



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

Profesor Patrocinante

Dr. Felipe Barros O.

Centro de Estudios Científicos

CECs

Profesor Co-Patrocinante

Dr. Alejandro Reyes

Instituto de Bioquímica y

Microbiología

Facultad de Ciencias

**TRANSPORTE DE PIRUVATO EN ASTROCITOS EN REPOSO Y
BAJO ESTIMULACIÓN POR POTASIO: PARTICIPACIÓN DE
MÚLTIPLES VÍAS DE PERMEACIÓN**

Tesis de Grado presentada como parte
de los requisitos para optar al grado de
Licenciado en Bioquímica y Título
Profesional de *Bioquímico*

PAMELA JAVIERA GARRIDO GERTER

VALDIVIA – CHILE

2015

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todas las personas que participaron en esta etapa importante, enfatizando a mi familia, mis padres, Gloria y Juan Carlos, y a mi hermano Héctor que me apoyaron en todo momento.

A mi tutor Felipe Barros por haberme dado la oportunidad de pertenecer a su *team* y por haberme enseñado y ayudado. A todos los integrantes del grupo, en especial a Tamara, que me enseñó todo lo necesario y a Alejandro, por ayudarme cuando estaba en el momento más crítico. A Sebastián por el apoyo y corrección en los detalles importantes para finalizar. A Karin, por sus cultivos que permitieron que esta tesis se realizara. A Francisca y Yasna por compartir durante las horas de trabajo y hacerlas más amenas. A Rocío, Lerchu, Ignacio y Felipe por la paciencia de oro y por contestar mis dudas repentinas.

A Karen, por ser la mejor amiga durante toda la carrera y a Nancy por haberme acompañado en este trayecto. A Luis, Amber y Andrea por estar conmigo en los momentos que los necesitaba.

A mis profesores patrocinante e informante por las correcciones realizadas.

Por último al Centro de Estudios Científicos, donde se realizó esta tesis con el financiamiento del proyecto FONDECYT 1130095.

INDICE DE CONTENIDOS

	Página
1. RESUMEN	1
1.1 SUMMARY	2
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1 Metabolismo energético cerebral	3
2.2 Rol de los astrocitos en el cerebro	5
2.3 Metabolismo energético y actividad cerebral	6
2.4 Nanosensores FRET	7
2.5 Efectos de potasio sobre el metabolismo astrocitario	8
2.6 Transporte de monocarboxilatos en células cerebrales	9
2.7 Hipótesis	11
2.7.1 Objetivo general	11
2.7.2 Objetivos específicos	11
3. MATERIALES Y MÉTODOS	12
3.1 MATERIALES	12
3.1.1. Animales	12
3.1.2. Reactivos	12
3.1.3 Anticuerpos	13
3.1.4 Soluciones y tampones	13
3.1.5 Equipos	14

	Página
3.2. MÉTODOS	14
3.2.1 Western Blot	14
3.2.2 PCR en Tiempo Real	15
3.2.2.1 Extracción RNA	15
3.2.2.2 Cuantificación del RNA	17
3.2.2.3 Retrotranscripción RT-PCR	17
3.2.2.4 PCR en tiempo real	17
3.2.3 Cultivo mixto primario de corteza de ratón	19
3.2.4 Infección	20
3.2.5 Nanosensor de piruvato Pyronic	20
3.2.6 Condiciones experimentales	22
3.2.6.1 Microscopía confocal	22
3.2.6.2 Microscopía de epifluorescencia	24
3.2.6.3 Protocolo de privación de astrocitos y calibración del sensor	24
3.2.7 Análisis estadístico	25
4. RESULTADOS	27
4.1 Caracterización de los cotransportadores de monocarboxilatos en cultivo mixto mediante qPCR y Western blot	27
4.2 Efecto modulador de alzas de potasio sobre lactato	29
4.3 Mediciones de piruvato en células privadas de glucosa	31
4.3.1 Efecto inhibitorio parcial de AR-C155858	34
4.3.2 Efecto de alzas de potasio sobre astrocitos en reposo	38

	Página
4.3.3 Diversos efectos de CBX y probenecid sobre astrocitos deprivados	41
4.3.4 Carbenoxolona aumenta los niveles de piruvato en astrocitos	44
4.3.5 Efecto inhibitorio de probenecid	50
4.3.6 Rifampicina no disminuye los niveles astrocitarios de piruvato	50
4.4 Mediciones en condiciones fisiológicas	54
4.4.1 Probenecid también tiene efectos sobre el transporte de piruvato en células mantenidas en condiciones fisiológicas	54
4.4.2 Probenecid y AR-C155858 no inhiben el ingreso de piruvato basal al astrocito en condiciones fisiológicas	57
5. DISCUSIÓN	60
5.1 Astrocitos de cultivo primario expresan ambas isoformas de MCT	60
5.2 Alzas de potasio aumentan los niveles de piruvato en astrocitos deprivados y sin deprivar	61
5.3 Conexinas y panexinas	62
5.4 OAT(P)s	64
5.5 Probenecid y AR bajo condiciones fisiológicas no inhiben la entrada de piruvato al astrocito al usar altas concentraciones extracelulares de piruvato	65
5.6 Conclusiones	66
5.7 Proyecciones	67
6. BIBLIOGRAFÍA	68

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Metabolismo de glucosa.	4
Figura 2. Nanosensores codificados genéticamente basados en FRET	21
Figura 3. Esquema <i>Setup</i> experimental.	23
Figura 4. Calibración del nanosensor Pyronic.	26
Figura 5. Expresión de <i>Mct1</i> y <i>Mct4</i> en cultivo mixto y en astrocitos.	28
Figura 6. Expresión de MCT1 y MCT4 en astrocitos de corteza cerebral y de cultivo mixto.	30
Figura 7. Efecto del aumento de potasio extracelular sobre lactato y piruvato astrocitario en condiciones fisiológicas de 2 mM glucosa y 1 mM lactato.	32
Figura 8. AR-C155858 disminuye los niveles intracelulares de piruvato astrocitarios en ausencia de glucosa.	35
Figura 9. Tasa de consumo de piruvato astrocitario con AR-C155858.	37
Figura 10. Efecto de potasio extracelular sobre astrocitos en ausencia de glucosa.	39
Figura 11. Efecto modulador de alto potasio en presencia de AR.	42
Figura 12. Efecto de probenecid y de CBX por separado y en conjunto en astrocitos en ausencia de glucosa.	45
Figura 13. Carbenoxolona aumenta los niveles de piruvato astrocitarios.	48
Figura 14. Efecto inhibitorio de probenecid.	51
Figura 15. Efecto de rifampicina sobre los niveles de piruvato intracelulares en astrocitos sin glucosa y en reposo.	53

	Página
Figura 16. Efecto de probenecid en astrocitos en condiciones fisiológicas.	55
Figura 17. Efecto de probenecid y AR-C155858 sobre los niveles de piruvato astrocitarios en condiciones fisiológicas.	59

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla I.	18

LISTA DE ABREVIATURAS

ANLS : lanzadera de lactato astrocito-neurona

CFP : proteína fluorescente cian

FRET : transferencia de energía de resonancia

HEPES : [N-(2-hidroxietil) piperazina-N'-(2-ácido etansulfónico)]

KRH : tampón **K**rebs-**R**inger **H**EPES

LDH : lactato deshidrogenasa

MEM : medio mínimo esencial eagle

NAD⁺ : dinucleótido de nicotinamida y adenina

NADH : dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido

ROI : región de interés

SFB : suero fetal bovino

Tris : tris-(hidroximetil)-amino-metano

YFP : proteína fluorescente amarilla

1. RESUMEN

El piruvato producido por la glicólisis astrocitaria puede ser utilizado como sustrato por la mitocondria o convertido a lactato y exportado a través de los transportadores de monocarboxilatos (MCTs). Siendo un sustrato de la isoforma astrocitaria MCT1, es posible que el piruvato permee a través de la membrana de estas células, pero dado que sus niveles son 20-50 veces menores que los de lactato, no ha sido posible establecer este punto. La estimulación de los astrocitos por aumentos fisiológicos de potasio extracelular produce cambios importantes en los flujos glicolíticos y mitocondriales, pero se desconoce si la estimulación además afecta la permeación de piruvato. En este trabajo se utilizó un nanosensor FRET codificado genéticamente para estudiar la permeabilidad a piruvato en astrocitos en cultivo primario en condiciones basales y bajo activación. Sorpresivamente, el potente inhibidor del MCT1, AR-C155858, sólo inhibió parcialmente el transporte de piruvato, sugiriendo la existencia de vías adicionales. Carbenoxolona fue inefectiva, descartándose la participación de panexinas y hemicanales de conexinas. Sin embargo, el transporte basal de piruvato fue sensible a probenecid, sugiriendo la participación de los transportadores de aniones orgánicos (OATs). La participación de los OATPs fue descartada, ya que rifampicina no inhibió la permeabilidad basal a piruvato. La activación de los astrocitos por medio de un alza del potasio extracelular produjo un aumento en la permeabilidad a piruvato que no fue inhibida por AR-C155858, probenecid o carbenoxolona. Estos resultados sugieren que la permeación de piruvato a través de la membrana plasmática de los astrocitos es mediada por múltiples vías y que es estimulada en respuesta a aumentos del potasio extracelular.

1.1 SUMMARY

Pyruvate produced by astrocytic glycolysis can be used as a substrate by the mitochondria or converted to lactate and exported through monocarboxylate transporter (MCTs). Being an astrocytic substrate from MCT1 isoform, pyruvate may permeate through the membrane of these cells, but since its levels are 20-50 times lower than lactate, it has not been possible to establish this point. The stimulation of astrocytes by physiological increases of extracellular potassium produces significant changes in glycolytic and mitochondrial flows, but it is unknown whether stimulation also affects the permeation of pyruvate. In this work it was used a genetically encoded FRET nanosensor to study the permeability to pyruvate in astrocytes in primary culture under basal conditions and under activation. Surprisingly, the potent inhibitor of MCT1, AR-C155858, inhibited only partially pyruvate transport, suggesting the existence of additional pathways. Carbenoxolone was ineffective, ruling out the involvement of panexins and connexins hemichannels. However, the basal transport of pyruvate was sensitive to probenecid, suggesting the involvement of organic anion transporters (OATs). The participation of OATPs was discarded because rifampicin did not inhibit basal permeability to pyruvate. Astrocyte activation by an increase in extracellular potassium resulted in an increase in the permeability to pyruvate which was not inhibited by AR-C155858, probenecid or carbenoxolone. These results suggest that pyruvate permeation through the plasma membrane of astrocytes is mediated by multiple pathways and that is stimulated in response to extracellular potassium increases.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Metabolismo energético cerebral

El principal sustrato energético en el cerebro del mamífero adulto es la glucosa. Aunque este órgano representa sólo un 2% del peso corporal, consume alrededor del 20% de glucosa y oxígeno total del organismo. En condiciones fisiológicas, la glucosa ha sido considerada clásicamente el principal sustrato energético cerebral utilizado en el restablecimiento de los gradientes iónicos disipados durante la actividad sináptica. Se ha logrado establecer una correlación lineal entre la utilización de glucosa y la actividad cerebral en algunas regiones del cerebro bajo diferentes condiciones (Sokoloff, 1993). Para visualizar estos cambios metabólicos se han desarrollado técnicas de imagen como el PET (Positron Emission Tomography), sin embargo, el destino específico de la glucosa a nivel celular y molecular se mantiene desconocido.

Hasta la fecha se ha descrito que este monosacárido atraviesa la barrera hematoencefálica por medio de transportadores facilitativos denominados GLUT (Glucose Transporter) de los cuales han sido descritas al menos 3 isoformas que podrían tener un rol importante en el cerebro (Maher *et al.*, 1994). En astrocitos, las principales células gliales del cerebro, se expresa la isoforma GLUT1, mientras que en neuronas está presente la isoforma GLUT3 (Mueckler y Thorens, 2013).

Una vez dentro de la célula, la glucosa es capaz de ser metabolizada para obtener energía. Para que esto suceda es necesario que ocurran una serie de reacciones enzimáticas que convergen en la producción de piruvato (Figura 1).

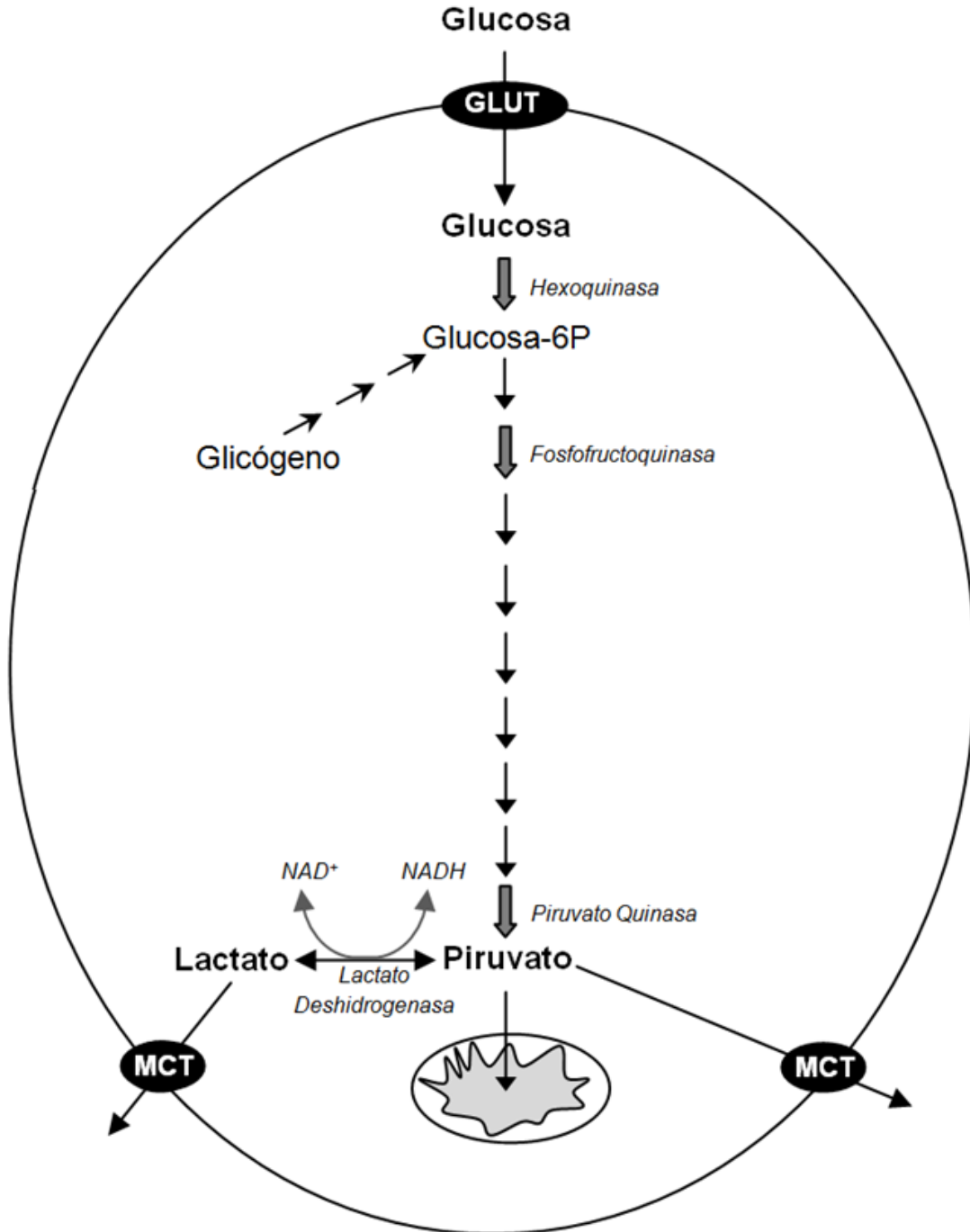


Figura 1. Metabolismo de glucosa. La glucosa ingresa a la célula por medio del transportador GLUT y es metabolizada. Las flechas grandes indican las etapas irreversibles de la glicólisis regidas por las enzimas hexoquinasa, fosfofructoquinasa y piruvato quinasa.

Este metabolito tiene un papel fundamental en el metabolismo del Sistema Nervioso Central (SNC), ya que une las vías anaeróbica y aeróbica del catabolismo de la glucosa. Esto debido a que el piruvato puede converger hacia la producción de lactato o ser utilizado como sustrato energético mitocondrial para la producción de equivalentes reductores necesarios para la generación de energía en forma de ATP mediante el ciclo del Krebs (Rodrigues *et al.*, 2012). Un aumento creciente de evidencias indica que las neuronas y células gliales poseen diferencias importantes en el transporte y metabolismo de piruvato. Se ha propuesto que los astrocitos tienen capacidad oxidativa limitada dedicando su piruvato intracelular a la producción de lactato. En contraste, se ha propuesto que las neuronas oxidan su piruvato a CO₂ y agua. Se ha postulado que estas diferencias en el destino de piruvato en ambos tipos celulares están acopladas metabólicamente al haber transferencia de lactato desde los astrocitos a las neuronas soportando la neurotransmisión glutamatérgica, por lo que es posible postular que existe una dependencia metabólica entre astrocitos y neuronas (Broer *et al.*, 1997; Magistretti, 2009).

2.2 Rol de los astrocitos en el cerebro

Los astrocitos son células que juegan roles importantes en el cerebro: cubren casi por completo la microvasculatura cerebral con sus pies terminales; son el primer tipo celular del parénquima cerebral, por lo que es posible encontrar todas las moléculas que han cruzado la barrera hematoencefálica en ellos; están altamente interconectados con su ambiente como otros astrocitos o neuronas, participando en la sinapsis tripartita, y con zonas no celulares como el líquido cefalorraquídeo o la

lámina basal; son capaces de regular los niveles de glucosa, aminoácidos y desintoxican de oxidantes y xenobióticos (Parpura *et al.*, 2012).

Los astrocitos, y no sólo las neuronas, tienen una alta participación en la homeostasis cerebral por lo que se considera importante estudiar su rol en el acoplamiento metabólico.

2.3 Metabolismo energético y actividad cerebral

Durante actividad sináptica el metabolismo energético cerebral varía, habiendo mayor utilización de glucosa. Se ha demostrado que la estimulación somatosensorial produce una rápida disminución de la concentración intersticial de glucosa cerebral indicando un aumento de su consumo (Fox *et al.*, 1988); por otra parte los niveles de lactato extracelulares aumentan (De Bruin *et al.*, 1990; Fellows *et al.*, 1993; Hu y Wilson, 1997; Newman *et al.*, 2011; Suzuki *et al.*, 2011). Los astrocitos, como se mencionó anteriormente, estarían involucrados en eventos metabólicos desencadenados por activación neuronal. Estudios realizados en astrocitos de cultivo primario han revelado que al ser expuestos a glutamato aumentan su consumo de glucosa y producen una cantidad significativa de lactato que es liberada al medio (Pellerin y Magistretti, 1994). Esta evidencia experimental ha sido la base que sustenta la hipótesis de la lanzadera de lactato astrocito-neurona (ANLS), donde las neuronas activadas utilizan el lactato liberado por los astrocitos como sustrato energético preferencial (Fillenz, 2005; Pellerin y Magistretti, 1994; Pellerin *et al.*, 1998).

La hipótesis de la ANLS aún es controversial (Dienel, 2012; DiNuzzo *et al.*, 2010). No hay claridad en relación a la temporalidad, tipos celulares responsables del aumento

de lactato o los mecanismos moleculares involucrados. La falta de tecnología que permita obtener datos en una resolución temporal acorde con la actividad cerebral y con una resolución espacial de célula única no ha permitido validar esta hipótesis. En el cerebro es crucial la identificación de núcleos celulares, ya que es un tejido altamente heterogéneo en términos de tipos celulares. Típicamente, para el estudio del metabolismo energético cerebral, han sido utilizadas técnicas isotópicas o de imagen como el PET, las cuales si bien han y seguirán siendo útiles, cuentan con una baja resolución espacial y temporal. Una nueva tecnología que permitiría eludir esta limitación es el uso de nanosensores codificados genéticamente basados en FRET.

2.4 Nanosensores FRET

Los sensores FRET codificados genéticamente son proteínas de fusión compuestas de un dominio de unión a ligando, un elemento de reconocimiento y un par de proteínas fluorescentes que presentan sus espectros de emisión y excitación en superposición. Típicamente se usan las proteínas CFP (Cyan Fluorescent Protein) e YFP (Yellow Fluorescent Protein). La unión del metabolito en estudio produce un cambio conformacional que afecta a la distancia y/o la orientación relativa de las proteínas fluorescentes, causando un aumento o una disminución en la eficiencia FRET.

En el laboratorio se desarrolló un nanosensor FRET que detecta lactato intracelular con una alta resolución espacial y temporal en células vivas (San Martín *et al.*, 2013). Laconic (Lactate optical nano indicator from CECs) se basa en un regulador transcripcional bacteriano denominado LldR que se compone de dos módulos, un

dominio regulatorio de unión a lactato y un dominio de unión a DNA. Como elemento de reconocimiento se seleccionó el gen que codifica para LldR de *Escherichia coli*. Las proteínas FRET utilizadas para la creación de Laconic fueron las proteínas fluorescentes mTFP y Venus, que comparadas con CFP e YFP, son más brillantes y menos sensibles a pH (Day *et al.*, 2008; Nagai *et al.*, 2002).

Con una estrategia similar, utilizando como módulo de unión a ligando el factor transcripcional PdhR (Ogasawara *et al.*, 2007), nuestro laboratorio ha desarrollado otro nanosensor FRET para piruvato denominado Pyronic (Pyruvate Nano-Indicator from CECs), el cual ha permitido el desarrollo de nuevos métodos para la estimación cuantitativa del transporte, la tasa de producción glicolítica y consumo mitocondrial de piruvato en tiempo real con resolución de célula única (San Martin *et al.*, 2014).

El uso de las herramientas previamente mencionadas, en conjunto con un nanosensor FRET para glucosa previamente descrito (Takanaga *et al.*, 2008), ha permitido la identificación de potasio como una señal neuronal que produce una estimulación aguda del metabolismo cerebral de glucosa.

2.5 Efectos de potasio sobre el metabolismo astrocitario

En el cerebro, la concentración de potasio extracelular se mantienen cerca de 3 mM habiendo variaciones locales que se producen después de actividad neuronal (Katzman, 1976; Somjen, 1979). Esta actividad sináptica causa un aumento rápido de la concentración intersticial de potasio, la cual fluctuaría entre 10-12 mM en condiciones de activación máxima (Kofuji y Newman, 2004). Estudios realizados en el laboratorio indican que alzas de potasio extracelular inducen un aumento de la glicólisis astrocitaria en cultivo mixto de neuronas y astrocitos (Bittner *et al.*, 2010).

Estudios posteriores realizados en el laboratorio revelaron que la glicólisis en astrocitos es mediada por pH intracelular, más específicamente, por una alcalinización alcanzada mediante el cotransportador de sodio y bicarbonato NBCe1 (Ruminot *et al.*, 2011). Por lo tanto, un alza de potasio extracelular debido a actividad sináptica despolariza la membrana del astrocito permitiendo el ingreso de bicarbonato a la célula. Esto alcaliniza el medio intracelular y aumenta la tasa glicolítica, lo que sugiere que potasio produciría un aumento en los niveles de lactato intracelular. Experimentos recientes realizados en el laboratorio indicaron que la exposición de cultivos neuronales con astrocitos que expresaban Laconic a soluciones que contenían 12 mM potasio generaban una caída aguda del lactato intracelular (Sotelo-Hitschfeld *et al.*, 2015). Esta observación sugiere una posible activación del flujo de lactato hacia el medio extracelular, consistente con lo propuesto en la ANLS.

Tanto piruvato como lactato son metabolitos energéticos que son intercambiados entre el intra y extracelular de forma reversible a través de una familia de cotransportadores acoplados a un protón denominados MCTs (Monocarboxylate Transporters). Al día de hoy han sido reportadas 14 isoformas de MCTs, de las cuales son importantes en tejido cerebral la 1, 2 y 4 (Halestrap y Price, 1999; Pellerin *et al.*, 2005).

2.6 Transporte de monocarboxilatos en células cerebrales

Los MCTs son transportadores integrales de membrana que cotransportan un protón junto con un monocarboxilato, ya sea lactato, piruvato, cuerpos cetónicos, acetoacetato o β -hidroxibutirato, cada uno con una afinidad distinta. Estos

cotransportadores pueden ingresar al monocarboxilato y permitir su uso como sustrato energético, así como también lo pueden expulsar de la célula. En el cerebro se encuentran los subtipos MCT1, MCT2 y MCT4, donde las neuronas y los astrocitos expresan distintas isoformas de MCTs (Pierre y Pellerin, 2005). Los astrocitos expresan *in vivo* MCT4, el cotransportador de baja afinidad por lactato y piruvato ($K_m = 35$ mM y 150 mM respectivamente) (Dimmer *et al.*, 2000), lo que le sugiere un rol de exportación de lactato intracelular, mientras las neuronas expresan el cotransportador de monocarboxilato de alta afinidad por lactato, el MCT2 ($K_m = 0,7$ mM) (Pellerin *et al.*, 2005). Esta diferencia de afinidad entre los MCTs que expresan estas células apoya la teoría de la lanzadera de lactato, donde las neuronas captarían el lactato que vendría de los astrocitos (Pellerin *et al.*, 2007).

La isoforma del MCT que ingresaría piruvato al astrocito es preferentemente la 1, ya que la isoforma 4 tiene una K_m para piruvato muy alta.

A pesar que los MCTs parecen cumplir el rol de exportación de lactato en astrocitos, los resultados en el laboratorio sugieren la existencia de una permeabilidad diferencial a lactato y debido a las características electrofisiológicas observadas, no se trataría de un transportador, sino más bien de un canal.

La posibilidad de que exista también una permeabilidad diferencial para piruvato capaz de ser activada por potasio resulta probable, debido a las bajas afinidades que tienen los MCTs por piruvato; es por esto que se investigan otros posibles medios de entrada de este monocarboxilato al astrocito.

Este trabajo buscó caracterizar el transporte de piruvato en astrocitos en condiciones de reposo y en respuesta a estimulación por un aumento del potasio extracelular.

Teniendo en consideración los antecedentes previamente mencionados, se propone la siguiente hipótesis de trabajo:

2.7 Hipótesis

“Alzas de potasio extracelular aumentan la entrada de piruvato al astrocito a través de transportadores de monocarboxilatos.”

2.7.1 Objetivo general

1. Estudiar la participación de transportadores de monocarboxilatos en la permeación a piruvato en astrocitos en reposo y bajo activación.

2.7.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar la expresión de transportadores de monocarboxilatos en cultivo primario de astrocitos con neuronas mediante PCR en tiempo real y Western blot.
2. Evaluar el efecto de alto potasio extracelular sobre el transporte de piruvato astrocitario en activación, reposo y bajo intervenciones farmacológicas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1. Animales

Para la obtención de resultados de esta tesis fueron utilizadas cortezas de cerebros de ratones neonatos cepa B6CBA. Los animales fueron proporcionados por el bioterio del Centro de Estudios Científicos, los cuales fueron mantenidos a una temperatura ambiente de (20 ± 2) °C, un ciclo de día/noche de 12 horas y alimentados *ad libitum*.

3.1.2. Reactivos

Minimum Essential Medium Eagle (Sigma), Neurobasal® Medium (Gibco), suplemento B27 (Gibco), rojo fenol, tripsina (Gibco), penicilina-estreptomina (Gibco), fungizona, suero fetal bovino (SFB) (Hyclone), glutamina, poli-L-lisina, K_2HPO_4 , 5x Green GoTaq reaction buffer (Promega), 6x DNA Loading Dye (Fermentas), agarosa (Lafken), bromuro de etidio 1 mg/ml (Sigma), dNTPs (Promega), DNA Taq polimerasa, Etanol (Merck), EDTA (Sigma), Gene ruler 1 Kb DNA ladder (Fermentas), Gene ruler 100 pb DNA ladder, Isopropanol (Merck), Metanol (Merck), Igepal (Sigma), desoxicolato de sodio (Sigma), Glycoblu (Fermentas), HCl (Merck), Kit de retrotranscripción (Invitrogen), Kapa SYBR® FAST qPCR Kit Master Mix 2X Universal (Kapabiosystems), NaOH (Sigma), SDS (Sigma), SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Sigma), Tris-HCl (Sigma), Trizol® (Invitrogen), triton X-100 (Sigma), Turbo™ DNAasa (Ambion), Tween-20 (Sigma), piruvato de sodio (Sigma), NaCl (Merck), KCl (Merck), HEPES (Sigma), $MgCl_2$

(Sigma), CaCl_2 (Merck), NaHCO_3 (Sigma), Glicerol (Sigma), glicina (Sigma), tetrametiletilendiamina (BioRad), Protein Assay Dye Reagent Concentrate (BioRad), Bis Acrilamida (BioRad), leche descremada, azul de bromofenol (Sigma), rojo Ponceau (Sigma), β -mercapto-etanol (Sigma), membrana nitrocelulosa (BioRad), SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific), H_2O libre de nucleasas, Films (Kodak), soluciones de revelado, AR-C155858 (Sigma), probenecid (Sigma), carbenoxolona (Sigma), rifampicina (Sigma).

3.1.3 Anticuerpos:

Goat polyclonal antibody anti- MCT1 (#sc-14917 Santa Cruz)

Rabbit polyclonal antibody anti-MCT4 (#sc-50329 Santa Cruz)

Rabbit polyclonal antibody anti- β -Actin (#sc-130656 Santa Cruz)

Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (#111-035-003 Jackson Immunoresearch)

Peroxidase-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Goat IgG (H+L) (#705-035-003 Jackson Immunoresearch)

3.1.4 Soluciones y tampones:

PBS pH 7,4: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 2 mM KH_2PO_4

Buffer Lisis: 50 mM Tris (pH 8), 150 mM NaCl, 1% Igepal, 0,5% desoxicolato de sodio, 0,1% SDS.

TAE 1X: 40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA

Buffer de carga: 60 mM Tris-HCl, pH 6,8, 5% de SDS, 6,6% de glicerol, 5 mM de EDTA, 5% b-mercaptoetanol y 0,005% azul de bromofenol

Buffer de corrida: 25 mM Tris-HCl, 192 mM Glicina y 0,1% SDS

Buffer de transferencia: 25 mM Tris-HCl, 192 mM Glicina y 20% Metanol

TBS-T pH 7,4: 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,1% Tween-20

Buffer de bloqueo: TBS-T y 5% (p/v) leche sin grasa (descremada)

Buffer KRH/Bicarbonato (mM): 112 mM NaCl, 3 mM o 12 mM KCl, 1,25 mM CaCl₂, 1,25 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 24 mM NaHCO₃, pH 7,2. Solución gasificada con 95% O₂/5% CO₂.

Cuando se usaron concentraciones más altas de potasio (12 mM), el NaCl fue ajustado para mantener la isotonicidad.

3.1.5 Equipos

Para preparar las soluciones, se utilizó una balanza analítica SCALTEC, un agitador magnético VELP® Scientifica y Cimare y un pHmetro EXTCH instruments.

Se usó MaestroNano Spectrophotometer para cuantificar el RNA y para los experimentos de PCR en tiempo real se utilizó el termociclador para qPCR Rotor-Gene Q.

Finalmente, para los experimentos con fluorescencia se usó un Microscopio Confocal Olympus FV1000 y un microscopio de epifluorescencia Olympus IX70.

3.2. MÉTODOS

3.2.1 Western Blot

Las células de los cultivos mixtos se rasparon y se lavaron dos veces en solución salina tamponada con fosfato 1X (PBS) enfriado en hielo. Las muestras de corteza de ratón adulto fueron homogenizadas manualmente; se disgregaron 5 mg de tejido

en 300 µl de buffer RIPA frío con una mezcla de inhibidores de proteasas. Las proteínas totales de las células se extrajeron mediante lisis celular en 40 µl de buffer RIPA frío e inhibidores de proteasas. Después de 20 min de lisis en agitación a 4°C, el extracto de lisis se centrifugó (20 min, 15000xg, 4°C) y las proteínas contenidas en el sobrenadante se cuantificaron por el método de Bradford. 20 µg de proteínas se desnaturalizaron (95°C) en buffer de carga por 5 min. Las muestras se cargaron en geles de poliacrilamida compuestas de un gel separador al 12% y un gel espaciador al 4% y se corrieron a 100 Volt por 60 minutos. Las proteínas fueron electrotransferidas en membranas de nitrocelulosa. Se comprobó la correcta transferencia analizando la membrana teñida con rojo Ponceau, luego se recortó la membrana aproximadamente en los 40 kDa. Los sitios de unión no específicos se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con una solución de bloqueo. Luego se incubó la membrana durante la noche a 4°C con anticuerpos primarios anti-MCT1 y anti-MCT4 en TBS-T (dilución 1:500). Se hicieron 3 lavados de 10 minutos cada uno y se dejó incubando la membrana con los anticuerpos secundarios respectivos (1:10000). Se hicieron 3 lavados finales de 10 minutos y se reveló en una pieza oscura con un kit de quimioluminiscencia, films y soluciones de revelado.

3.2.2 PCR en Tiempo Real

3.2.2.1 Extracción RNA

La extracción de RNA se realizó mediante el siguiente procedimiento:

Homogenización de las células: Se agregaron 300 µl de Trizol por cada placa utilizada. Se rasparon las células y se incubaron por 5 min a temperatura ambiente

para disociar los complejos nucleoproteicos. Luego se centrifugaron las muestras a 12000×g por 10 min a 4°C. Se separó el sobrenadante y se pasó a un tubo nuevo.

Separación de fases: Cada muestra fue incubada a temperatura ambiente por 5 minutos, se añadieron 70 µl de cloroformo, se agitó vigorosamente por 15 segundos y se incubó 3 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12000×g por 15 min a 4°C y se traspasó la fase acuosa que contenía el RNA a otro tubo.

Precipitación del RNA: Se agregó 1 µl de Glyco Blue a cada muestra para coprecipitar el RNA. Se agregaron 160 µl de isopropanol 100%, se dejó precipitar por 10 min a temperatura ambiente y se centrifugó 12000×g por 30 min a 4°C.

Lavado del RNA: Se removi6 completamente el sobrenadante dejando s6lo el pellet que contenía el RNA. Se lav6 con 300 µl de etanol 75% (preparado con agua DEPC). Se agitó suavemente, se centrifug6 a 7600×g por 5 min a 4°C y finalmente se descart6 la soluci6n de lavado. Se dej6 secar el pellet de RNA al aire, a temperatura ambiente no m6s de 10 minutos evitando que se seque completamente para no perder solubilidad.

Resuspensi6n del RNA: El RNA se resuspendi6 en 20 µl de agua libre de nucleasas por pipeteo y se incub6 a 58°C por 15 min.

Tratamiento con DNAsa: Por cada muestra de RNA, se prepar6 un tubo aparte conteniendo 2 µl de buffer DNAsa y 0,5 µl de DNAsa. Se agreg6 la totalidad del RNA y se incub6 a 37°C por 30 min.

Inactivaci6n de DNAsa: Se agreg6 1 µl de inactivador de DNAsa por tubo, se resuspendi6 por pipeteo y se incub6 por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifug6 a 10000×g por 1,5 min y se transfiri6 el sobrenadante a un nuevo tubo.

Almacenamiento: Finalmente el RNA fue almacenado a -80°C .

3.2.2.2 Cuantificación del RNA

El RNA fue cuantificado con MaestroNano Spectrophotometer utilizando $2\ \mu\text{l}$ de éste y usando como blanco el agua libre de nucleasas. La cuantificación entregada indica el valor en $\text{ng}/\mu\text{l}$ y la razón de la absorbancia a $260\text{nm}/280\text{nm}$, que en cada muestra fue cercano a 2, lo que es un indicativo de su pureza.

3.2.2.3 Retrotranscripción RT-PCR

La retrotranscripción se inició con: $1\ \mu\text{l}$ de oligo dT, Random Primers, dNTPs, $200\ \text{ng}/\mu\text{l}$ de RNA y H_2O hasta un volumen final de $12\ \mu\text{l}$. Las muestras fueron calentadas a 65°C en termociclador por 5 min y se colocaron de inmediato en hielo. A cada tubo de reacción se le agregaron $4\ \mu\text{l}$ de buffer 5X, $2\ \mu\text{l}$ de DTT $0,1\ \text{M}$ y $1\ \mu\text{l}$ de RNAsa out. Las muestras se incubaron a 42°C por 2 min en termociclador y se agregó $1\ \mu\text{l}$ de enzima SuperScript II por tubo de reacción para realizar la retrotranscripción. Finalmente se dejó por 50 minutos a 45°C y se finalizó la reacción a 70°C por 15 minutos. El cDNA sintetizado fue finalmente almacenado a -20°C .

Para evaluar el éxito de la retrotranscripción se realizó un PCR convencional con una T_m de 55°C usando partidores del gen constitutivo ciclofilina.

3.2.2.4 PCR en tiempo real

Se utilizó $1\ \mu\text{l}$ de cDNA como molde para la PCR en tiempo real, se usó SYBR Green PCR Master Mix (Kapa Biosystems), $0,3\ \mu\text{M}$ de cada partidore (Tabla I) y H_2O hasta un volumen de reacción total de $10\ \mu\text{l}$. Cada muestra se ensayó por triplicado.

Tabla I. Partidores para RT-PCR

<i>mct1</i>	Forward	5'-AATGCTGCCCTGTCCTCCTA-3'
	Reverse	5'-CCCAGTACGTGTATTTGTAGTCTCCAT-3'
<i>mct4</i>	Forward	5'-GGCTGTTTTATCATCACGGGTT-3'
	Reverse	5'-GTGTCGCTGTAGCCAATCCC-3'
<i>ciclofilina</i>	Forward	5'-GGCAATGCTGGACCAAACACAA-3'
	Reverse	5'-GTAAAATGCCCGCAAGTCAAAAG-3'

La determinación de los niveles de expresión de mRNA de *mct1*, *mct4* y *ciclofilina* se realizó con Rotor-Gene Q (Qiagen).

La expresión relativa de cada gen fue determinada según la metodología del $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak y Schmittgen, 2001). En esta metodología se evalúa la expresión del gen de interés, respecto a un gen de referencia constitutivo el cual debe ser validado previamente para cada experimento para asegurar que su expresión es invariable con el tratamiento experimental aplicado. Las eficiencias de amplificación del gen de interés y del gen de referencia deben ser similares.

Para el análisis, los datos se ordenaron en una planilla Excel para obtener los promedios de los ΔCT de cada gen y calcular el valor $\Delta\Delta CT$ y poder aplicarlo en la fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$ y así graficar los resultados en relación a un cambio de expresión (niveles de expresión comparativos) entre las muestras. En último lugar los resultados fueron graficados en SigmaPlot.

3.2.3 Cultivo mixto primario de corteza de ratón

Para llevar a cabo el cultivo primario, neonatos de 1 a 3 días fueron sacrificados por decapitación. Las cabezas fueron recolectadas y mantenidas en medio HANK's (100 μ M HEPES ácido, 1,36 μ M NaCl, 74 μ M KCl, 50 μ M glucosa, 44 μ M K_2HPO_4 , rojo fenol, pH 7,4) con 10^2 UI – 10^2 μ g/ml penicilina-estreptomicina y 2,5 μ g/ml fungizona a 4°C. Estas condiciones fueron utilizadas hasta la obtención de la corteza cerebral libre de meninges e hipocampo.

Para la obtención de las células gliales y neuronas se incubó el tejido con tripsina 1X durante 5 minutos. La reacción se detuvo con la adición de medio MEM 5 mM glucosa, suplementado con 10% SFB, 1 mM piruvato, 2 mM glutamina, 2,5 μ g/ml

fungizona, 10^2 UI – 10^2 µg/ml penicilina-estreptomicina. A continuación, se realizó disgregación mecánica del tejido, obteniéndose células cerebrales en suspensión, las cuales fueron plaqueadas sobre cubreobjetos de 25 mm previamente tratadas con poli-L-lisina (1 g/l) en medio de cultivo MEM 10% SFB y se incubó por 90 minutos en una atmósfera húmeda artificial con 5% CO₂ - 95% aire a 37°C. Posteriormente el medio fue reemplazado por neurobasal suplementado con 2mM glutamina, 2% B27, 2,5 µg/ml fungizona y 10^2 µg/ml penicilina-estreptomicina. Las células fueron utilizadas entre los días 8 y 13 de realizado el cultivo, con un 60 - 80% de confluencia por placa. El medio neurobasal fue reemplazado cada 4 días. Todos los procedimientos fueron aprobados previamente por el comité de bioética del Centro de Estudios Científicos.

3.2.4 Infección

Los cultivos mixtos primarios fueron infectados con un vector adenoviral que contenía al nanosensor Pyronic, que muestra una gran selectividad por astrocitos por sobre las neuronas. Las células se incubaron por 12 horas *overnight* y luego fueron lavadas con medio. Finalmente los cultivos fueron utilizados 36 -48 horas post-infección viral.

3.2.5 Nanosensor de piruvato Pyronic

Los nansensores basado en FRET codificados genéticamente se basan en dos proteínas fluorescentes unidas por un factor transcripcional (Figura 2A), donde una de estas proteínas es encargada de donar energía y la otra puede aceptarla, haciendo lo que se conoce como FRET al exponerlas al metabolito en cuestión.

En esta tesis se usó Pyronic para medir piruvato intracelular.

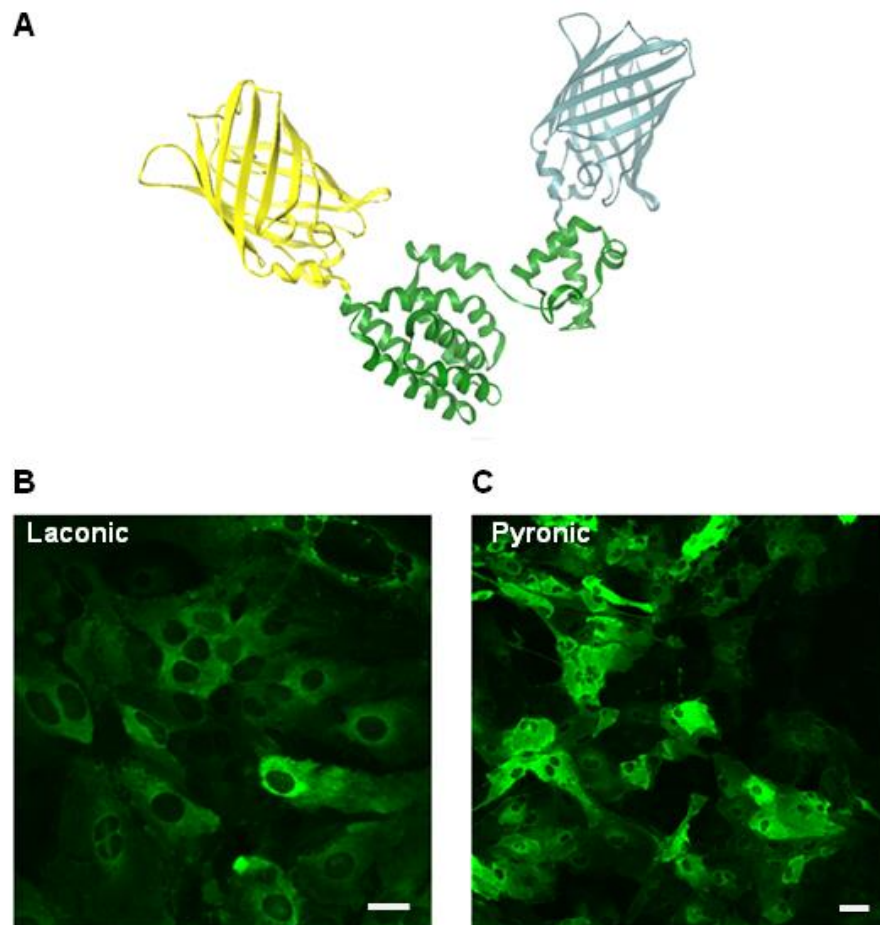


Figura 2. Nanosensores codificados genéticamente basados en FRET. A. Diseño del sensor: el regulador transcripcional Pdhr se encuentra intercalado entre las proteínas fluorescentes mTFP (donante FRET) (equivalente a la proteína cian en el esquema) y Venus (aceptora FRET) (equivalente a la proteína amarilla en el esquema) con péptidos sintéticos que separan las proteínas. **B.** Expresión citosólica del sensor Laconic en astrocitos (barra representa 20 μm). **C.** Expresión con distribución citosólica del sensor Pyronic en astrocitos (barra representa 40 μm).

Para obtener los datos, se usan las razones de intensidad de fluorescencia entre ambas, donde el piruvato produce un aumento en la intensidad de fluorescencia de la proteína donadora mTFP y una disminución en la intensidad de fluorescencia de la proteína aceptora Venus, consistente con un alza de la razón y una disminución de la eficiencia FRET. En la figura 2C se puede apreciar un cultivo donde los astrocitos están expresando el sensor; específicamente, se ve la expresión citosólica de la proteína fluorescente Venus.

3.2.6 Condiciones experimentales

3.2.6.1 Microscopía Confocal

Los experimentos de fluorescencia en tiempo real se llevaron a cabo con un Microscopio Confocal Olympus FV1000 con un láser sólido de 440 nm a temperatura ambiente (22-25°C), donde los cultivos primarios fueron expuestos a distintas soluciones salinas gasificadas (95% O₂ y 5% CO₂) conteniendo las distintas concentraciones de piruvato, potasio o inhibidores a través de un sistema de perfusión (Figura 3). La fluorescencia fue medida en regiones de interés (Regions of Interest; ROIs) ubicadas sobre las células y un *background* (ruido de fondo) que luego es restado para hacer los análisis. Todas las mediciones fueron realizadas con el objetivo de inmersión en agua de 20X con una apertura numérica (N.A) de 1. Los datos fueron recolectados en planilla Excel y fueron graficados y analizados en SigmaPlot.

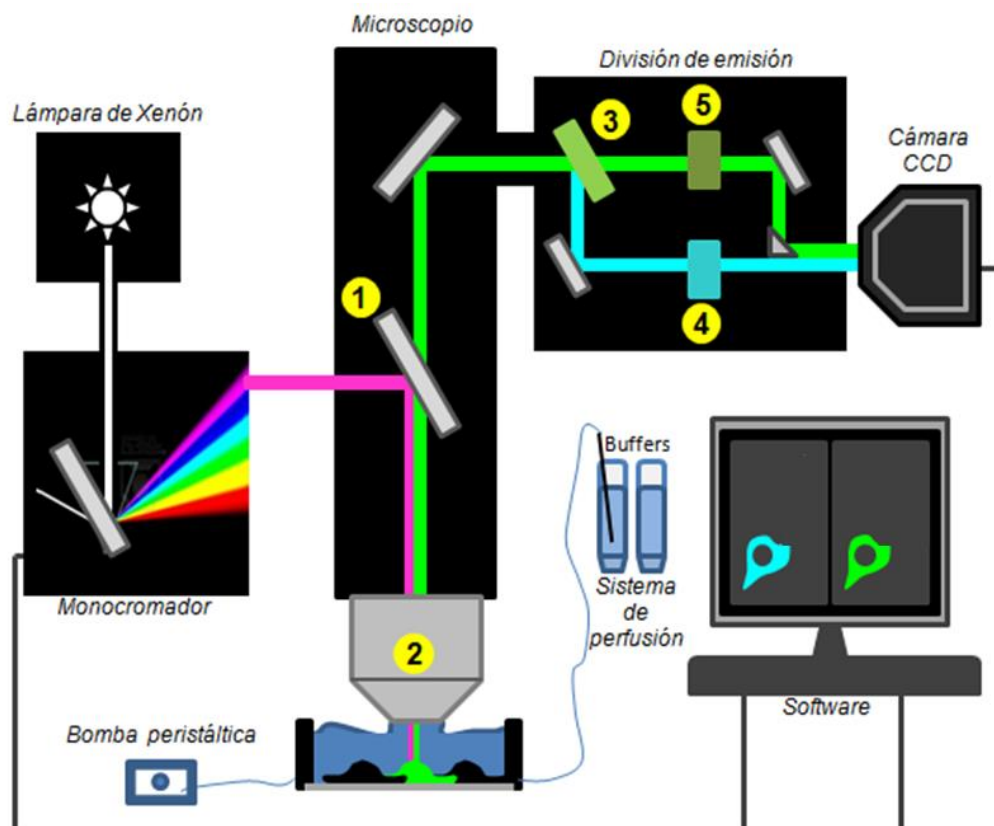


Figura 3. Esquema *Setup* experimental. Los *covers* con las células de cultivo son montados sobre una cámara asociada a un sistema de perfusión abierto donde las células son expuestas a distintas soluciones que luego son eliminadas por una bomba peristáltica. Los experimentos se realizaron con un microscopio confocal donde la luz proveniente de una lámpara de xenón es difractada y seleccionada por un monocromador para luego pasar por un primer filtro dicroico (1) reflejando solo la luz por debajo de los 440 nm. La luz pasa por el objetivo (2) que recibe la emisión de ambas proteínas fluorescentes. Un segundo filtro dicroico (3) separa las señales para finalmente pasar a través de los filtros de emisión para mTFP (4) y Venus (5). Ambas señales son captadas por una cámara manejada por un software que entrega un resultado a tiempo real durante el experimento.

3.2.6.2 Microscopía de epifluorescencia

Para realizar los experimentos con rifampicina se utilizó un microscopio de epifluorescencia Olympus IX70 acoplado con una lámpara ARC CAIRN, equipado con un monocromador CAIRN Optoscan, donde la emisión de las proteínas fluorescentes fue capturada por una cámara Orca Hamamatsu, bajo el control del Software AQM Advance 6. La fluorescencia fue medida en regiones de interés (Regions of Interest; ROIs) ubicadas sobre las células y un *background* (ruido de fondo). Todas las mediciones fueron realizadas con el objetivo de inmersión en aceite de 40X con una apertura numérica (N.A) de 1,3. La emisión de la lámpara de xenón pasa a través de un monocromador que selecciona la luz escogida, la que luego de viajar por una fibra óptica llega hasta el microscopio. Un espejo dicróico refleja la luz hacia la muestra, permitiendo excitar la proteína sensible a 430 nm, y la correspondiente transferencia de energía a la proteína aceptora. Finalmente, la emisión de ambas pasa por el microscopio hasta el optosplit, donde las señales son separadas por otros espejos dicróicos y detectadas por la cámara Orca y transformadas digitalmente en el software AQM Advance 6.

3.2.6.3 Protocolo de privación de astrocitos y calibración del sensor

Para estudiar el transporte de un metabolito es posible descartar su producción al dejar las células privadas de alguna fuente de carbono, ya sea glucosa, lactato o piruvato. Por lo tanto, el transporte será observado al utilizar una solución buffer que contenga sólo el metabolito en cuestión. Si a esto se le añaden inhibidores del transporte es posible aislar el metabolismo, pudiendo calcular tasas de consumo

gracias a las concentraciones intracelulares entregadas por los sensores como Pyronic.

Para asegurar aún más que no habrá producción del metabolito, se debe eliminar la fuente de glicógeno que poseen los astrocitos. Es por esto que las deprivaciones deben superar los sesenta minutos. En este caso, los medios de cultivo son removidos de las placas y se añade buffer KRH/bicarbonato sin metabolitos por 2 horas en la mayoría de los experimentos realizados.

Con el sensor Pyronic es posible hacer mediciones de la concentración de piruvato intracelular al hacer una calibración previa al experimento (Figura 4). Las células son expuestas a soluciones con buffer KRH/bicarbonato sin piruvato al comienzo del experimento y luego se cambia a concentraciones de piruvato que logren saturar al sensor (2 mM en este caso). Luego se cambia a una solución de referencia lo suficientemente alta en piruvato para poder hacer visibles los cambios que ocurran en la célula. En este caso la solución de referencia consistió en 400 μ M piruvato. Todos los inhibidores utilizados en los experimentos realizados fueron preparados en esta solución de referencia. Cuando las células alcanzaron un estado estacionario se agregaron las demás soluciones y luego se esperó a que se recuperaran.

3.2.7 Análisis estadístico

Los datos son presentados como promedio \pm error estándar (S.E.M). Para los análisis estadísticos se utilizó el programa SigmaPlot 11,0.

Para comparar el efecto de intervenciones sobre los niveles de piruvato en una misma célula se utilizó la prueba de *t-Student* pareada. Se consideró significativo un $p < 0,05$.

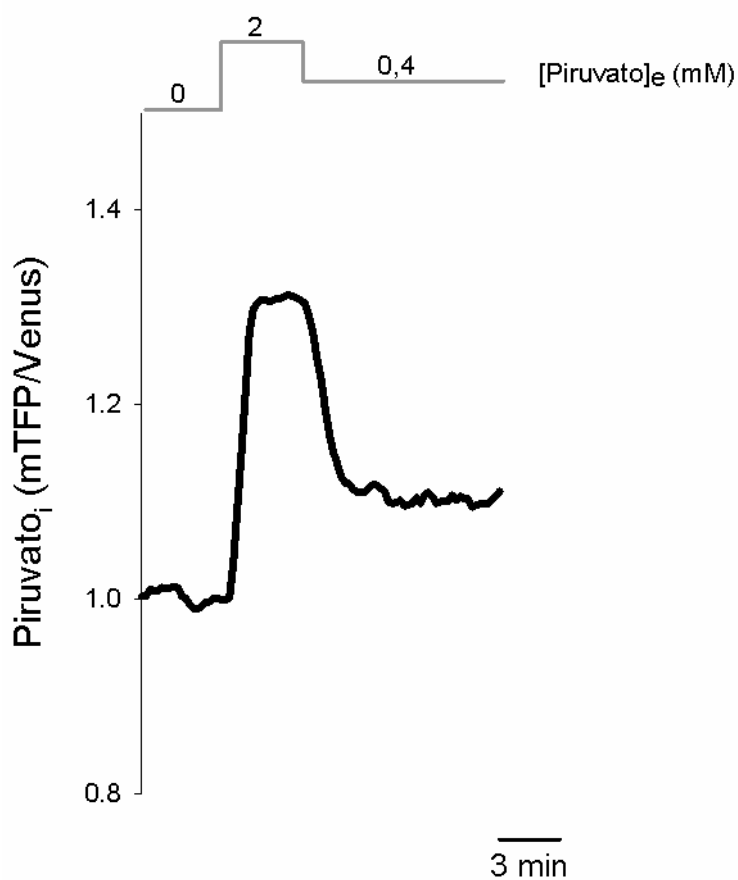


Figura 4. Calibración del nanosensor Pyronic. Se aprecia la razón de fluorescencia entre las proteínas mTFP y Venus al hacer pulsos con distintas concentraciones de piruvato extracelular: 0 mM, seguido de 2 mM y 0,4 mM piruvato (nueva solución referencia). El trazado superior representa las concentraciones de piruvato en la solución.

4. RESULTADOS

La glucosa entra a los astrocitos por los transportadores GLUT y luego es metabolizada por la glicólisis hasta piruvato, monocarboxilato que puede ingresar a la mitocondria, reducirse a lactato, o salir por el MCT (Figura 1). Como primer paso para la caracterización del transporte de piruvato en astrocitos se evaluó la expresión de MCT1 y MCT4, las dos isoformas del cotransportador de monocarboxilatos que han sido descritas en astrocitos.

4.1 Caracterización de los cotransportadores de monocarboxilatos en cultivo mixto mediante qPCR y Western blot

Los MCTs son transportadores de amplia especificidad que transportan un monocarboxilato junto con un protón. Se realizó un análisis de RNA mensajero para observar sus niveles en cultivo mixto y en astrocitos subcultivados. Para esto se usó una metodología no cuantitativa pero comparativa entre ambas muestras que entregan un valor en cambios de expresión en cuanto a veces de aumento o disminución, normalizado a ciclofilina, un gen de expresión constitutiva. Se usó el cultivo mixto como la muestra control, ya que posee ambos tipos celulares, neuronas y astrocitos y los astrocitos como la muestra de interés.

Los resultados obtenidos indican que los astrocitos subcultivados expresan 2 veces más *Mct1* y 2,4 veces más *Mct4* que el cultivo mixto $p < 0,05$ (Figura 5). Esto es indicativo que ambos cultivos celulares presentan el mensajero para poder expresar la proteína correspondiente y que probablemente sólo los astrocitos del cultivo mixto y no las neuronas lo presentan.

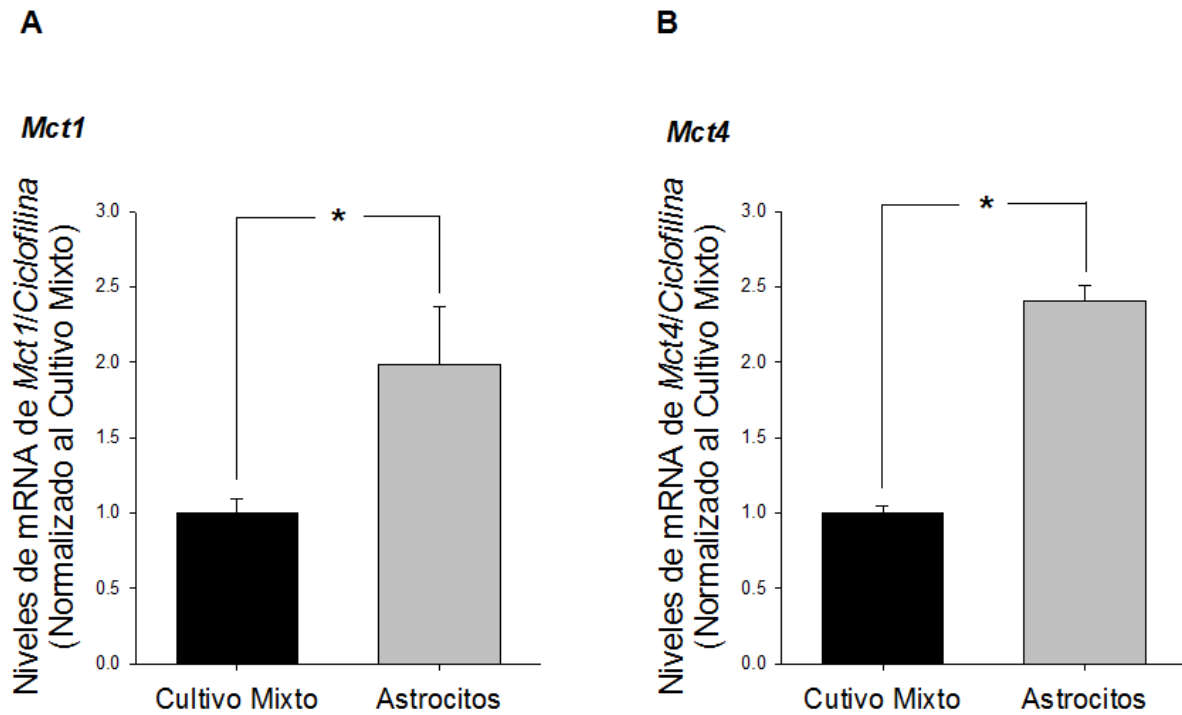


Figura 5. Expresión de *Mct1* y *Mct4* en cultivo mixto y en astrocitos. En **A** y en **B** los datos de qPCR de los niveles relativos de *Mct1* y *Mct4*, respectivamente, normalizados con ciclofilina para el cultivo mixto de neuronas y astrocitos y para el cultivo puro de astrocitos. Las barras representan el promedio de los valores obtenidos y el error estándar (S.E.M) (n=3) (* p < 0,05).

Luego se realizó el análisis de la expresión proteica de los MCTs mediante la técnica Western blot en cultivos mixtos de astrocitos y neuronas. Como control positivo se utilizó el tejido cerebral de corteza de un ratón adulto y como control de carga se usó la proteína constitutiva β -actina para realizar cuantificaciones relativas. En la figura 6 se aprecia que ambos MCTs se encuentran expresados en los cultivos mixtos utilizados en el laboratorio. Al hacer el análisis comparativo se ve que la expresión de MCT1 no varía entre la corteza y el cultivo (Figura 6A), sin embargo MCT4 en el cultivo se ve significativamente disminuido (Figura 6B). En este caso, este resultado es esperado debido a que se está trabajando con el tejido propiamente tal, por lo que se están analizando las expresiones de los MCTs que se encuentran *in vivo* en astrocitos de corteza. Hay estudios que indican que la expresión de MCT4 puede ser inducida con óxido nítrico, molécula liberada por las neuronas (Marcillac *et al.*, 2011). Sin embargo nuestros cultivos mixtos presentan este cotransportador, aunque sea en menor proporción, sin necesidad de inducción. Este resultado y el anterior indican la presencia de ambos MCTs en los cultivos mixtos de neuronas y astrocitos. Dado que las neuronas expresan la isoforma MCT2 es posible adscribir la proteína MCT1 y MCT4 a los astrocitos.

4.2 Efecto modulador de alzas de potasio sobre lactato

Resultados obtenidos en el laboratorio indican que potasio extracelular tiene un efecto sobre el transporte de lactato de astrocitos cocultivados con neuronas (en condiciones cercanas a las fisiológicas de 2 mM glucosa y 1 mM lactato), viéndose una caída aguda de su nivel en los astrocitos. Para comenzar, se decidió estudiar lo que ocurre con el piruvato en estas condiciones.

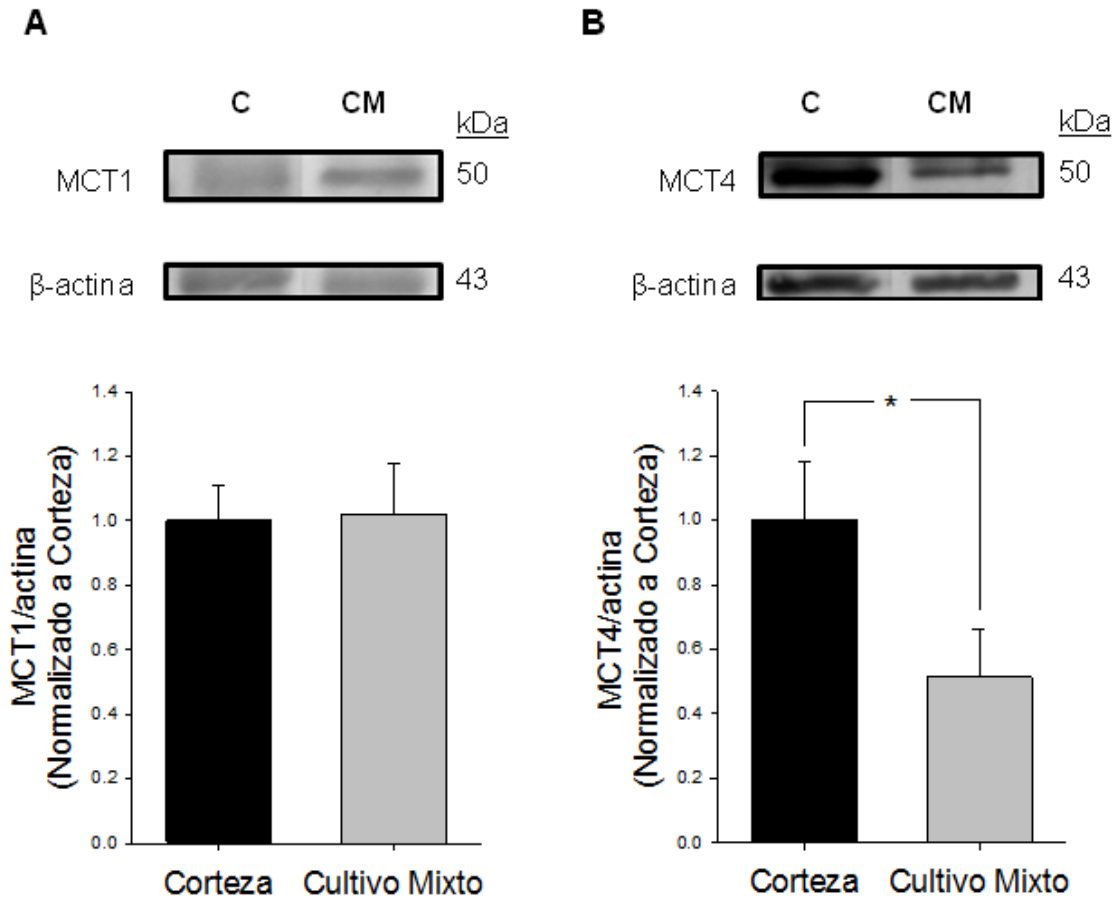


Figura 6. Expresión de MCT1 y MCT4 en astrocitos de corteza cerebral y de cultivo mixto. En **A** Western blots representativos de MCT1 en C (Corteza) y en CM (Cultivo Mixto), abajo el promedio de los datos normalizados con β -actina y luego a la Corteza. En **B** Western blots representativos de MCT4. Cada carril contenía 20 μ g de proteína. Las imágenes fueron cuantificadas con ImageJ. Las barras representan el promedio de los valores obtenidos y el error estándar (S.E.M) (n=3) (*p < 0,05).

En la figura 7 se muestran los resultados obtenidos con los nanosensores Laconic y Pyronic al exponer las células a alzas de potasio (desde 3 a 12 mM K⁺). En ambos casos se comienza con una línea base que es indicativa del estado estacionario de la célula y luego se hace un cambio de solución a alto potasio. En la figura 7A se observa que lactato disminuye agudamente en presencia de alto potasio, indicando su posible exportación de la célula. En el caso de piruvato, el efecto de potasio provoca una pequeña alza en sus niveles intracelulares (Figura 7B), quedando en cuestión qué ocurre con este metabolito. Se sabe que alzas de potasio potencian la glicólisis, sin embargo lactato disminuyó y experimentos realizados en el laboratorio sugieren la presencia de un canal en el astrocito capaz de expulsar lactato.

Para poder eliminar el efecto confuso de la mayor producción glicolítica de piruvato en células estimuladas por potasio, se procedió a efectuar experimentos en células incubadas en un medio sin glucosa por al menos una hora. En estas condiciones las células no pueden generar piruvato a partir de glucosa ni a partir de glicógeno, pues los depósitos de éste último desaparecen luego de 60 minutos de incubación sin glucosa ni otra fuente de carbono (Dringen *et al.*, 1993) (Ver materiales y métodos 3.2.6.3).

4.3 Mediciones de piruvato en células privadas de glucosa

Para evaluar la permeabilidad a piruvato en células privadas de glucosa y glicógeno, los cultivos fueron incubados con 0,4 mM piruvato como única fuente energética, estableciéndose un estado estacionario en el cual el nivel de piruvato intracelular es estable. Bajo estas condiciones la concentración intracelular de piruvato se convierte en un sensible indicador de la permeabilidad a piruvato.

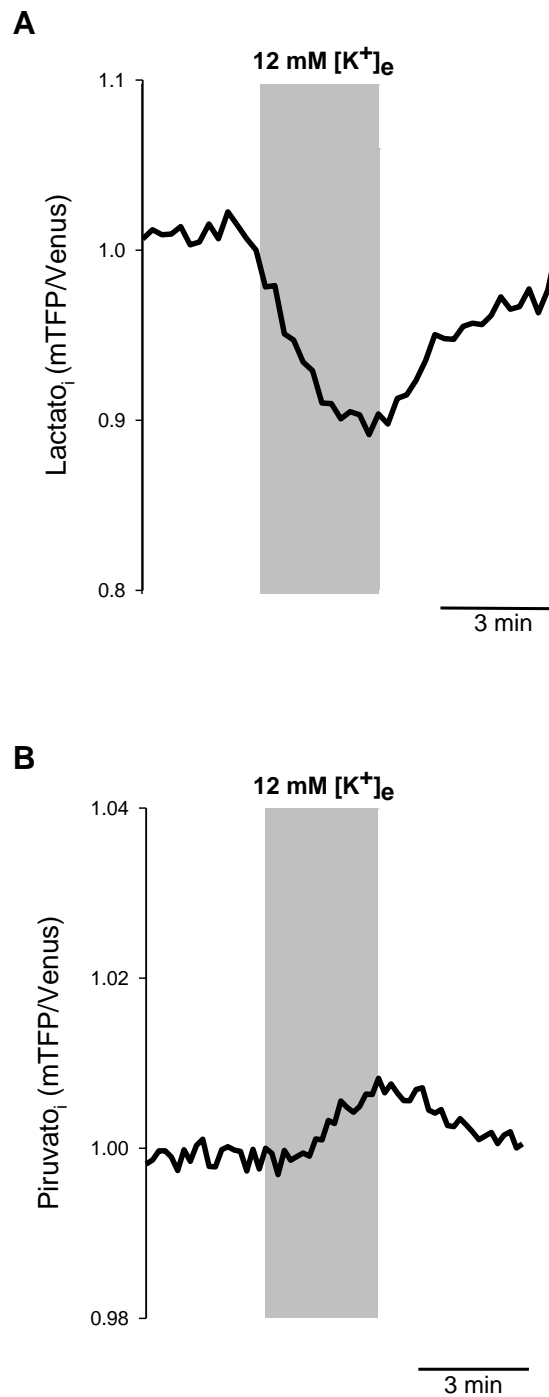


Figura 7. Efecto del aumento de potasio extracelular sobre lactato y piruvato astrocitario en condiciones fisiológicas de 2 mM glucosa y 1 mM lactato. A. Gráfico promedio de 72 células expuestas a alzas de potasio (n=7). (Sotelo-

Hitschfeld *et al.*, 2015) **B.** Efecto de alzas de potasio sobre el flujo de piruvato intracelular de 61 astrocitos (n=3). En el eje y la razón indicativa del nivel de lactato o piruvato intracelular detectado por los nanosensores Laconic y Pyronic, respectivamente.

4.3.1 Efecto inhibitorio parcial de AR-C155858

Para evaluar el papel de los MCTs en la permeación de piruvato se utilizó AR-C155858, compuesto que inhibe MCT1 y MCT2, pero no MCT4 (Ovens *et al.*, 2010). Como se muestra en la figura 8, AR produjo una caída baja pero significativa en los niveles intracelulares de piruvato; resultado consistente con un papel para el MCT1 en la permeación de piruvato. Sin embargo la concentración intracelular no llegó a cero en los primeros minutos de agregada la droga, lo que revela la presencia de una permeabilidad paralela insensible a AR. En la figura 8D se aprecia el gráfico de 32 células de 3 experimentos realizados con el inhibidor donde se vio consumo mitocondrial de piruvato en todas ellas, ya que los niveles disminuyeron significativamente ($p < 0,05$).

Habiendo hecho las calibraciones en cada experimento, es posible calcular la concentración intracelular de piruvato. Al usar una ecuación que incluye valores como la constante de afinidad por piruvato ($107 \mu\text{M}$) del sensor, junto con el rango dinámico alcanzado en saturación (San Martin *et al.*, 2014) se logra obtener el valor de la concentración intracelular de piruvato en el tiempo. Teniendo los valores de concentración es posible calcular la tasa de consumo de piruvato al agregar el inhibidor AR. Luego de analizar los datos de los 3 experimentos realizados, se obtuvo un valor de tasa de consumo de $0,29 \mu\text{M/s}$ (Figura 9).

Dado que el efecto de AR sobre la permeabilidad a piruvato fue parcial, este valor representa un subestimado de la tasa de consumo mitocondrial de piruvato. Como se esperaba un valor de la tasa más alto se decidió estudiar si las alzas de potasio extracelular tenían algún efecto sobre la entrada basal de piruvato.

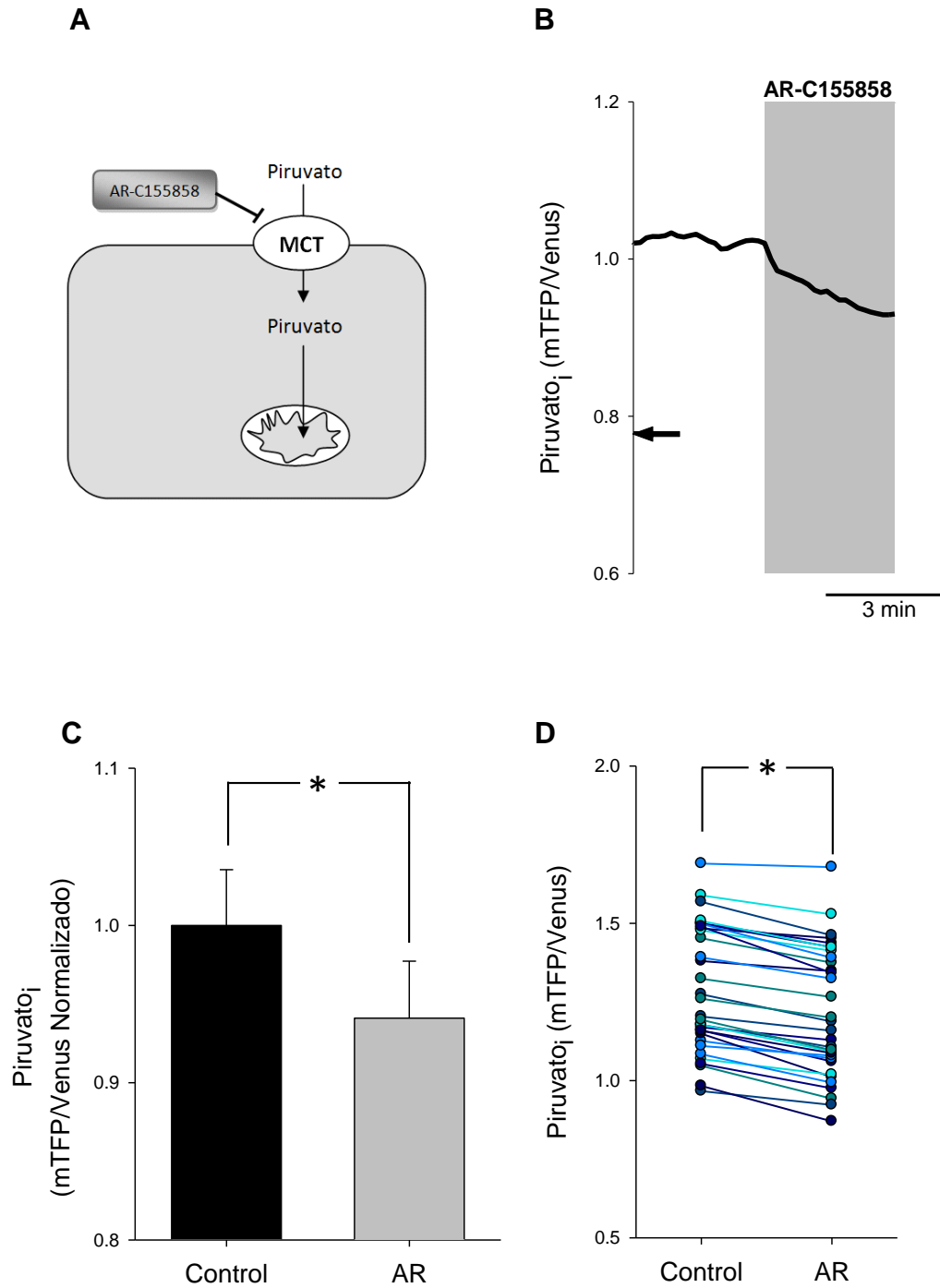


Figura 8. AR-C155858 disminuye los niveles intracelulares de piruvato astrocitarios en ausencia de glucosa. A. Esquema representativo de la inhibición de la entrada de piruvato al astrocito con AR. **B.** Gráfico representativo de una célula

expuesta a una solución referencia en ausencia y presencia de 1 μ M AR-C155858. La flecha indica el nivel del cero piruvato. **C.** Gráfico resumen normalizado al control de la disminución de los niveles de piruvato (32 células, n=3) Las barras representan el promedio de los valores obtenidos y el error estándar (S.E.M). **D.** Gráfico indicativo de los niveles de piruvato de 32 astrocitos en ausencia (control) y presencia del inhibidor. (* $p < 0.05$)

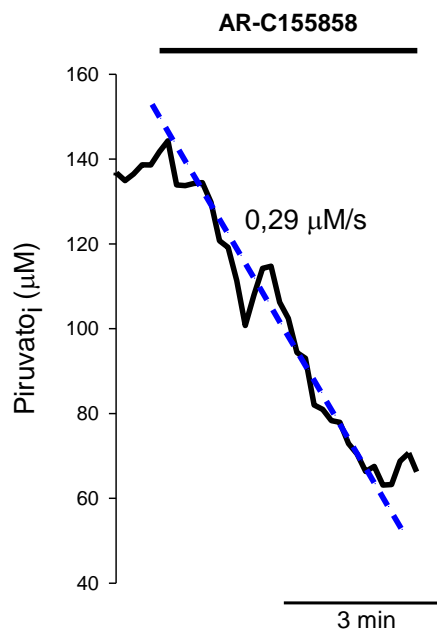


Figura 9. Tasa de consumo de piruvato astrocitario con AR-C155858. Variación de la concentración intracelular de piruvato en presencia de AR (32 células, n=3). La línea azul es indicativa de la tasa de consumo de piruvato que equivale a 0,29 µM/s.

4.3.2 Efecto de alzas de potasio sobre astrocitos en reposo

Habiendo demostrado permeación de piruvato a través de MCTs, se procedió a evaluar el posible efecto modulador de potasio sobre el transporte de piruvato. En primer lugar las células fueron sometidas a alto potasio en ausencia del inhibidor de MCTs, observándose un aumento significativo del piruvato intracelular (Figura 10). Como bajo estas condiciones se ha eliminado el posible efecto confuso de la producción glicolítica de piruvato, podemos concluir que el aumento de potasio es probablemente debido a un aumento de la permeabilidad astrocitaria a piruvato. Esta alza observada fue reversible, ya que las células volvieron rápidamente a su estado estacionario al restaurar el nivel de potasio. Al hacer el análisis estadístico del aumento obtenido se vio que éste fue significativo ($p < 0,05$). En la figura 10B se puede ver un resumen de las alzas obtenidas en 122 astrocitos tras la exposición a alto potasio y la reversibilidad de este efecto. Esta alza de piruvato observada se repitió en todos los experimentos realizados, variando sólo el nivel máximo alcanzado. Con esta información, no es posible descartar una inhibición de la captación mitocondrial de piruvato, sin embargo experimentos de nuestro laboratorio diseñados específicamente para evaluar la función mitocondrial demostraron que la exposición a alto potasio aumenta la producción mitocondrial de ATP en astrocitos (Fernández-Moncada, resultados sin publicar). Podemos concluir que el aumento de piruvato inducido por potasio se debe a un aumento de la permeabilidad de la membrana plasmática a piruvato y no a una falla mitocondrial.

Para investigar si el putativo aumento de la permeabilidad a piruvato dependiente de alzas de potasio es mediado por MCT1 se decidió estimular con potasio en presencia de AR.

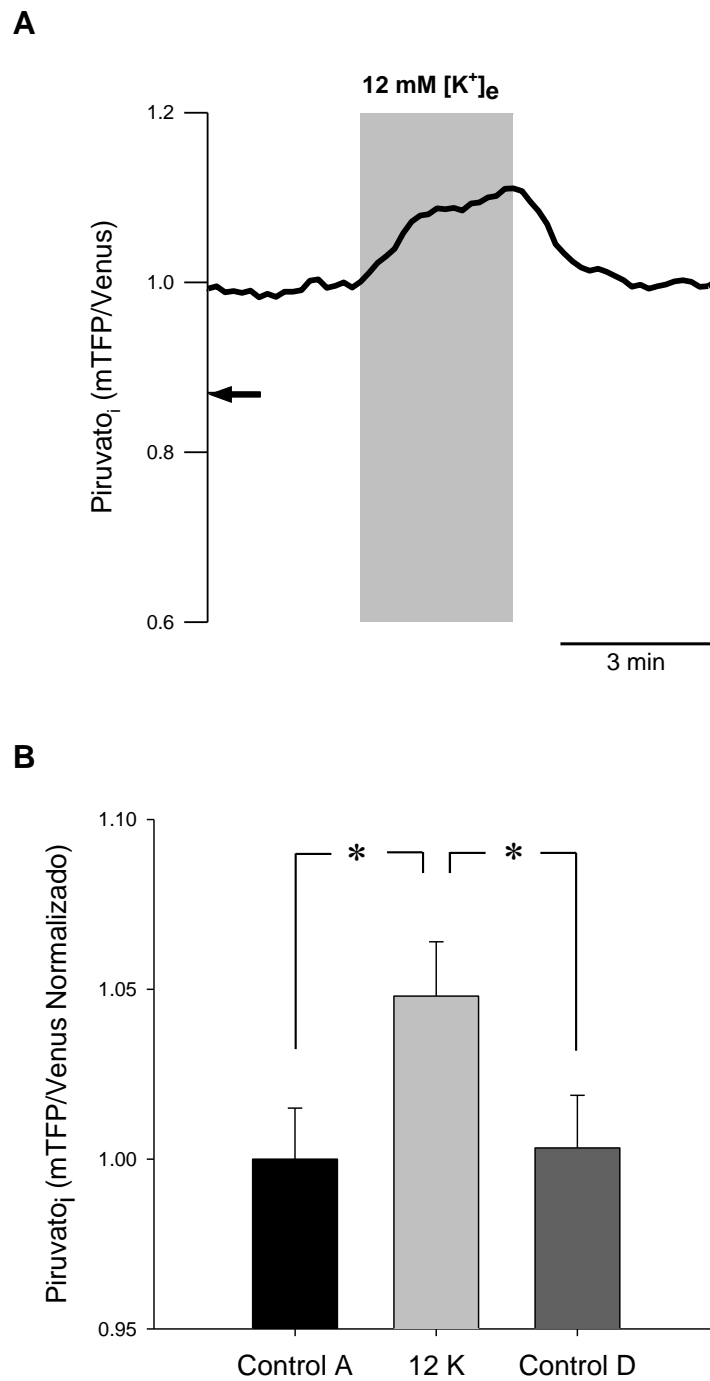


Figura 10. Efecto de potasio extracelular sobre astrocitos en ausencia de glucosa. A. Célula representativa del aumento agudo de piruvato intracelular en alto potasio. **B.** Gráfico resumen normalizado al control de los niveles de piruvato

intracelular de 122 astrocitos (n= 9) en estado estacionario antes de agregar alzas de potasio (Control A), a finales de la exposición a alto potasio (12 mM K) y luego nuevamente en ausencia de alto potasio, en el nuevo estado estacionario (Control D) Las barras representan el promedio de los valores obtenidos y el error estándar (S.E.M) (* $p < 0,05$).

Los resultados revelan variabilidad en las respuestas. En algunas células hubo una ligera alza (Figura 11A), en otras los niveles se mantuvieron (Figura 11B) mientras que en otras siguieron disminuyendo (Figura 11C). En la figura 11D se graficaron todas las respuestas obtenidas en alto potasio en presencia del inhibidor. Esto es indicativo que en algunos casos se logró activar una permeabilidad que es insensible a AR. Con este resultado se puede concluir que en una fracción de los astrocitos el potasio estimula la permeabilidad a piruvato independientemente de MCT1.

Luego de analizados estos resultados, se buscó cuál podría ser el posible medio involucrado en la entrada de piruvato en los astrocitos. Como MCT4 no posee un inhibidor específico hasta la fecha, no es posible descartarlo completamente, sin embargo su K_m permite suponer que no está participando activamente, por lo que se buscaron otras posibilidades.

4.3.3 Diversos efectos de CBX y probenecid sobre astrocitos deprivados

En busca de posibles vías alternativas a los MCTs para la permeación de piruvato en astrocitos, se evaluó la posible participación de panexinas y hemicanales de conexinas. Estos son canales de alta conductancia que permiten el paso de iones y metabolitos hasta 1000 Da (Giaume *et al.*, 2013). Aunque el papel fisiológico de estos canales está en discusión, un estudio reciente demostró que la actividad de panexinas en astrocitos aumenta en presencia de 10 mM potasio (Scemes y Spray, 2012).

Para estudiar su posible rol participativo en el transporte de piruvato se realizó el mismo protocolo de inhibición realizado previamente, incluyendo los controles que implican las alzas de piruvato con alto potasio.

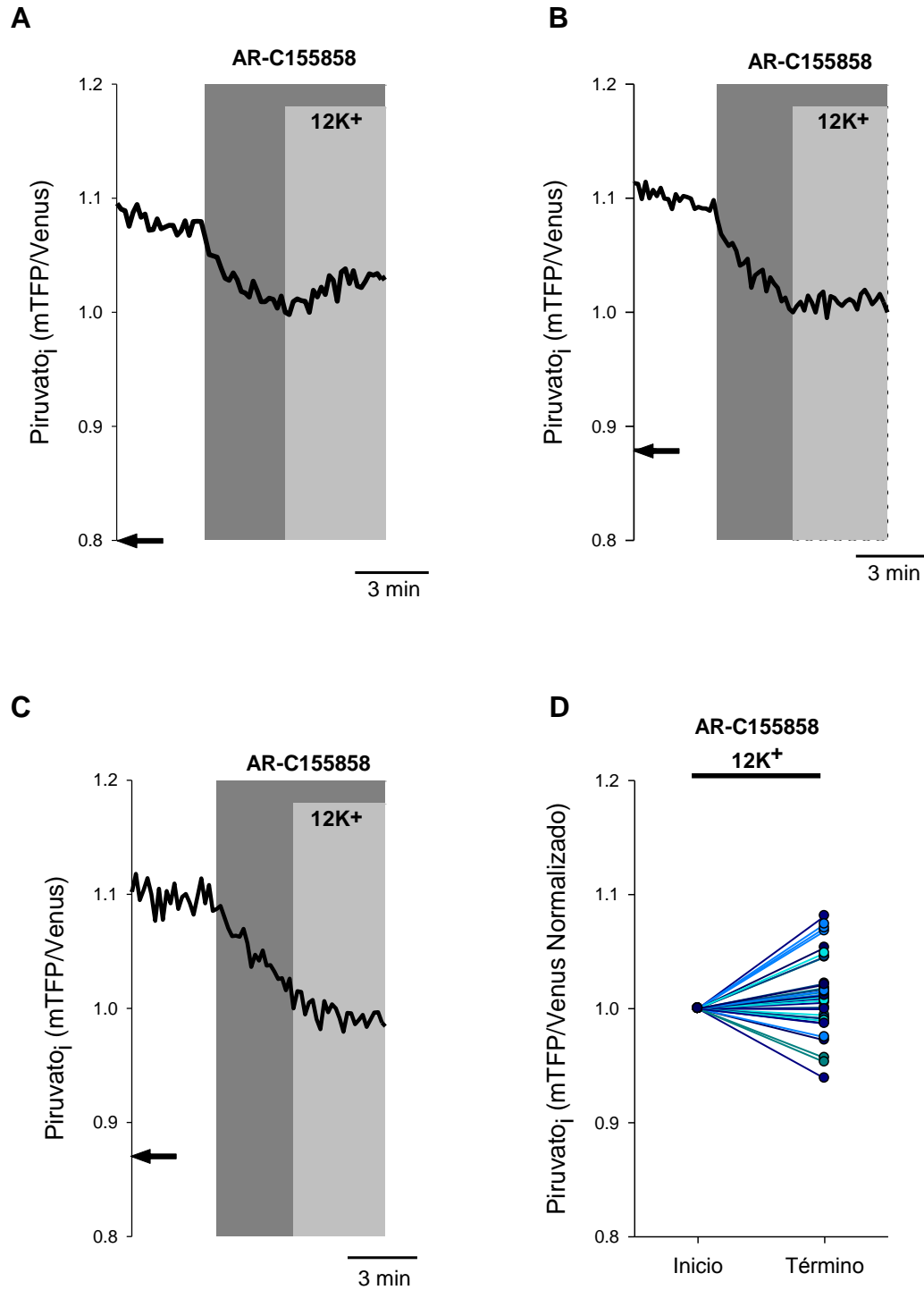


Figura 11. Efecto modulador de alto potasio en presencia de AR. A, B y C. Gráficos de células representativas que muestra los niveles de piruvato intracelular al aumentar el potasio extracelular en presencia de AR. La flecha es indicativa del nivel

donde está el cero piruvato. **D.** Gráfico de distribución normalizado al punto de inicio de alzas de potasio en presencia de AR.

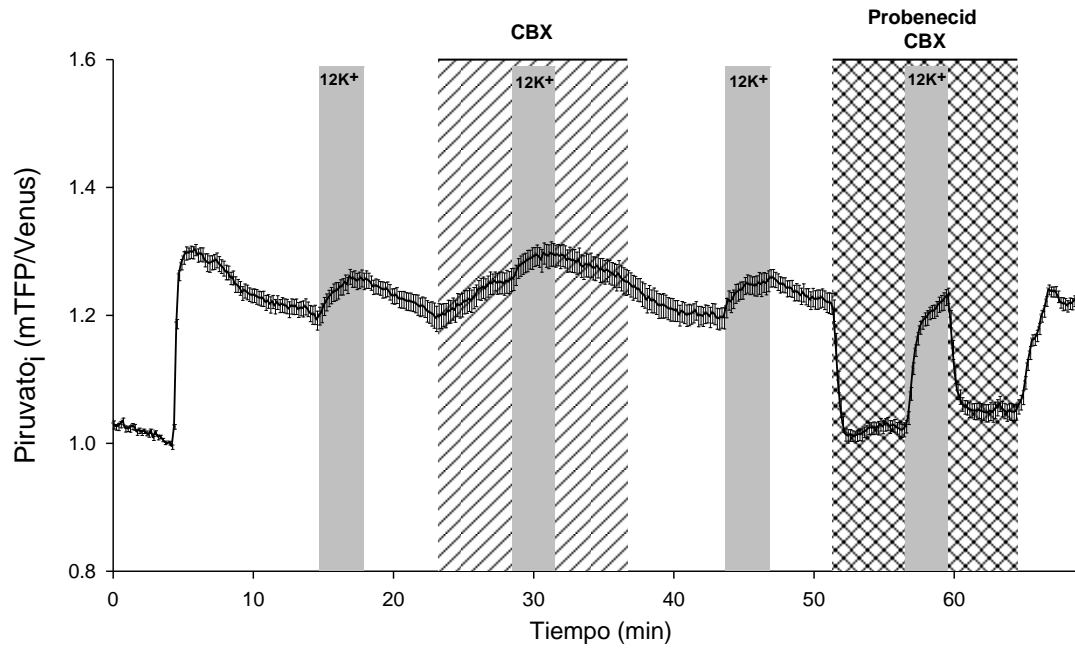
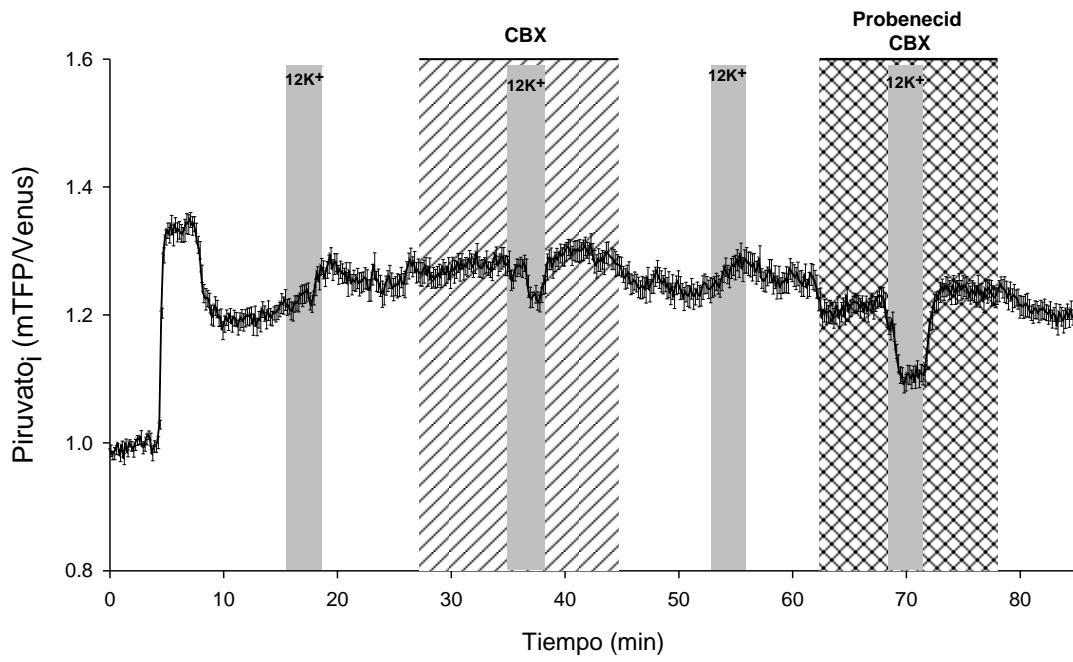
Es sabido que probenecid a concentraciones de 1 mM es capaz de inhibir panexinas y carbenoxolona (CBX) 100 μ M es capaz de inhibir hemicanales de conexinas y panexinas, ya que es una droga inespecífica.

CBX aumentó los niveles basales de piruvato intracelular, sin embargo el efecto en alto potasio fue variado, viéndose aumento (Figura 12A) y disminución de los niveles intracelulares de piruvato (Figura 12B). Probenecid tuvo un efecto rápido llevando el piruvato intracelular a niveles cercanos a cero en algunos experimentos (Figura 12C), sin embargo en otros no se logró este efecto (Figura 12D).

Al lavar ambas drogas con solución de referencia se observó nuevamente el efecto con las alzas de potasio, quedando en evidencia que ambas drogas son reversibles. Al momento de hacer experimentos con ambas drogas en conjunto las respuestas obtenidas en alto potasio también fueron variadas, viéndose disminuciones en los niveles basales parecidas a las obtenidas con probenecid en reposo, y bajo activación se vieron respuestas invertidas, llegando en algunos casos los niveles de piruvato al nivel basal (Figura 12A) y en otros llevándolos cerca de cero (Figura 12B).

4.3.4 Carbenoxolona aumenta los niveles de piruvato en astrocitos

Al analizar en profundidad los efectos que tuvo CBX sobre el nivel intracelular de piruvato se observó un aumento significativo (Figura 13). Gran parte de los astrocitos analizados subieron su piruvato intracelular mientras otros lo mantuvieron, no logrando disminuirlos en ningún caso por sí solo. CBX en conjunto con probenecid tuvo un efecto más potente. El efecto de ambos en presencia de alto potasio fue opuesto en varios experimentos mostrándose dos de ellos en la figura 12A y B.

A**B**

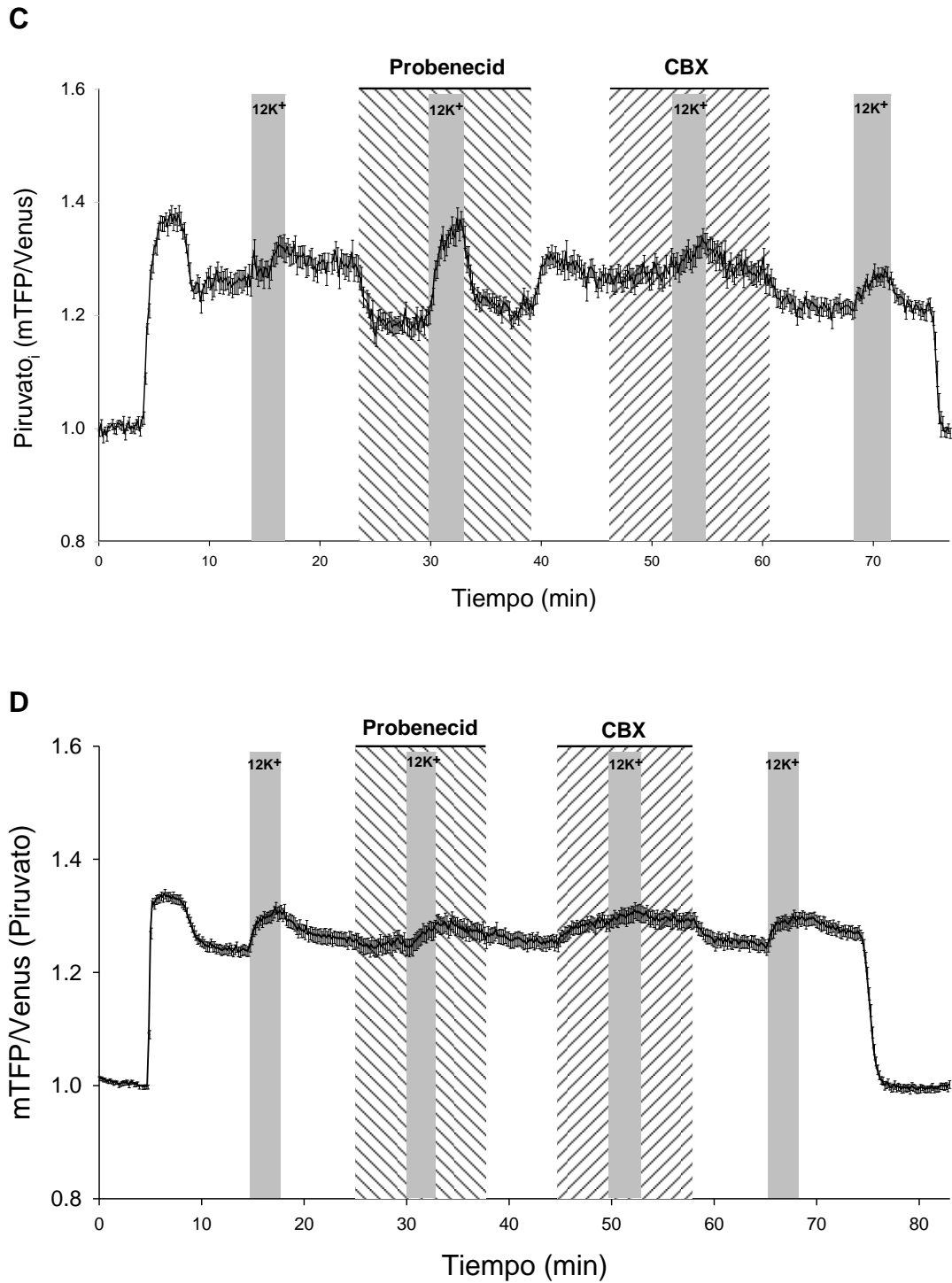


Figura 12. Efecto CBX y probenecid por separado y en conjunto en astrocitos en ausencia de glucosa. A y B. Promedio y error estándar de los niveles de piruvato intracelular de astrocitos en presencia y ausencia de carbenoxolona,

probenecid y carbenoxolona en conjunto y alzas de potasio (12 y 13 células respectivamente). **C y D.** Promedio y error de los niveles de piruvato intracelular de astrocitos en presencia y ausencia de probenecid, carbenoxolona y alzas de potasio de un experimento (16 y 13 células respectivamente). Inicio de cada experimento en cero piruvato seguido de calibración del sensor.

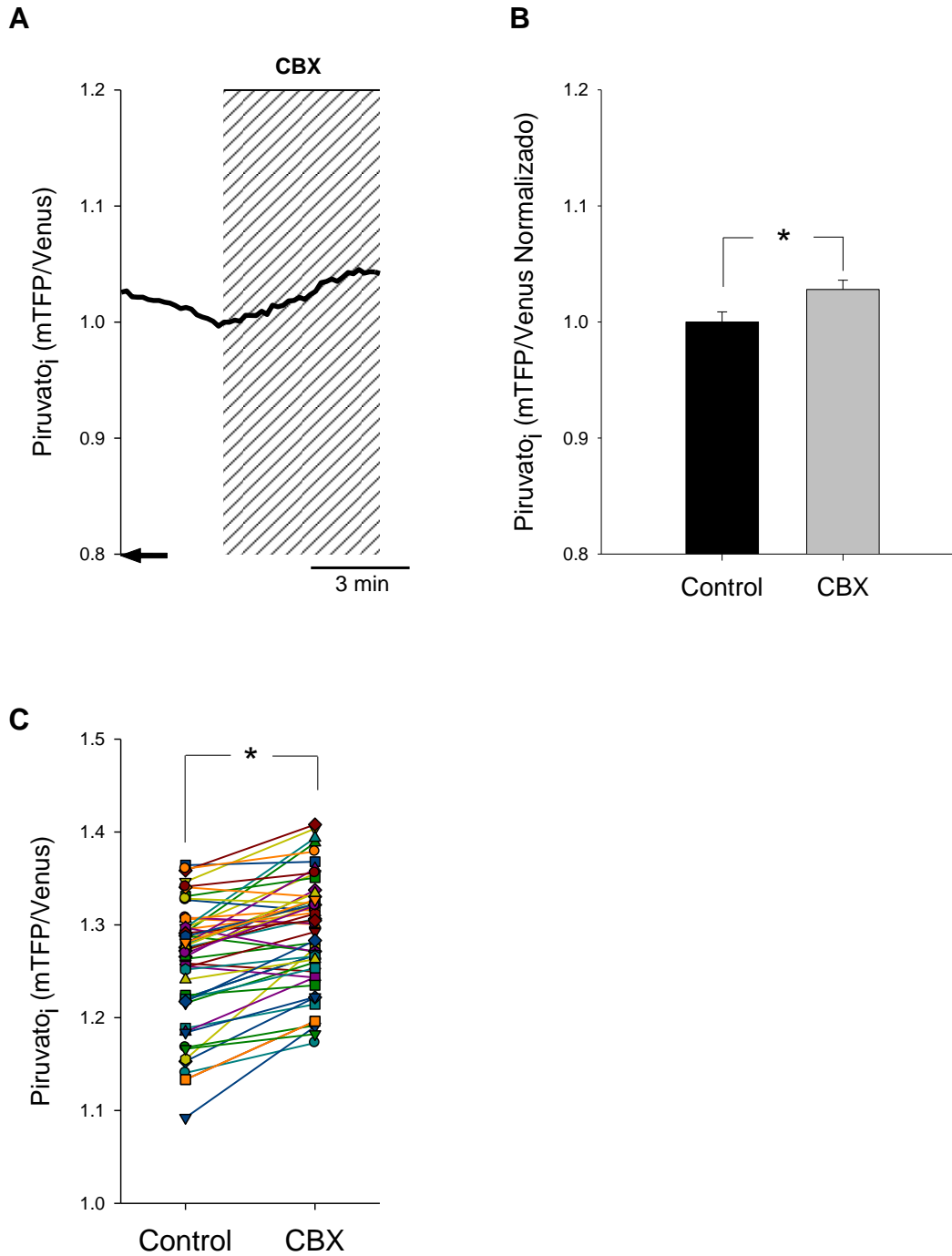


Figura 13. Carbenoxolona aumenta los niveles de piruvato astrocitarios. A. Niveles intracelulares de piruvato en presencia y ausencia de CBX de un astrocito representativo. La flecha indica el nivel del cero piruvato. **B.** Gráfico resumen normalizado al control de 55 astrocitos (n=4). **C.** Gráfico de 55 astrocitos en

presencia y ausencia de CBX. Las barras representan el promedio de los valores obtenidos y el error estándar (S.E.M) (* $p < 0,05$).

4.3.5 Efecto inhibitorio de probenecid

En la figura 14A se muestra una célula donde probenecid logró llevar los niveles de piruvato cercanos al cero. Al hacer el análisis estadístico de 5 experimentos donde probenecid tuvo efectos pronunciados se vio que la disminución fue significativa con respecto al control con un $p < 0,05$ (Figura 14B). La caída en los niveles de piruvato de 43 células en ausencia y presencia de probenecid se observan en la figura 14C. En la figura 14D se aprecia la tasa de consumo de piruvato al agregar probenecid, obteniéndose un valor de $2,12 \mu\text{M/s}$.

Debido a esta variabilidad observada y a que las células no respondieran a CBX de igual forma que probenecid se descarta el posible rol de hemicanales en la entrada basal de piruvato al astrocito, por lo tanto se buscó otra forma de inhibir esta entrada basal y la respuesta a alzas de potasio. Como probenecid es una droga que posee más de un uso se buscaron sus otros posibles blancos además de las panexinas. Estudios indican que es blanco de las proteínas resistentes a multidrogas (MRP) y también puede inhibir a los transportadores de aniones orgánicos (OATs) y a algunos polipéptidos transportadores de aniones orgánicos (OATPs).

4.3.6 Rifampicina no disminuye los niveles astrocitarios de piruvato

Un inhibidor que tiene efectos sobre los OATPs pero no tiene efecto sobre los OAT es la rifampicina. El uso de $100 \mu\text{M}$ de esta droga inhibe eficientemente a los OATPs (Schnell *et al.*, 2012). Al realizar los experimentos con esta droga se observó que los niveles de piruvato aumentaron en todas las células (Figura 15).

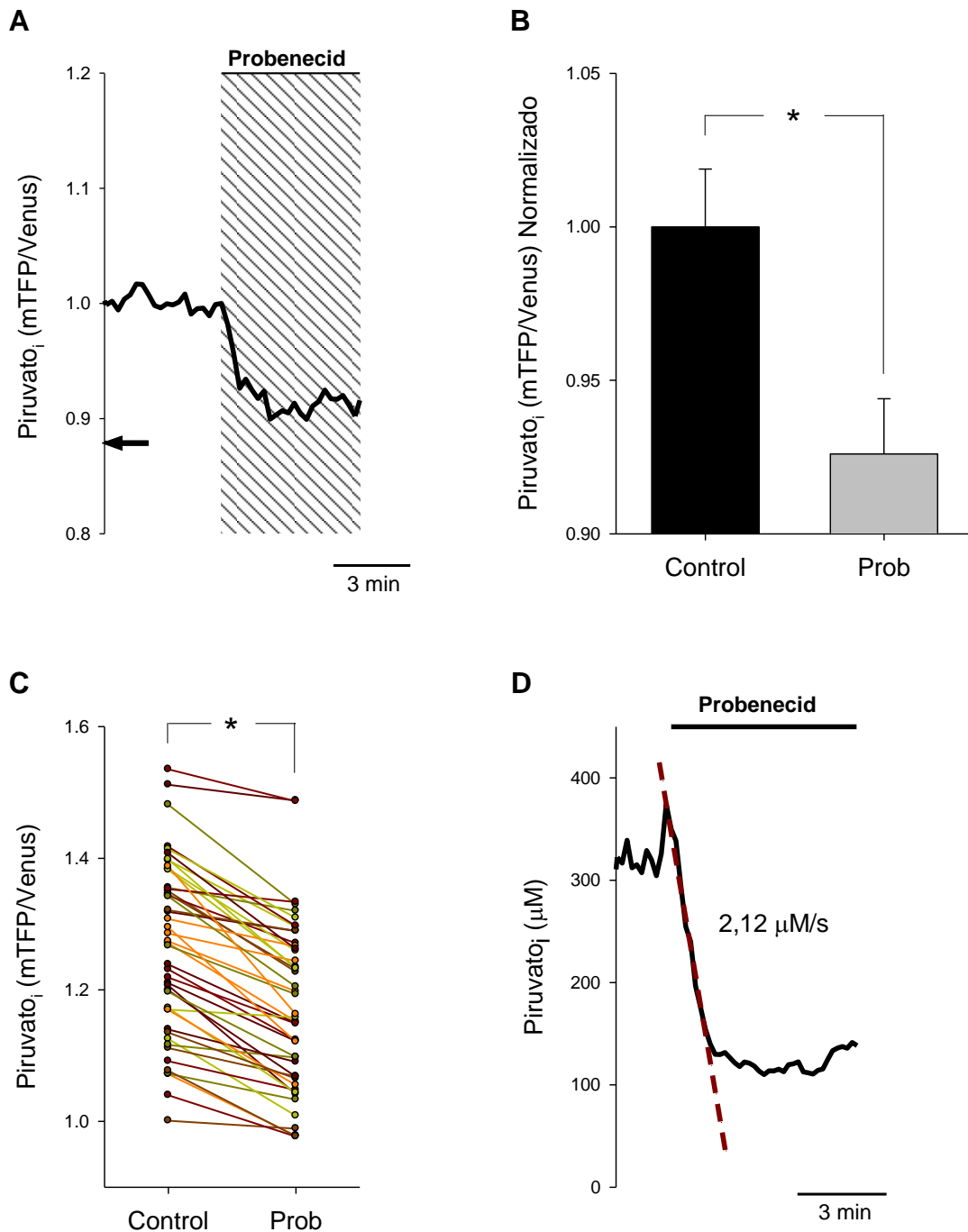


Figura 14. Efecto inhibitorio de probenecid. En **A** un experimento representativo del efecto obtenido con probenecid 1 mM en astrocitos deprivados de glucosa. La flecha indica el nivel del cero piruvato. **B.** Gráfico promedio de niveles de piruvato intracelular de 43 células (n=5) en ausencia y presencia de probenecid normalizando

al control. **C.** Gráfico representativo de 43 células (n=5) **D.** Tasa de consumo de piruvato en presencia de probenecid. Las barras representan el promedio de los valores obtenidos y el error estándar (S.E.M) (*p < 0,05)

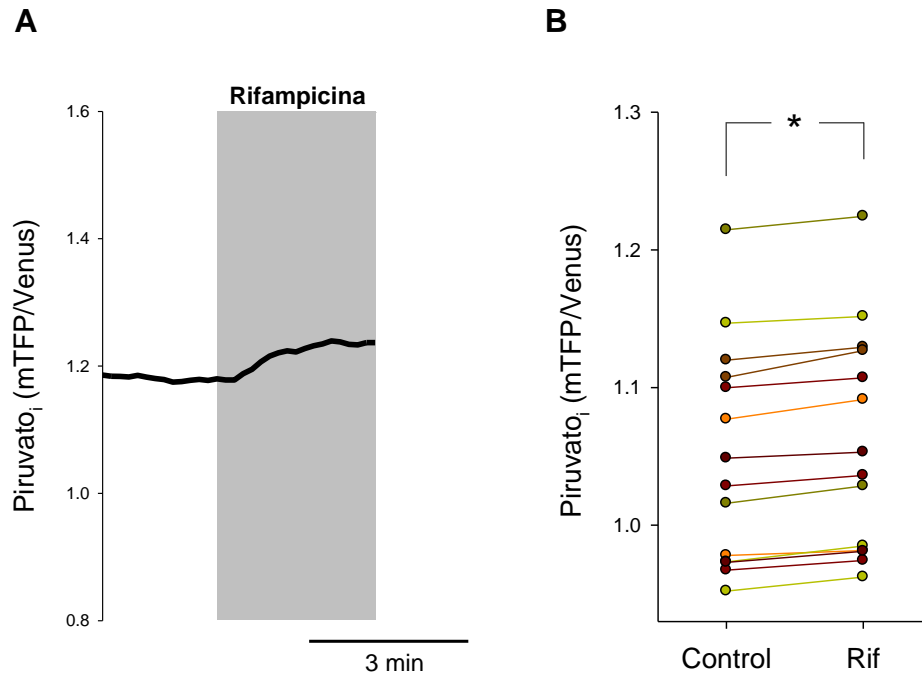


Figura 15. Efecto de rifampicina sobre los niveles de piruvato intracelulares en astrocitos sin glucosa y en reposo. En **A** el nivel de piruvato en ausencia y presencia de 100 μ M rifampicina. En **B** los niveles de 14 células (n=2). (* $p < 0,05$)

Este resultado indica que probablemente probenecid estaría actuando sobre los OATs y no sobre los OATPs, ya que rifampicina (inhibidor de OATPs) no disminuyó los niveles basales de piruvato.

4.4 Mediciones en condiciones fisiológicas

Todos los experimentos realizados con los inhibidores implicaron incubaciones largas sin glucosa, ni lactato, ni piruvato en los cultivos mixtos de neuronas y astrocitos. Al ser esta una condición anormal en el aspecto fisiológico, se realizaron experimentos en soluciones con 2mM glucosa, 1 mM lactato y 0,05 mM piruvato (a menos que sea indicada otra concentración de piruvato) y sin privación previa para comprobar si el efecto se observa de igual forma.

4.4.1 Probenecid también tiene efectos sobre el transporte de piruvato en células mantenidas en condiciones fisiológicas

Las respuestas obtenidas fueron similares a las obtenidas anteriormente, pero en menor grado.

Probenecid tiene efectos sobre el ingreso basal del piruvato, haciendo que éste disminuya sus niveles incluso cerca de cero. En la figura 16 se aprecia un experimento donde se aplicaron soluciones con probenecid a distintas concentraciones de piruvato en la solución de referencia. A medida que se aumentó la concentración de piruvato extracelular, la respuesta de probenecid aumentó también, sugiriendo que esta respuesta se obtiene en presencia de piruvato y es dependiente de la concentración; a mayor piruvato, mayor efecto.

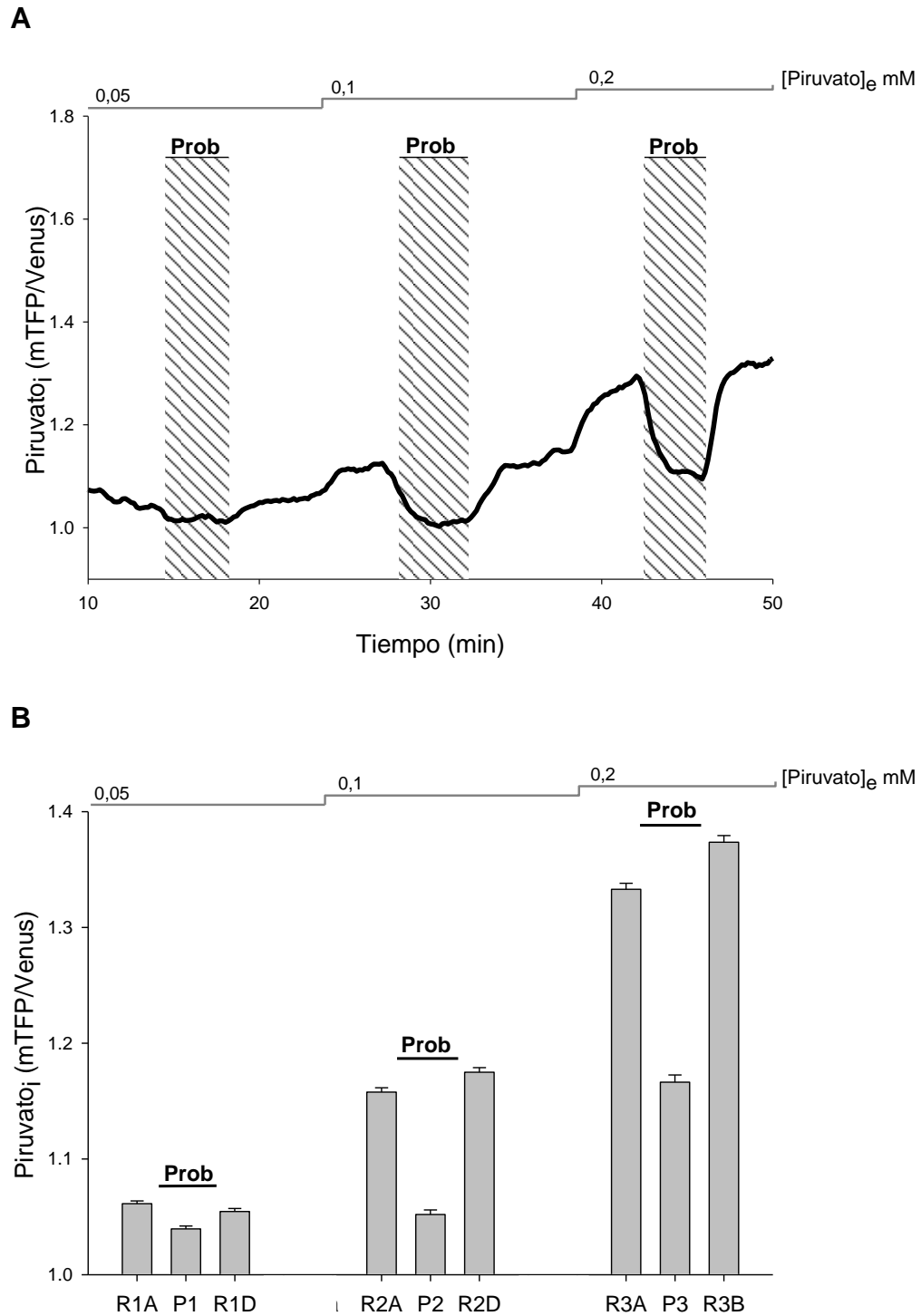


Figura 16. Efecto de probenecid en astrocitos en condiciones fisiológicas. A.

Gráfico demostrativo de los niveles de piruvato intracelular de un astrocito en ausencia y presencia de probenecid a distintas soluciones de referencia donde sólo

se varió la concentración de piruvato. La línea superior indica las concentraciones de piruvato; R1 contiene 0,05, R2 0,1 y R3 0,2 mM piruvato **B**. Gráfico representativo de los niveles de piruvato de 11 células ($n=1$) alcanzados en todas las soluciones utilizadas en **A**. Las R representan las soluciones de referencia y las P el uso de probenecid 1 mM, las A indican antes de probenecid y las D indican después de probenecid. Las barras representan el promedio de los valores obtenidos y el error estándar (S.E.M)

En la figura 16B se muestra el gráfico promedio de los niveles de piruvato de las 11 células del experimento. Todas ellas bajaron sus niveles intracelulares de piruvato en presencia de probenecid y reconstituyeron sus niveles al quitar la droga.

Luego de este resultado se analizaron los efectos de probenecid pero esta vez junto con el inhibidor utilizado previamente, AR.

4.4.2 Probenecid y AR-C155858 no inhiben el ingreso de piruvato basal al astrocito en condiciones fisiológicas

Al ver que probenecid disminuye los niveles de piruvato en astrocitos en condiciones fisiológicas se quiso investigar si al hacer pulsos de piruvato de concentraciones más altas (0,2 mM) se veía inhibición del transporte. En la figura 17 se observa un experimento donde se hicieron pulsos de piruvato en presencia y ausencia de probenecid. Los niveles de piruvato aumentaron en presencia de probenecid, lo que es indicativo de una permeabilidad insensible a esta droga al aumentar los niveles extracelulares de piruvato. Luego, en la segunda parte del experimento se usó el inhibidor de MCT1, AR-C155858, junto con probenecid. Los resultados obtenidos indican que probenecid y AR no inhiben la entrada de piruvato basal, es más, AR parece inhibir el efecto de probenecid ya que se observan alzas de los niveles previos al pulso final de piruvato. En alto piruvato los niveles siguieron aumentando a pesar de la presencia de probenecid y AR.

Al parecer, al tener inhibidas las nuevas permeabilidades encontradas en este trabajo y agregar piruvato en altas concentraciones se puede apreciar la posible

participación de MCT4, el transportador que no es inhibible por AR y que presenta baja afinidad por piruvato.

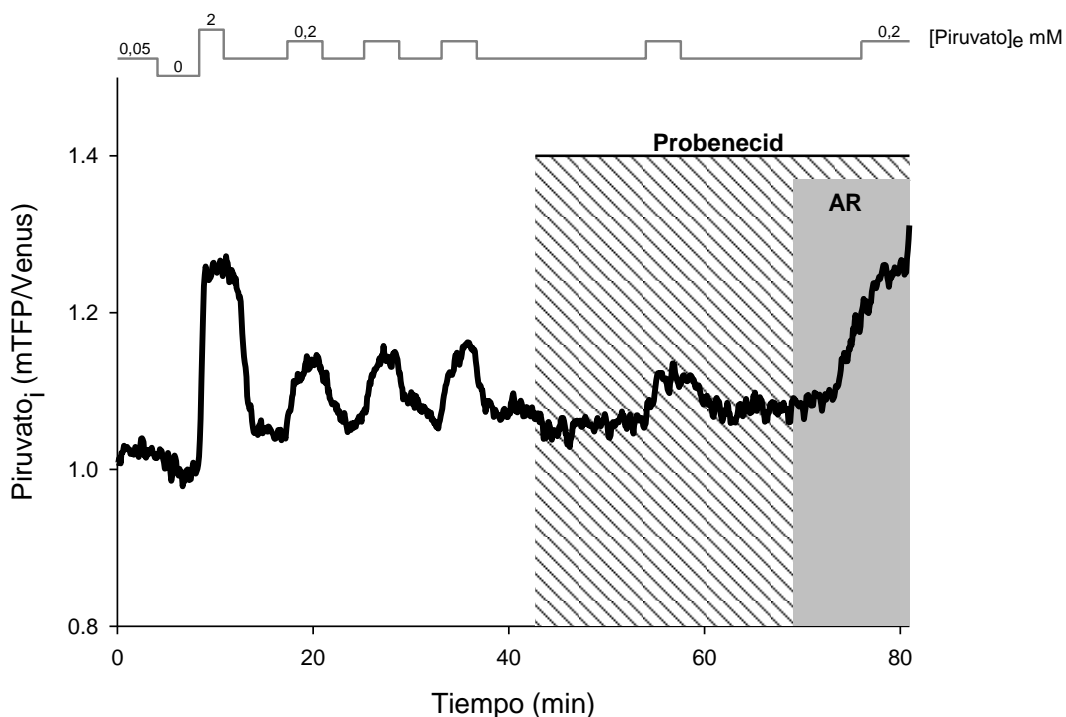


Figura 17. Efecto de probenecid y AR-C155858 sobre los niveles de piruvato astrocitarios en condiciones fisiológicas. Niveles de piruvato en astrocitos en condiciones fisiológicas de 2 mM glucosa 1 mM lactato y 0,05 mM piruvato en ausencia y presencia pulsos de piruvato de 0,2 mM y de probenecid y AR. El trazado superior indica las concentraciones de piruvato agregadas en las soluciones de referencia.

5. DISCUSIÓN

5.1 Astrocitos de cultivo primario expresan ambas isoformas de MCT

Los astrocitos de los cultivos primarios y subcultivados expresan los genes de ambos MCTs descritos en la literatura, *Mct1* y *Mct4*. Como la técnica utilizada normaliza los datos con un gen de expresión constitutivo, en este caso *ciclofinilina*, los cultivos puros de astrocitos deberían presentar mayores niveles de estos MCTs, ya que los cultivos mixtos contienen neuronas y si ellas no poseen estos mensajeros deberían presentar menor expresión al momento de evaluarlo, ya que se está normalizando con el total de ciclofinilina en ambos tipos celulares. Por lo tanto se concluye que sólo los astrocitos presentan estos MCTs, ya que neuronas expresan principalmente MCT2. En relación a la expresión de proteína observada, sólo la obtención de MCT1 era esperable en nuestros cultivos, ya que se ha visto en la literatura que MCT4 es una proteína que se expresa *in vivo*, pero que es posible inducirla con óxido nítrico, molécula liberada por las neuronas o en hipoxia. Que nuestros cultivos presenten este MCT es algo novedoso, ya que se obtuvo su expresión sin inducirla. Por lo tanto, con estos resultados podemos afirmar que los astrocitos de cultivos mixtos usados en nuestro laboratorio presentan ambos MCTs, lo que valida la posible entrada o salida de monocarboxilatos a través de ellos. Sin embargo la técnica Western blot no discrimina la localización de la proteína, quedando en duda si estos cotransportadores se encuentran en la membrana plasmática y más aún si se encuentran en su estado funcional.

Es posible que haya localización subcelular de los MCTs, sin embargo hasta la fecha sólo se ha reportado la presencia de MCT1 en mitocondrias de neuronas por medio

de inmunofluorescencia (Hashimoto *et al.*, 2008). Es posible que la proteína observada en el Western blot también incluya MCT1 de neuronas del cultivo mixto, sin embargo esto ha sido muy poco descrito, y se asume que la mayor cantidad de MCT1 se encuentra en los astrocitos gracias a la literatura, que apunta a que éstos presentan este MCT.

5.2 Alzas de potasio aumentan los niveles de piruvato en astrocitos deprivados y sin privar

Las alzas de potasio extracelular, a niveles de activación neuronal, producen un alza de piruvato intracelular medido con el nanosensor Pyronic en astrocitos incubados con y sin glucosa. Como se había visto en estudios anteriores realizados en el laboratorio, potasio es capaz de activar la glicólisis, por lo que alzas en los niveles de piruvato y lactato eran esperables, sin embargo lactato disminuyó, lo que llevó al descubrimiento de un nuevo canal capaz de liberar el lactato al medio. Visto esto, la posibilidad de una permeabilidad alternativa para piruvato resultó interesante de estudiar.

Para comenzar este estudio, se decidió analizar el transporte de piruvato en los astrocitos cocultivados con neuronas en condiciones no fisiológicas sin posibilidad de metabolizar glucosa o lactato como fuente de piruvato. Se usaron soluciones con suficiente piruvato en el medio extracelular (0,4 mM) para poder diferenciar los efectos obtenidos y poder analizar la permeabilidad del astrocito hacia este monocarboxilato. Con esta estrategia se pudo asegurar que alzas de potasio extracelular fueron capaces de aumentar el flujo basal de piruvato en astrocitos (122 células de 9 experimentos), sugiriendo que los MCTs son activables o que existe una

permeabilidad nueva que permite el ingreso de piruvato al astrocito. Para comprobar si los MCTs están involucrados en esta respuesta, se utilizó un inhibidor del cotransportador MCT1, AR-C155858 1 μM (Ovens *et al.*, 2010). Los experimentos muestran una caída en los niveles de piruvato con una tasa de consumo de piruvato de 0,29 $\mu\text{M/s}$. Como este inhibidor no es específico para MCT4, se puede postular que piruvato estaría entrando a través de él, mientras MCT1 está inhibido, sin embargo esta isoforma posee una afinidad muy baja por piruvato. Cuando se agregaron concentraciones altas de potasio en presencia de AR, los niveles de piruvato dejaron de disminuir en algunos casos y en otros incluso se vieron alzas. Esta inconsistencia en la respuesta obtenida abre aún más la posibilidad de la existencia de una permeabilidad que es insensible a AR y que sí es sensible a las alzas de potasio. Es por esto que se estudiaron otras posibles permeabilidades en el astrocito.

5.3 Conexinas y panexinas

Algunos candidatos capaces de ingresar moléculas a las células y que podrían responder a activación neuronal son los canales de panexinas y hemicanales de conexinas.

Como se ha mencionado anteriormente, las células gliales interactúan fuertemente con las neuronas tanto fisiológica como patológicamente. Una característica típica de las células gliales es su alto nivel de expresión de conexinas (Cxs) que forman *gap junction*. Los *gap junction* proporcionan la base para una comunicación única y directa de célula a célula, mientras que los hemicanales de Cxs permiten el intercambio de iones y moléculas de señalización entre el citoplasma y el medio

extracelular, apoyando así la absorción y liberación de metabolitos. Existe además otra familia de proteínas, denominadas panexinas (Panxs) que forman los canales de membrana multiméricos que presentan farmacología algo solapada con la de los hemicanales de Cxs. Tal dualidad ha dado lugar a varias controversias en la literatura en relación a la identificación de los componentes moleculares de los canales (Cxs frente Panxs) en células gliales (Giaume *et al.*, 2013).

Se ha reportado que potasio es capaz de modular la comunicación entre astrocitos por medio de los *gap junctions*, ya que éste ingresa al astrocito y es transportado por el sincitio (Scemes y Spray, 2012). Estudios han demostrado que alzas de potasio extracelular tienen un efecto sobre canales de panexinas, viéndose en cultivos mixtos de astrocitos y neuronas que las alzas de potasio extracelular activan estos canales de Pxs, produciendo permeabilidad hacia algunas moléculas como ATP (Silverman *et al.*, 2009).

Los efectos observados con probenecid (inhibidor de panexinas) indican un posible rol de las panexinas en el ingreso de piruvato basal, ya que los niveles de éste se vieron rápidamente disminuidos en condiciones de control pero no bajo los efectos de alzas de potasio. La tasa de consumo observada con probenecid resultó ser 7 veces mayor que la tasa obtenida con AR, lo que deja a probenecid como un mejor inhibidor del transporte de piruvato.

Debido a su similitud estructural, se buscó inhibir los canales de panexinas y hemicanales de conexinas con altas concentraciones de Cabenoxolona (CBX) (100 μM), ya que esta droga (no específica) no discrimina entre ellos (Schnell *et al.*, 2012). Los resultados obtenidos no fueron claros, dando en algunas ocasiones respuestas inhibitorias al efecto de alto potasio. CBX no tuvo el efecto observado con

probenecid, sugiriendo que las panexinas no son las involucradas en esta entrada basal de piruvato. El hecho de que no se haya descrito aún la permeabilidad de hemicanales hacia moléculas aniónicas hace más interesante la búsqueda de buenos inhibidores para poder estudiar el flujo de alguno de ellos (como piruvato) en astrocitos.

No es menor considerar que hay más de un tipo de panexinas y conexinas, lo que hace más probable su participación en el transporte en condiciones de activación, más que en reposo, y al mismo tiempo, más difícil de inhibir específicamente. El efecto observado con las alzas de potasio no pudo ser inhibido, lo que deja en duda la participación de otros transportadores.

5.4 OAT(P)s

Los transportadores de aniones orgánicos (OATs) son proteínas transmembrana expresadas en cerebro, riñón, hígado y placenta. Sus funciones incluyen absorción, distribución y excreción de moléculas de bajo peso molecular como conjugados de hormonas, aminos y diversas drogas y toxinas que los hacen críticos en la supervivencia de especies mamíferas (Zhou y You, 2007). Estudios indican que algunos tipos de OATs, como el OAT tipo 1, son intercambiadores entre aniones orgánicos y dicarboxilatos como el α -cetoglutarato, donde el gradiente formado por éste es mantenido por un cotransportador secundario de sodio y dicarboxilato que usa la gradiente de sodio mantenida por la bomba de $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPasa}$ (Roth *et al.*, 2012).

Otros transportadores encargados del ingreso de un amplio número de sustancias a algunos tipos celulares son los polipéptidos transportadores de aniones orgánicos

(OATPs). El mecanismo de transporte se mantiene aún en controversia pero se sabe que es independiente de sodio y ATP, sin embargo se desconoce su *driving force*. Los OATPs son capaces de transportar aniones orgánicos en forma bidireccional y algunos estudios afirman que son intercambiadores electroneutros, sin embargo parece ser que esas características dependen del tejido en donde se encuentren expresados (Roth *et al.*, 2012).

Es importante señalar que probenecid, además de inhibir panexinas, es capaz de inhibir otros transportadores como los OATs y algunos OATPs. Para descifrar si alguno de estos transportadores estaba involucrado en la entrada de piruvato se buscó otra droga capaz de inhibir a estos transportadores. Para esto se usó rifampicina, una droga coloreada capaz de inhibir sólo a los OATPs. Las células privadas de glucosa y lactato presentaron un alza en los niveles de piruvato intracelulares al usar esta droga, por lo que piruvato entró a la célula en condiciones basales sin lograr una inhibición.

Estos resultados sugieren que un OAT esté posiblemente involucrado en la entrada basal de piruvato, ya que los efectos inhibitorios de probenecid también se vieron en células en condiciones fisiológicas. De hecho, este resultado es indicativo de que piruvato está ingresando al astrocito, ya que al inhibir su entrada con probenecid éste se metabolizó y no se acumuló.

5.5 Probenecid y AR bajo condiciones fisiológicas no inhiben la entrada de piruvato al astrocito al usar altas concentraciones extracelulares de piruvato

Cuando se utilizaron los inhibidores probenecid y AR juntos en condiciones fisiológicas y se hicieron pulsos de concentraciones altas de piruvato extracelular se

logró ver un alza en los niveles intracelulares de piruvato. Con este resultado es posible plantear que existe una permeabilidad que no es sensible ni a probenecid ni a AR y permite que piruvato entre al astrocito cuando hay aumentos en el piruvato extracelular.

Como AR-C155858 es un inhibidor específico de MCT1 y sabemos que nuestros cultivos expresan ambos MCTs, no podemos descartar el posible rol participativo de MCT4 a pesar de su baja afinidad por piruvato.

5.6 Conclusiones

Los astrocitos cocultivados con neuronas expresan MCT1 y MCT4. Estos astrocitos pueden ingresar piruvato por medio de una permeabilidad distinta a MCT1 en condiciones de deprivación de glucosa y en condiciones fisiológicas, ya que al inhibir con probenecid, se vieron disminuciones en los niveles basales, lo que indica que piruvato está ingresando al astrocitos basalmente.

Las alzas de potasio extracelular activan otra permeabilidad insensible a AR y a probenecid. Con estos resultados, la hipótesis planteada no se puede rechazar por completo debido a la posible participación de MCT4 bajo condiciones de estimulación y se concluye que astrocitos de cultivo primario presentan más de una vía de permeación a piruvato en reposo y bajo activación por potasio, lo que representa un descubrimiento, ya que sólo se ha descrito a los MCTs como transportadores involucrados con la entrada/salida de este monocarboxilato.

5.7 Proyecciones

Un estudio realizado en astrocitos en *slices* de hipocampo de ratón demostró que una sonda llamada Sulforodamina 101 (SR101) los marcaba eficientemente y su entrada podía ser inhibida con sustratos de OATs y OATPs, dejando en evidencia que los astrocitos presentan estos transportadores y que participan activamente en el ingreso de sustancias. Se hace trascendental el uso de un inhibidor específico de los OATs para poder analizar su posible rol en la entrada basal de piruvato al astrocito.

Con respecto a las alzas de los niveles de piruvato observadas con alto potasio, queda por dilucidar la permeabilidad involucrada, ya que con estos experimentos se puede proponer que es independiente a la entrada basal y que los altos niveles de piruvato observados no estarían involucrados con una inhibición mitocondrial. Se espera realizar más experimentos con nuevos inhibidores.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Bittner, C. X., Loaiza, A., Ruminot, I., Larenas, V., Sotelo-Hitschfeld, T., Gutierrez, R., Cordova, A., Valdebenito, R., Frommer, W. B., and Barros, L. F. (2010). High resolution measurement of the glycolytic rate. *Front Neuroenergetics*, 2.
- Broer, S., Rahman, B., Pellegrini, G., Pellerin, L., Martin, J. L., Verleysdonk, S., Hamprecht, B., and Magistretti, P. J. (1997). Comparison of lactate transport in astroglial cells and monocarboxylate transporter 1 (MCT 1) expressing *Xenopus laevis* oocytes. Expression of two different monocarboxylate transporters in astroglial cells and neurons. *J Biol Chem*, 272(48), 30096-30102.
- Day, R. N., Booker, C. F., and Periasamy, A. (2008). Characterization of an improved donor fluorescent protein for Forster resonance energy transfer microscopy. *J Biomed Opt*, 13(3), 031203.
- De Bruin, L. A., Schasfoort, E. M., Steffens, A. B., and Korf, J. (1990). Effects of stress and exercise on rat hippocampus and striatum extracellular lactate. *Am J Physiol*, 259(4 Pt 2), R773-779.
- Dienel, G. A. (2012). Fueling and imaging brain activation. *ASN Neuro*.

- Dimmer, K. S., Friedrich, B., Lang, F., Deitmer, J. W., and Broer, S. (2000). The low-affinity monocarboxylate transporter MCT4 is adapted to the export of lactate in highly glycolytic cells. *Biochem J*, 350 Pt 1, 219-227.
- DiNuzzo, M., Mangia, S., Maraviglia, B., and Giove, F. (2010). Changes in glucose uptake rather than lactate shuttle take center stage in subserving neuroenergetics: evidence from mathematical modeling. *J Cereb Blood Flow Metab*, 30(3), 586-602.
- Dringen, R., Gebhardt, R., and Hamprecht, B. (1993). Glycogen in astrocytes: possible function as lactate supply for neighboring cells. *Brain Res*, 623(2), 208-214.
- Fellows, L. K., Boutelle, M. G., and Fillenz, M. (1993). Physiological stimulation increases nonoxidative glucose metabolism in the brain of the freely moving rat. *J Neurochem*, 60(4), 1258-1263.
- Fillenz, M. (2005). The role of lactate in brain metabolism. *Neurochem Int*, 47(6), 413-417.
- Fox, P. T., Raichle, M. E., Mintun, M. A., and Dence, C. (1988). Nonoxidative glucose consumption during focal physiologic neural activity. *Science*, 241(4864), 462-464.

- Giaume, C., Leybaert, L., Naus, C. C., and Saez, J. C. (2013). Connexin and pannexin hemichannels in brain glial cells: properties, pharmacology, and roles. *Front Pharmacol*, 4, 88.
- Halestrap, A. P., and Price, N. T. (1999). The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *Biochem J*, 343 Pt 2, 281-299.
- Hashimoto, T., Hussien, R., Cho, H. S., Kaufer, D., and Brooks, G. A. (2008). Evidence for the mitochondrial lactate oxidation complex in rat neurons: demonstration of an essential component of brain lactate shuttles. *PLoS One*, 3(8), e2915.
- Hu, Y., and Wilson, G. S. (1997). A temporary local energy pool coupled to neuronal activity: fluctuations of extracellular lactate levels in rat brain monitored with rapid-response enzyme-based sensor. *J Neurochem*, 69(4), 1484-1490.
- Katzman, R. (1976). Maintenance of a constant brain extracellular potassium. *Fed Proc*, 35(6), 1244-1247.
- Kofuji, P., and Newman, E. A. (2004). Potassium buffering in the central nervous system. *Neuroscience*, 129(4), 1045-1056.

- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- Magistretti, P. J. (2009). Role of glutamate in neuron-glia metabolic coupling. *Am J Clin Nutr*, 90(3), 875S-880S.
- Maher, F., Vannucci, S. J., and Simpson, I. A. (1994). Glucose transporter proteins in brain. *FASEB J*, 8(13), 1003-1011.
- Marcillac, F., Brix, B., Repond, C., Jöhren, O., and Pellerin, L. (2011). Nitric oxide induces the expression of the monocarboxylate transporter MCT4 in cultured astrocytes by a cGMP-independent transcriptional activation. *Glia*, 59(12), 1987-1995.
- Mueckler, M., and Thorens, B. (2013). The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Mol Aspects Med*, 34(2-3), 121-138.
- Nagai, T., Ibata, K., Park, E. S., Kubota, M., Mikoshiba, K., and Miyawaki, A. (2002). A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat Biotechnol*, 20(1), 87-90.

- Newman, L. A., Korol, D. L., and Gold, P. E. (2011). Lactate produced by glycogenolysis in astrocytes regulates memory processing. *PLoS One*, 6(12), e28427.
- Ogasawara, H., Ishida, Y., Yamada, K., Yamamoto, K., and Ishihama, A. (2007). PdhR (pyruvate dehydrogenase complex regulator) controls the respiratory electron transport system in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 189(15), 5534-5541.
- Ovens, M. J., Davies, A. J., Wilson, M. C., Murray, C. M., and Halestrap, A. P. (2010). AR-C155858 is a potent inhibitor of monocarboxylate transporters MCT1 and MCT2 that binds to an intracellular site involving transmembrane helices 7-10. *Biochem J*, 425(3), 523-530.
- Parpura, V., Heneka, M. T., Montana, V., Oliet, S. H., Schousboe, A., Haydon, P. G., Stout, R. F., Jr., Spray, D. C., Reichenbach, A., Pannicke, T., Pekny, M., Pekna, M., Zorec, R., and Verkhratsky, A. (2012). Glial cells in (patho)physiology. *J Neurochem*, 121(1), 4-27.
- Pellerin, L., Bergersen, L. H., Halestrap, A. P., and Pierre, K. (2005). Cellular and subcellular distribution of monocarboxylate transporters in cultured brain cells and in the adult brain. *J Neurosci Res*, 79(1-2), 55-64.

Pellerin, L., Bouzier-Sore, A. K., Aubert, A., Serres, S., Merle, M., Costalat, R., and Magistretti, P. J. (2007). Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: an update. *Glia*, *55*(12), 1251-1262.

Pellerin, L., and Magistretti, P. J. (1994). Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *91*(22), 10625-10629.

Pellerin, L., Pellegrini, G., Bittar, P. G., Charnay, Y., Bouras, C., Martin, J. L., Stella, N., and Magistretti, P. J. (1998). Evidence supporting the existence of an activity-dependent astrocyte-neuron lactate shuttle. *Dev Neurosci*, *20*(4-5), 291-299.

Pierre, K., and Pellerin, L. (2005). Monocarboxylate transporters in the central nervous system: distribution, regulation and function. *J Neurochem*, *94*(1), 1-14.

Rodrigues, Tiago B, Sierra, Alejandra, Ballesteros, Paloma, and Cerdán, Sebastián. (2012). Pyruvate Transport and Metabolism in the Central Nervous System. In I.-Y. Choi & R. Gruetter (Eds.), *Neural Metabolism In Vivo* (Vol. 4, pp. 715-753): Springer US.

Roth, M., Obaidat, A., and Hagenbuch, B. (2012). OATPs, OATs and OCTs: the organic anion and cation transporters of the SLCO and SLC22A gene superfamilies. *Br J Pharmacol*, *165*(5), 1260-1287.

- Ruminot, I., Gutierrez, R., Pena-Munzenmayer, G., Anazco, C., Sotelo-Hitschfeld, T., Lerchundi, R., Niemeyer, M. I., Shull, G. E., and Barros, L. F. (2011). NBCe1 mediates the acute stimulation of astrocytic glycolysis by extracellular K⁺. *J Neurosci*, 31(40), 14264-14271.
- San Martin, A., Ceballo, S., Baeza-Lehnert, F., Lerchundi, R., Valdebenito, R., Contreras-Baeza, Y., Alegria, K., and Barros, L. F. (2014). Imaging mitochondrial flux in single cells with a FRET sensor for pyruvate. *PLoS One*, 9(1), e85780.
- San Martin, A., Ceballo, S., Ruminot, I., Lerchundi, R., Frommer, W. B., and Barros, L. F. (2013). A genetically encoded FRET lactate sensor and its use to detect the Warburg effect in single cancer cells. *PLoS One*, 8(2), e57712.
- Scemes, E., and Spray, D. C. (2012). Extracellular K⁽⁺⁾ and astrocyte signaling via connexin and pannexin channels. *Neurochem Res*, 37(11), 2310-2316.
- Schnell, C., Hagos, Y., and Hulsmann, S. (2012). Active sulforhodamine 101 uptake into hippocampal astrocytes. *PLoS One*, 7(11), e49398.
- Silverman, W. R., de Rivero Vaccari, J. P., Locovei, S., Qiu, F., Carlsson, S. K., Scemes, E., Keane, R. W., and Dahl, G. (2009). The pannexin 1 channel activates the inflammasome in neurons and astrocytes. *J Biol Chem*, 284(27), 18143-18151.

- Sokoloff, L. (1993). Function-related changes in energy metabolism in the nervous system: localization and mechanisms. *Keio J Med*, 42(3), 95-103.
- Somjen, G. G. (1979). Extracellular potassium in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Physiol*, 41, 159-177.
- Sotelo-Hitschfeld, T., Niemeyer, M. I., Machler, P., Ruminot, I., Lerchundi, R., Wyss, M. T., Stobart, J., Fernandez-Moncada, I., Valdebenito, R., Garrido-Gerter, P., Contreras-Baeza, Y., Schneider, B. L., Aebischer, P., Lengacher, S., San Martin, A., Le Douce, J., Bonvento, G., Magistretti, P. J., Sepulveda, F. V., Weber, B., and Barros, L. F. (2015). Channel-mediated lactate release by K⁺-stimulated astrocytes. *J Neurosci*, 35(10), 4168-4178.
- Suzuki, A., Stern, S. A., Bozdagi, O., Huntley, G. W., Walker, R. H., Magistretti, P. J., and Alberini, C. M. (2011). Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation. *Cell*, 144(5), 810-823.
- Takanaga, H., Chaudhuri, B., and Frommer, W. B. (2008). GLUT1 and GLUT9 as major contributors to glucose influx in HepG2 cells identified by a high sensitivity intramolecular FRET glucose sensor. *Biochim Biophys Acta*, 1778(4), 1091-1099.
- Zhou, F., and You, G. (2007). Molecular insights into the structure-function relationship of organic anion transporters OATs. *Pharm Res*, 24(1), 28-36.