., Lee, A., Xue, B., Mu, J., Fougelle, 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>

- Minokoshi, Y., Shiuchi, T., Lee, S., Suzuki, A., & Okamoto, S. (2008). Role of hypothalamic AMP-kinase in food intake regulation. *Nutrition*, *24*(9), 786-790.  
<https://doi.org/10.1016/j.nut.2008.06.002>
- Mountjoy, P. D., Bailey, S. J., & Rutter, G. A. (2007). Inhibition by glucose or leptin of hypothalamic neurons expressing neuropeptide Y requires changes in AMP-activated protein kinase activity. *Diabetologia*, *50*(1), 168-177. <https://doi.org/10.1007/s00125-006-0473-3>
- Münzberg, H., & Morrison, C. D. (2015). Structure, production and signaling of leptin. *Metabolism: Clinical and Experimental*, *64*(1), 13-23.  
<https://doi.org/10.1016/j.metabol.2014.09.010>
- Nowycky, M. C., Fox, A. P., & Tsien, R. W. (1985). Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature*, *316*(6027), 440-443.  
<https://doi.org/10.1038/316440a0>
- Pan, W., Allison, M. B., Sabatini, P., Rupp, A., Adams, J., Patterson, C., Jones, J. C., Olson, D. P., & Myers, M. G. (2019). Transcriptional and physiological roles for STAT proteins in leptin action. *Molecular Metabolism*, *22*, 121-131.  
<https://doi.org/10.1016/j.molmet.2019.01.007>
- Pérez-Pérez, A., Vilariño-García, T., Fernández-Riejos, P., Martín-González, J., Segura-Egea, J. J., & Sánchez-Margalet, V. (2017). Role of leptin as a link between metabolism and the immune system. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, *35*, 71-84.  
<https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2017.03.001>
- Perry, B., & Wang, Y. (2012). Appetite regulation and weight control: The role of gut hormones. *Nutrition & Diabetes*, *2*(1), e26-e26. <https://doi.org/10.1038/nutd.2011.21>
- Romanova, I. V., Derkach, K. V., Mikhrina, A. L., Sukhov, I. B., Mikhailova, E. V., & Shpakov, A. O. (2018). The Leptin, Dopamine and Serotonin Receptors in

- Hypothalamic POMC-Neurons of Normal and Obese Rodents. *Neurochemical Research*, 43(4), 821-837. <https://doi.org/10.1007/s11064-018-2485-z>
- Ropelle, E. R., Pauli, J. R., Zecchin, K. G., Ueno, M., de Souza, C. T., Morari, J., Faria, M. C., Velloso, L. A., Saad, M. J. A., & Carvalheira, J. B. C. (2007). A Central Role for Neuronal Adenosine 5'-Monophosphate-Activated Protein Kinase in Cancer-Induced Anorexia. *Endocrinology*, 148(11), 5220-5229. <https://doi.org/10.1210/en.2007-0381>
- Routh, V. H., Hao, L., Santiago, A. M., Sheng, Z., & Zhou, C. (2014). Hypothalamic glucose sensing: Making ends meet. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 8, 236. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2014.00236>
- Rupp, A. C., Allison, M. B., Jones, J. C., Patterson, C. M., Faber, C. L., Bozadjieva, N., Heisler, L. K., Seeley, R. J., Olson, D. P., & Myers, M. G. (2018). Specific subpopulations of hypothalamic leptin receptor-expressing neurons mediate the effects of early developmental leptin receptor deletion on energy balance. *Molecular Metabolism*, 14, 130-138. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.06.001>
- Saklayen, M. G. (2018). The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. *Current Hypertension Reports*, 20(2). <https://doi.org/10.1007/s11906-018-0812-z>
- Schwartz, M. W., & Morton, G. J. (2002). Keeping hunger at bay. *Nature*, 418(6898), 595-597. <https://doi.org/10.1038/418595a>
- Shanley, L. J., Irving, A. J., & Harvey, J. (2001). Leptin enhances NMDA receptor function and modulates hippocampal synaptic plasticity. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 21(24), RC186.
- Shanley, L. J., O'Malley, D., Irving, A. J., Ashford, M. L., & Harvey, J. (2002). Leptin inhibits epileptiform-like activity in rat hippocampal neurones via PI 3-kinase-driven activation of BK channels. *The Journal of Physiology*, 545(3), 933-944. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.029488>

- Shaw, R. J., Kosmatka, M., Bardeesy, N., Hurley, R. L., Witters, L. A., DePinho, R. A., & Cantley, L. C. (2004). The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(10), 3329-3335. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308061100>
- Shen, K.-Z., Yakhnitsa, V., Munhall, A. C., & Johnson, S. W. (2014). AMP kinase regulates K-ATP currents evoked by NMDA receptor stimulation in rat subthalamic nucleus neurons. *Neuroscience*, *274*, 138-152. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.05.031>
- Shioda, S., Funahashi, H., Nakajo, S., Yada, T., Maruta, O., & Nakai, Y. (1998). Immunohistochemical localization of leptin receptor in the rat brain. *Neuroscience Letters*, *243*(1-3), 41-44. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(98\)00082-2](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(98)00082-2)
- Simms, B. A., & Zamponi, G. W. (2014). Neuronal voltage-gated calcium channels: Structure, function, and dysfunction. *Neuron*, *82*(1), 24-45. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.03.016>
- Sohn, J.-W. (2013). Ion channels in the central regulation of energy and glucose homeostasis. *Frontiers in Neuroscience*, *7*, 85. <https://doi.org/10.3389/fnins.2013.00085>
- Sohn, J.-W. (2015). Network of hypothalamic neurons that control appetite. *BMB Reports*, *48*(4), 229-233. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2015.48.4.272>
- Sohn, J.-W., Elmquist, J. K., & Williams, K. W. (2013). Neuronal circuits that regulate feeding behavior and metabolism. *Trends in Neurosciences*, *36*(9), 504-512. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.05.003>
- Spanswick, D., Smith, M. A., Groppi, V. E., Logan, S. D., & Ashford, M. L. (1997). Leptin inhibits hypothalamic neurons by activation of ATP-sensitive potassium channels. *Nature*, *390*(6659), 521-525. <https://doi.org/10.1038/37379>

- Su, H., Jiang, L., Carter-Su, C., & Rui, L. (2012). Glucose enhances leptin signaling through modulation of AMPK activity. *PLoS One*, 7(2), e31636.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031636>
- Suh, B.-C., Leal, K., & Hille, B. (2010). Modulation of High-Voltage Activated Ca<sup>2+</sup> Channels by Membrane Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate. *Neuron*, 67(2), 224-238. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.07.001>
- Tahergorabi, Z., & Khazaei, M. (2015). Leptin and its cardiovascular effects: Focus on angiogenesis. *Advanced Biomedical Research*, 4, 79. <https://doi.org/10.4103/2277-9175.156526>
- 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: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 35(2), 474-484. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1828-14.2015>
- Tartaglia, L. A., Dembski, M., Weng, X., Deng, N., Culpepper, J., Devos, R., Richards, G. J., Campfield, L. A., Clark, F. T., Deeds, J., Muir, C., Sanker, S., Moriarty, A., Moore, K. J., Smutko, J. S., Mays, G. G., Wool, E. A., Monroe, C. A., & Tepper, R. I. (1995). Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell*, 83(7), 1263-1271. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90151-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90151-5)
- Tschöp, M., Smiley, D. L., & Heiman, M. L. (2000). Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature*, 407(6806), 908-913. <https://doi.org/10.1038/35038090>
- Tsien, R. W., Lipscombe, D., Madison, D. V., Bley, K. R., & Fox, A. P. (1988). Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation. *Trends in Neurosciences*, 11(10), 431-438. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(88\)90194-4](https://doi.org/10.1016/0166-2236(88)90194-4)

- Udagawa, J., Hatta, T., Hashimoto, R., & Otani, H. (2007). Roles of leptin in prenatal and perinatal brain development. *Congenital Anomalies*, 47(3), 77-83.  
<https://doi.org/10.1111/j.1741-4520.2007.00150.x>
- van den Pol, A. N., Acuna, C., Davis, J. N., Huang, H., & Zhang, X. (2019). Defining the caudal hypothalamic arcuate nucleus with a focus on anorexic excitatory neurons. *The Journal of Physiology*, 597(6), 1605-1625. <https://doi.org/10.1113/JP277152>
- Vong, L., Ye, C., Yang, Z., Choi, B., Chua, S., & Lowell, B. B. (2011). Leptin action on GABAergic neurons prevents obesity and reduces inhibitory tone to POMC neurons. *Neuron*, 71(1), 142-154. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.05.028>
- Wang, B., & Cheng, K. K.-Y. (2018). Hypothalamic AMPK as a Mediator of Hormonal Regulation of Energy Balance. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11). <https://doi.org/10.3390/ijms19113552>
- Wang, J.-H., Wang, F., Yang, M.-J., Yu, D.-F., Wu, W.-N., Liu, J., Ma, L.-Q., Cai, F., & Chen, J.-G. (2008). Leptin regulated calcium channels of neuropeptide Y and proopiomelanocortin neurons by activation of different signal pathways. *Neuroscience*, 156(1), 89-98. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.04.079>
- Wautman, J., Zabeau, L., & Tavernier, J. (2017). The Leptin Receptor Complex: Heavier Than Expected? *Frontiers in Endocrinology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00030>
- White, D. W., & Tartaglia, L. A. (1999). Evidence for ligand-independent homo-oligomerization of leptin receptor (OB-R) isoforms: A proposed mechanism permitting productive long-form signaling in the presence of excess short-form expression. *Journal of Cellular Biochemistry*, 73(2), 278-288.
- Wu, Y., Shyng, S.-L., & Chen, P.-C. (2015). Concerted Trafficking Regulation of Kv2.1 and KATP Channels by Leptin in Pancreatic  $\beta$ -Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 290(50), 29676-29690. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.670877>



- Yaari, Y., Hamon, B., & Lux, H. D. (1987). Development of two types of calcium channels in cultured mammalian hippocampal neurons. *Science (New York, N.Y.)*, 235(4789), 680-682. <https://doi.org/10.1126/science.2433765>
- Yaswen, L., Diehl, N., Brennan, M. B., & Hochgeschwender, U. (1999). Obesity in the mouse model of pro-opiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin. *Nature Medicine*, 5(9), 1066-1070. <https://doi.org/10.1038/12506>
- Zhang, F., Basinski, M. B., Beals, J. M., Briggs, S. L., Churgay, L. M., Clawson, D. K., DiMarchi, R. D., Furman, T. C., Hale, J. E., Hsiung, H. M., Schoner, B. E., Smith, D. P., Zhang, X. Y., Wery, J. P., & Schevitz, R. W. (1997). Crystal structure of the obese protein leptin-E100. *Nature*, 387(6629), 206-209. <https://doi.org/10.1038/387206a0>
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., & Friedman, J. M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372(6505), 425-432. <https://doi.org/10.1038/372425a0>
- Zhang, Yiyi, & Chua, S. (2017). Leptin Function and Regulation. *Comprehensive Physiology*, 8(1), 351-369. <https://doi.org/10.1002/cphy.c160041>
- Zhang, Y.-L., Guo, H., Zhang, C.-S., Lin, S.-Y., Yin, Z., Peng, Y., Luo, H., Shi, Y., Lian, G., Zhang, C., Li, M., Ye, Z., Ye, J., Han, J., Li, P., Wu, J.-W., & Lin, S.-C. (2013). AMP as a low-energy charge signal autonomously initiates assembly of AXIN-AMPK-LKB1 complex for AMPK activation. *Cell Metabolism*, 18(4), 546-555. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.09.005>