

Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

Profesor Patrocinante **Dr. Luis Felipe Barros Olmedo** Centro de Estudios Científicos

Profesor Co-Patrocinante **Dr. Luis Federico Batiz** Instituto de Anatomía, Histología y Patología Facultad de Medicina

MODULACIÓN DEL METABOLISMO MITOCONDRIAL DE NEURONAS HIPOCAMPALES POR LA ACTIVIDAD GLUTAMATÉRGICA

Tesis de Grado presentada como parte de los requisitos para optar al Título Profesional de *Bioquímico*

ESTEBAN FERNANDO DÍAZ JARA

VALDIVIA – CHILE 2016

DEDICATORIA

"No tienes que pensar en construir el muro más espectacular del mundo, en vez de eso, proponte en poner un ladrillo de forma más perfecta como se pueda poner. Y repite esto todos los días y ahí tienes un muro."

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera agradecer al Dr. Barros por permitirme trabajar en su laboratorio y tener la oportunidad estar en un hermoso lugar. A mis compañeros de laboratorio, especialmente Felipe Baeza, Ignacio Fernández, Rodrigo Lerchundi y Nicolás Martínez, por enseñarme y compartir sus conocimientos conmigo, que me sirvieron para desarrollarme tanto en el ámbito científico, como personal.

Quisiera agradecer a la Universidad Austral de Chile, sede Valdivia, por ser mi casa de estudios durante estos años y a los profesores que han aportado su sabiduría para mi formación.

Agradecer a mis amigos y seres queridos por apoyarme siempre en las buenas, como en las malas situaciones, especialmente a Tatto, Sergio, Marco, Luis y al grupo "Los preciosos".

Y por último agradecer a mi familia por su amor incondicional y apoyo permanente que me entregan diariamente.

Este trabajo fue realizado en el Centro de Estudios Científicos (CECs), y fue financiado por el programa de financiamiento basal PFB01/2007.

ÍNDICE

Tabla de contenido

1. RESUMEN	1
1.1 SUMMARY	2
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1 Sinapsis.	3
2.2 Tono excitatorio e inhibitorio en el sistema nervioso central	4
2.2.1 Transmisión excitatoria mediada por Glutamato	6
2.2.2 Transmisión inhibitoria mediada por GABA.	7
2.3 Homeostasis energética cerebral	9
2.3.1 Uso de energía durante actividad neuronal	9
2.3.2 Metabolismo energético Cerebral.	10
2.3.3 Metabolismo energético neuronal	13
2.4 El uso de piruvato como parámetro del flujo mitocondrial	14
3. MATERIALES Y MÉTODOS	17
3.1 Materiales	17
3.1.1 Animales	17
3.1.2 Reactivos	17
3.2 Métodos	
3.2.1 Cultivo primario de neuronas de hipocampo	
3.2.2 Transfección de los sensores de Piruvato, ATP y radio ATP/ADP	19
3.2.3 Medición de Piruvato, ATP y el radio ATP/ADP	
3.2.4 Medición del $\Delta \psi_m$	26
3.2.5 Medición de Ca ⁺² intracelular	26
3.2.6 Análisis estadístico.	27
4. RESULTADOS	28
4.1 Efecto de GABA, Glutamato y Bicuculina en el cultivo neuronal	28
4.2 Efectos del glutamato exógeno en el metabolismo del piruvato.	34
4.2.1Efectos del glutamato en el metabolismo del piruvato en condiciones	31
แอเบเบรูเบลอ	

4.2.2 Efectos del glutamato en el estado estacionario del piruvato	36
4.2.3 Efecto del glutamato sobre la tasa de consumo basal de piruvato	36
4.3 Efectos del bicuculina en el metabolismo del piruvato	39
4.3.1 Efectos de la bicuculina en el metabolismo del piruvato en condiciones fisiológicas.	39
4.3.2 Efectos de la bicuculina sobre el piruvato citoplasmático.	41
4.3.3 Efecto de la bicuculina sobre la tasa de consumo de piruvato	44
4.4 Modulación del ATP durante actividad neuronal	47
4.4.1 Efecto del glutamato exógeno en el nivel de ATP y la razón ATP/ADP citosólico.	47
4.4.2 Efecto del bicuculina en el ATP y la razón ATP/ADP citosólico	51
4.5 Efecto del glutamato y bicuculina sobre el $\Delta \psi_m$	52
5. DISCUSIÓN	53
6. BIBLIOGRAFÍA	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Las dos modalidades de la transmisión sinaptica5
Figura 2. Esquema de transmisión glutamatérgica y gabaergica8
Figura 3. Mecanismos de consumo de energía en transmisión glutamatérgica
excitatoria11
Figura 4. Esquema representativo del metabolismo de la glicolisis
Figura 5. Metabolismo del piruvato15
Figura 6. Esquema de los sensores y medición de fluorescencia en célula única20
Figura 7. Esquema Setup experimental23
Figura 8. Mediciones de las razones de fluorescencia de los nanosensores24
Figura 9. Efecto de GABA, Glutamato y Bicuculina en el cultivo neuronal
Figura 10. La presencia de glutamato exógeno produce el aumento del piruvato en
condiciones fisiológicas35
Figura 11. El glutamato produce una disminución del estado estacionario de piruvato.37
Figura 12. Dos posibles explicaciones de la disminución del estado estacionario de
piruvato durante la exposición a glutamato
Figura 13. El glutamato agudiza la tasa de consumo de piruvato40
Figura 14. La presencia de bicuculina induce la disminución del piruvato en
condiciones fisiológicas
Figura 15.La bicuculina produce un aumento del estado estacionario de
piruvato43

Figura 16. Dos posibles explicaciones del aumento del estado estacionario de piruv	ato
durante la exposición a bicuculina	45
Figura 17. La bicuculina no produce cambios en la tasa de consumo	de
piruvato	46
Figura 18. Caída del ATP citosolico tanto a la exposición a glutamato, como) a
picuculina, aunque, solo la presencia del neurotransmisor causa la caida	del
Δψ _m	.48

LISTADO DE ABREVIATURA

AM	Acetoximetil-ester
AMPA	(α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid)
ATP	Adenosín trifosfato
Bicuculina	1(S),9(R)-(-)-Bicuculline methiodide
CFP	Proteína fluorecente Cian
DNQX	(6,7dinitroquinoxalino-2,3-diona)
DIV	Días in vitro
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FRET	Transferencia de energía resonante
GABA	Acido γ-aminobutrico
GLUT	Transportador de glucosa
HEPES	[N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-acido etansulfonico)]
МСТ	Transportador de monocarboxilatos
MK-801	Dizocilpina
NMDA	N-Metil D-acido aspártico
Pyr	Piruvato.
TMRM	Ester metílico tetrametIrodamina
$\Delta \psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial

1. RESUMEN

El sistema nervioso central da cuenta de un 20% del consumo de glucosa en reposo, determinado principalmente por las neuronas, que consumen adenosín trifosfato (ATP) para el restablecimiento de los gradientes electroquímicos disipados por la actividad sináptica. Se acepta que la producción de ATP por la fosforilación oxidativa a nivel mitocondrial, satisface la mayor parte de los requerimientos energéticos de la neurona, tanto en condiciones de reposo, como en actividad.

El objetivo de este trabajo fue caracterizar la modulación de la actividad metabólica mitocondrial durante la actividad glutamatérgica en cultivos primarios de neuronas hipocampales, utilizando nanosensores codificados genéticamente que miden los niveles citoplasmáticos de piruvato, producción de ATP y ATP/ADP, en conjunto con sondas para medir el calcio (Ca⁺²) y el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta \psi_m$).

Los resultados mostraron que los cultivos neuronales responden tanto a glutamato exógeno como a glutamato endógeno (mediante el bloqueador de los receptores GABA, bicuculina) con aumentos del calcio citosólico, pero, solo el glutamato exógeno pudo aumentar el consumo mitocondrial de piruvato y despolarizar la mitocondria. Paralelamente, se observaron caídas del ATP citosólico en respuesta tanto a glutamato, como a bicuculina.

En conclusión, el presente estudio sugiere que el metabolismo mitocondrial respondería en forma distinta a glutamato exógeno y al glutamato endógeno.

1.1 SUMMARY

The central nervous system accounts for 20% of glucose consumption at rest, determined primarily by neurons, which consume adenosine triphosphate (ATP) for the restoration of electrochemical gradients dissipated by synaptic activity. It is accepted that the production of ATP by oxidative phosphorylation at the mitocondrial level, satisfies most of the energy requirements of the neuron, both at rest and in activity.

The aim of this study was to characterize the modulation of mitochondrial metabolic activity during glutamatergic activity in primary cultures of hippocampal neurons, using genetically encoded nanosensors that measure the cytoplasmic levels of pyruvate, ATP and ATP / ADP, together with probes to measure calcium (Ca⁺²) and mitochondrial membrane potential ($\Delta \psi m$).

The results showed that neuronal cultures respond to both exogenous glutamate as endogenous glutamate (by the blocking of GABA receptors, by bicuculline) with increases in cytosolic calcium but only exogenous glutamate could increase the mitochondrial consumption of pyruvate and depolarize mitocondria. Similarly, were observe falls of cytosolic ATP in response to both glutamate, as bicuculline.

In conclusion, this study suggests that mitochondrial metabolism responds differently to exogenous and endogenous glutamate.

2. INTRODUCCIÓN

El funcionamiento del metabolismo cerebral ha perdurado como una de las grandes interrogantes para la ciencia, producto de la alta complejidad de los procesos que se encargan de integrar la información presente en el ambiente celular próximo y periférico.

Se ha definido que nuestro cerebro consume un 20% del gasto energético corporal, aun cuando éste sólo constituye un 2% del peso del individuo. El principal responsable de esta alta demanda energética es la neurona, la que requiere 3,4x10⁸ ATP/s en contraste con astrocitos donde disminuye a 1x10⁸ ATP/s. Las causas recaen en el potencial de acción y en los potenciales post sinápticos, observando valores de 15,4 x10⁸ ATP/s y 13,0 x10⁸ ATP/s, respectivamente, correspondiendo al 47% y 34% de la demanda total. En ambos casos, la restauración del gradiente de iones por la bomba Na⁺/K⁺ es el motivo de este costoso gasto de energía. (Attwell y Laughlin, 2001). Estos antecedentes demuestran la importancia de la regulación del metabolismo energético en el funcionamiento del sistema nervioso central.

2.1 Sinapsis.

La comunicación neuronal es el principal mecanismo para la transmision e integración de la información en nuestro sistema nervioso central y periferico, siendo definida en regiones celulares identificables, llamadas sinapsis. Según el tipo de transmisión de la información se han descrito sinapsis químicas y eléctricas.

La sinapsis química se establece entre neuronas que se encuentran a 20-30 nanometros (nm) de distancia, transmitiendo el impulso nervioso mediante neurotransmisores que son liberados por la neurona pre-sináptica frente a un potencial

de acción y capturados por la neurona post-sinaptica, mediante receptores ionotrópicos (canales ionicos activados por ligando) y receptores metabotrópicos (receptores acoplados a proteína G). La activación de estos receptores gatillan diversas modificaciones que van desde cambios en el potencial de reposo, hasta la traducción de genes (Sheng *et al*, 2011). (**Figura 1A**)

Por su parte, la sinapsis eléctrica transmite la información mediante canales intercelulares denominados gap junctions (Bennet *et al*, 2004), formados mediante el acoplamiento de dos hemicanales de conexina, que unen el citoplasma de la neurona pre-sinaptica con la neurona post-sinaptica (Goodenough *et al*, 2009). (**Figura 1B**). Esta comunicación entre ambas células permite el paso bidireccional de las corrientes electricas y de moléculas como Ca⁺², inositol-1,4,5-trifosfato, ATP, entre otras.

2.2 Tono excitatorio e inhibitorio en el sistema nervioso central

La transmisión del impulso nervioso se caracteriza por la utilización de neurotransmisores que son los encargados de transmitir la información desde la neurona pre-sináptica hacia la neurona post sináptica. Estos se clasifican en dos categorías relacionados con su actividad global, siendo los excitatorios aquellos que aumentan la probabilidad de generar un potencial de acción, como el glutamato, epinefrina y norepinefrina. Por otra parte, los neurotransmisores inhibitorios ejercen una disminución de la probabilidad de un potencial de acción, siendo los más importantes GABA, glicina y serotonina.



Figura 1. Las dos modalidades de la transmisión sinaptica.

A) Sinapsis química. Gatillada por cambios en el potencial de acción que desencadenan la despolarización de la neurona pre-sinaptica, generando la activación de los canales de calcio dependientes de voltaje (VGGCs) que permiten la secreción de neurotransmisores hacia la hendidura sinaptica. Estas moléculas son reconocidas por receptores ubicados en la membrana plasmática de la neurona post-sinaptica, generando diversos eventos post-sinapticos.

B) **Sinapsis eléctrica.** Mediada por grupos de canales intercelulares llamados gap juctions que conectan dos células adyacentes, permitiendo el paso bidireccional del impulso nervioso, iones , mensajeros intracelulares y pequeños metabolitos. (Adaptado de Perada *et al*, 2014)

2.2.1 Transmisión excitatoria mediada por Glutamato.

El Glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio del sistema nervioso central, secretado por neuronas piramidales del neocortex e hipocampo (Sheng *et al* 2007), determinando muchas formas de plasticidad sináptica implicada en procesos de aprendizaje y memoria (Kullmann, 2007). Este es capaz de unirse a dos tipos de receptores, los metabotrópicos, (que se encuentran acoplados a proteínas G y que efectúan una señalación intracelular a través de mensajeros secundarios), y receptores lonotrópicos (que son canales iónicos dependientes de ligando). La activación de estos canales conlleva un incremento en la permeabilidad de la membrana celular a cationes Na⁺, K⁺ y Ca⁺², principalmente. Dentro de los canales ionotrópicos se encuentran los receptores AMPA, NMDA y Kainato, implicados en procesos de transmisión glutamatérgica rápida, plasticidad neuronal y otros procesos celulares.

La transmisión glutamatérgica comienza por la activación de los canales ionotrópicos dependientes de glutamato y el primero en activarse es el receptor AMPA, permitiendo principalmente el flujo de iones Na⁺. La entrada de estos cationes influye en la reducción del potencial de membrana de la neurona, permitiendo su despolarización, liberando los iones Mg⁺² que se encuentran bloqueando los receptores tipo NMDA. En conjunto con la entrada de Na⁺ ingresan iones Ca⁺² y salen de iones K⁺. La despolarización activa de canales dependientes de voltaje (VGCCs), gatillando el potencial de acción (Murakoshi y Yasuda, 2012).

2.2.2 Transmisión inhibitoria mediada por GABA.

En mamíferos el principal neurotransmisor inhibitorio en el sistema nervioso central es el ácido γ -amino butírico (GABA). La síntesis de este neurotransmisor es ejecutada por la enzima ácido glutámico descarboxilasa (GAD), utilizando el glutamato como sustrato (Ovens *et al*, 2002). Las neuronas que sintetizan este neurotransmisor son conocidas como neuronas gabaergicas. A nivel del neocortex y el hipocampo las interneuronas gabaergicas cumplen un rol en balancear las transmisiones excitatoria para una función estable del cerebro (Cherubini y Conti, 2001).

El mecanismo de acción de GABA ejerce funciones tanto a nivel de la neurona pre sináptica como en la post sináptica, puesto que ambas células expresan receptores que reconocen el neurotransmisor. Estos receptores son clasificados en receptores gabaergicos tipo A (r GABA_a), que son receptores ionotrópicos que permiten el ingreso de aniones (Cl⁻), y receptores gabaergicos tipo B (r GABA_b), que son receptores metabotrópicos acoplados a proteína G. Los receptores gabaergicos tipo "A" al activarse permiten el flujo al interior de iones Cl⁻ produciendo la negatividad del potencial de membrana que conlleva a la hiperpolarización, actuando a nivel de la neurona post-sináptica. Mientras que los receptores gabaergicos tipo "B" actúan a nivel de la neurona post sináptica actúan en diferentes blancos como en la apertura de canales de K⁺ para producir la hiperpolarización de la célula, inhibición de los canales dependientes de ligando y en la inhibición de la adenilato ciclasa que requila la



Figura 2. Esquema de transmisión glutamatérgica y gabaérgica.

Diagrama de las acciones locales de la transmisión excitatoria mediada por glutamato y transmisión inhibitoria por GABA. Los receptores ionotrópicos de GABA tipo "a" y los receptores metabotrópicos de GABA tipo "b" que influencian la entrada de cationes (Na⁺ y Ca⁺²) y el potencial de membrana (V_m), mediante la regulación de los receptores de glutamato (receptores AMPA y receptores NMDA.) (Adaptado de Higley, 2014)

actividad de PKA, componente importante para la activación de los receptores NMDA (Higley, 2014).

Desregulaciones en el balance entre la excitación e inhibición están involucradas en diversas enfermedades psiquiátricas como esquizofrenia, autismo y epilepsia (Lewis, 2007) (Gollolla *et al*, 2009). Una molécula que ha permitido estudiar algunas de estas patologías en modelos in vitro, es la bicuculina (Curtis, 1970). Esta molécula es un antagonista de los receptores GABA tipo "A", y que se ha atribuido acciones convulsionantes, imitando a la epilepsia (McLennan, 1970). Esta propiedad es utilizada en diversos laboratorios alrededor del mundo en el estudio de la epilepsia en modelos in vitro, además es utilizado para aislar la función excitatoria glutamatérgica.

El hipocampo es el principal modelo del estudio de la transmisión glutamatérgica y gabaérgica, debido a que la población de células nerviosas en el hipocampo es relativamente simple en comparación con la mayoría de otras regiones del sistema nervioso central, entre ellas se distinguen las neuronas piramidales glutamatérgicas y las interneuronas gabaérgicas (Kaech. S y Banker. G, 2006).

2.3 Homeostasis energética cerebral

2.3.1 Uso de energía durante actividad neuronal

El ATP es el nucleótido fundamental para la obtención de energía a nivel celular. El cerebro está sujeto a cambios en los niveles de ATP, principalmente durante la transmisión sináptica (Attwell y Laughlin, 2001; Hal *et al.* 2012; Harris *et al*, 2012). El consumo de ATP es requerido en gran medida en el bombeo de iones para poder mantener el potencial de reposo y equilibrar el gradiente electroquímico. Otras vías que se utilizan el ATP en menor grado en las vías bioquímicas de la transmisión sináptica y el reciclaje de las vesículas pre sinápticas (Harris *et al*, 2012; Engl y Attwell, 2015; Rangaraju *et al.*, 2014). Se ha estimado su uso a nivel de la corteza cerebral de rata (Atwell y Laughlin, 2001) y en corteza de humanos (Lennie, 2003) y en procesos subcelulares de señalización en el cerebro **(Figura 3)**.

2.3.2 Metabolismo energético Cerebral.

Se ha descrito que la glucosa es el principal sustrato energético en el cerebro humano (Sokoloff, 1960) y las vías implicadas en su metabolismo (Figura 4). En nuestro laboratorio se ha reportado que existe una inhibición aguda del transporte de glucosa en neuronas hipocampales al ser expuestas a glutamato (Porras et al, 2004). Otros grupos postulan que existe un consumo de la glucosa durante la actividad neuronal pero que su metabolismo está implicado en las vías de las pentosas fosfato, vía principal de producción de antioxidante NADPH, y no estaría implicada en la glicolisis (Herrero-Mendez et al, 2009). Por otra parte los astrocitos, que son el otro gran grupo celular en el cerebro, aumentarían el consumo de glucosa en presencia de señales neuronales como K⁺ (Sotelo *et al*, 2015) y aumento de la producción de lactato en presencia de NH4⁺ (Lerchundi et al., 2015). Estos antecedentes han llevado a postular que los diferentes tipos celulares cerebrales poseen perfiles metabólicos distintos (Magistretti y Allaman, 2015). Las neuronas poseen un perfil metabólico oxidativo, mientras que los astrocitos que tienen un perfil metabólico glicolítico (Belanger et al., 2011; Hyder et al., 2006; Zhang et al., 2014). Que las neuronas



Figura 3. Mecanismos de consumo de energía en transmisión glutamatérgica excitatoria.

A nivel pre sináptico, el ATP es utilizado por cuatro ATPasas: La bomba Na⁺/K⁺, que expulsa iones Na⁺ generados por el potencial de acción y las corrientes de iones Ca^{+2} , removido por el intercambiador Na⁺/Ca⁺²; la bomba de Ca⁺² ubicada en la membrana plasmática y en el retículo endoplasmatico; las bombas de protones (H⁺) que permiten la activación de las vesículas, en conjunto con las proteínas motor (kinesinas, dineinas) que mueven las mitocondrias y vesículas dentro de la célula. En la neurona post sináptica el mayor consumo de ATP está dado por el bombeo de iones (Na⁺ y Ca^{+2}) que median el potencial de acción y el tráfico de mitocondrias, dado principalmente por las proteínas de transporte. En astrocitos el uso de ATP es para mantener el potencial de membrana en reposo por la exclusión de los iones Na⁺ que provienen de la captación de glutamato. (Adaptado de Harris *et al*, 2012).



Figura 4. Esquema representativo del metabolismo de la glicolisis.

La glucosa entra a las células mediante los transportadores de glucosa (GLUTs) y es fosforilada por la enzima hexoquinasa (HK) para la producción de glucosa-6-fosfato (Glucosa-6P). Este sustrato es metabolizado en la glicolisis (1), que finaliza en la producción de dos moléculas de piruvato y en la producción de ATP y NADH. El piruvato puede entrar a la mitocondria, donde es metabolizado por el ciclo de los ácidos tricarboxilicos (o también conocido como el ciclo de Krebs) y la fosforilación oxidativa (2), produciendo ATP y CO₂ mientras se consume oxígeno, generándose entre 30 y 36 moléculas de ATP. En condiciones hipóxicas, el piruvato es reducido a lactato y este puede ser exportado hacia el espacio extracelular mediante los transportadores de monocarboxilatos (MCTs) (Adaptado de Magistretti y Allaman, 2015).

presenten un perfil metabólico oxidativo hace referencia a la oxidación completa de glucosa u otro metabolito, como piruvato o lactato en la mitocondria, resultando en la producción de 31 moléculas de ATP por molécula de glucosa (o 13,5 y 14,5 moléculas de ATP si los sustratos son monocarboxilatos como piruvato y lactato, respectivamente), dependiendo del grado de acoplamiento con la fosforilación oxidativa. Los procesos mitocondriales implican el ciclo de los ácidos tricarboxilicos (TCA), la transferencia de electrones en la cadena respiratoria, consumo de oxígeno y la producción de CO₂ y agua. Mientras que el perfil glicolítico es la formación de dos moléculas de ATP a partir de glucosa a piruvato. El lactato también es formado por la glicolisis. En condiciones de baja concentración de oxígeno, el piruvato es reducido a lactato en un proceso que permite la generación de NAD⁺, factor esencial para mantener el flujo glicolítico (Allaman y Magistretti, 2013), aunque también este efecto puede suceder en condiciones aeróbicas (Warburg, 1956). Estas diferencias de perfiles metabólicos quedan elucidadas en las diferencias en la tasa de producción de CO₂, siendo mayores en neuronas a comparación a los astrocitos. (Hamberger y Hyden., 1963; Hyden y Lange, 1962).

2.3.3 Metabolismo energético neuronal.

Las neuronas son capaces de obtener ATP a partir del metabolismo, tanto de glucosa como de lactato (Pellerin *et al*, 1998) y ambos sustratos son capaces de mantener la actividad sináptica y eléctrica (Schurr, 2006). Se ha reportado que los incrementos de Ca⁺² en el citosol durante la actividad neuronal estimula la producción de ATP mediante el incremento de la fosforilación oxidativa en la mitocondria

(Rangaraju *et al*, 2014; Chouhan *et al*., 2012). Estos antecedentes respaldan la importancia de la mitocondria para la producción de ATP mediante la fosforilación oxidativa y la mantención de la homeostasis energética durante la activad neuronal (Hall *et al*., 2012; Magistretti y Allaman, 2015).

2.4 El uso de piruvato como parámetro del flujo mitocondrial.

El piruvato es un monocarboxilato, el cual participa en múltiples vías metabólicas anabólicas y catabólicas, como el metabolismo aeróbico y anaeróbico de la glucosa, gluconeogénesis, lipogénesis *de novo*, síntesis de colesterol y el ciclo de Krebs (McComimis y Finck, 2015), siendo producido en el citosol. Luego de su síntesis, es transportado a la matriz mitocondrial, para su metabolización (Gray *et al.,* 2014; McComimis y Finck, 2015). (**Figura 5**).

En la actualidad existen herramientas fluorescentes genéticamente codificadas que permiten la medición del piruvato citoplasmático, presentando una alta resolución espacial de célula única y una temporalidad de segundos. Una de estas herramientas es el PYRONIC (Pyruvate Optical Nanosensor from CECs), que es un nanosensor FRET (Föster resonance energy transfer) codificado genéticamente. Este nanosensor permite medir transporte, producción y consumo mitocondrial del piruvato en células individuales y a alta resolución temporal (San Martín *et al*, 2014). Otra herramienta es el biosensor basado en BRET (Bioluminiscence resonance energy transfer en inglés), que es basado en la actividad del transportador de piruvato mitocondrial (MPC) (Compan *et al*, 2015). Estas tecnologías han permitido elucidar más sobre la modulación del metabolismo energético mitocondrial en procesos celulares rápidos.



Figura 5. Metabolismo del piruvato.

El piruvato es obtenido mediante la glicolisis o la oxidación del lactato, ingresando la matriz mitocondrial para ser metabolizado a través del transportador de piruvato MPC. En la matriz mitocondrial, este carboxilato puede ser transformado a acetil-coenzima A (Acetil-coa) o en oxalacetato por la piruvato carboxilasa (PC). Este último proceso permite reponer los intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxilicos (TCA). El oxalacetato puede entrar al TCA o ser exportado hacia el citosol para ser convertido en fosfoenolpiruvato por la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PPCK) para poder entrar a la gluconeogénesis. El piruvato también puede ser convertido en alanina a nivel mitocondrial. (Adaptado de Gray *et al*, 2014) La transmisión glutamatérgica es un proceso fundamental para el traspaso de la información a nivel cerebral, aunque es demandante en términos energéticos para las neuronas, siendo necesaria la generación de ATP mediante la fosforilación oxidativa. Aunque se sabe que la mitocondria es el mayor productor de ATP en neuronas, aún está poco dilucidada la modulación de su actividad durante la transmisión glutamatérgica. Considerando el alto gasto energético neuronal requerido para restablecer el gradiente iónico durante la actividad glutamatérgica y la necesidad de la actividad mitocondrial para satisfacer estos requerimientos, se plantea la siguiente hipótesis:

"La actividad excitatoria glutamatérgica agudiza el metabolismo del piruvato en neuronas hipocampales".

Objetivo general : Describir el efecto de la neurotransmisión glutamatérgica sobre el metabolismo del piruvato en neuronas hipocampales.

Objetivos específicos

- 1.1 Realizar mediciones de Ca⁺² citoplasmáticos en los cultivos neuronales hipocampales en presencia de diferentes moléculas que regulan la actividad excitatoria neuronal, tales como GABA, glutamato y bicuculina.
- 1.2 Evaluar el efecto de glutamato sobre el metabolismo del piruvato.
- 1.3 Evaluar el efecto de la bicuculina sobre el metabolismo del piruvato.
- 1.4 Evaluar el efecto de glutamato y bicuculina en parámetros fisiológicos mitocondriales y el ATP citosólico.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Animales

En este estudio se utilizaron hipocampos de embriones provenientes de ratonas cepa B&B/CBA con 17,5 días de gestación. Estos animales fueron mantenidos a temperatura ambiente (20 ±2) °C, en un ciclo día/noche de 12 horas y con acceso libre a comida y agua en las dependencias del bioterio del Centro de Estudios Científicos. Los experimentos fueron aprobados y estuvieron estrictamente ceñidos a los estándares del comité de uso y cuidado de animales del Centro de Estudios Científicos.

3.1.2 Reactivos

El sulfato de magnesio, bicarbonato de sodio, D-glucosa, L-lactato, lactato de sodio, piruvato de sodio, buffer HEPES y 1 (S), 9®-(-)- Bicuculina metiodida de Sigma Chemical Co. Otras sales como cloruro de sodio, cloruro de potasio y cloruro de calcio se obtuvieron de Merck & Co. El medio Neurobasal, suplemento B27, penicilina-estreptomicina, fungizona y tripsina- EDTA fueron obtenidos en Gibco. El suero fetal de Hyclone, lipofectamina 300, sonda sensible a pH BCECF-AM y la sonda sensible a calcio Fluo-4 AM en Invitrogen. Los antagonistas DNQX y (+) MK801de maleato son de Tocris.

3.2 Métodos

3.2.1 Cultivo primario de neuronas de hipocampo.

Ratonas preadas con 17,5 días de gestación son sacrificadas por dislocación cervical. Posteriormente se realiza la incisión en el vientre para la extracción de los embriones, los cuales son sacrificados por decapitación y las cabezas depositadas en medio HANK'S (100µM HEPES acido, 1,36 µM NaCl, 74 µM KCl, 50 µM Glucosa, 44 μ M KH₂PO₄, rojo fenol, pH 7.4) con 10²UI-10² μ g/ml penicilina-estreptomicina y 2.5 µg/mL fungizona a 4°C. Luego se realiza la obtención de los hipocampos libres de meninges a través de micro disección, que son digeridos con tripsina-EDTA 1x durante 5 minutos a 37°C. La reacción se detiene con la adición de medio Neurobasal-B27 10mM glucosa suplementado con 5% SBF, 2mM piruvato, 1mM glutamina, 2,5 µg/mL fungizona, 10²UI- 10² µg/mL penicilina-estreptomicina. Inmediatamente se procede a realizar la disgregación mecánica de los tejidos, obteniéndose una mezcla de neuronas y astrocitos en suspensión. Esta suspensión de células son plaqueadas sobre cubreobjetos de 25mm que fueron previamente tratados con poli-L-lisina (1g/L) en medio Neurobasal B27 10mM glucosa, 5% SBF y se incuban durante 120 minutos en una atmósfera artificial con 5% CO2 -95% aire a 37°C. Después del tiempo de incubación se remplaza el medio por Neurobasal suplementado con 2mM glutamina, 1mM piruvato, 2% B27, 2,5 µg/mL fungizona, 10²UI- 10² µg/mL penicilinaestreptomicina.

Las células fueron utilizadas entre los días 12 y 14 de realizado el cultivo con un 60-80 % de confluencia por placa. El medio Neurobasal es parcialmente reemplazado cada 4 días.

3.2.2 Transfección de los sensores de Piruvato, ATP y razón ATP/ADP.

Utilizando cultivos de 12 días in vitro (DIV), se realizaron las transfecciones con el sensor de Piruvato, ATP o razón ATP/ADP mediante el método de lipofección con lipofectamina 3000. A las placas se agregó el medio de lipofección en medio Neurobasal-B27 10mM glucosa suplementado con 2mM piruvato, 1mM glutamina, 2,5 μ g/mL fungizona, 10²UI- 10² μ g/mL penicilina-estreptomicina. Las placas se incuban 5 horas en una atmósfera artificial de 5% CO₂ y 95% O₂. Después del tiempo de incubación, se reemplaza el medio de la placa y luego de dos días se utilizaron.

3.2.3 Medición de Piruvato, ATP y la razón ATP/ADP.

La medición de ATP, piruvato y la razón ATP/ADP se realizó a través de la fluorescencia emitida por los nanosensores ATeam 1.03 (Imamura *et al*, 2009), PYRONIC (San Martín *et al*, 2014) y PercevalRH (Tantama *et al*, 2013), respectivamente (**Figura 6**). Estos nanosensores son capaces de sensar las fluctuaciones de piruvato y ATP intracelular a través de la técnica de energía resonante de Föster (FRET), eso se debe a que poseen un dominio central de unión a piruvato o ATP y dos proteínas fluorescentes (una en cada extremo) capaces de realizar la transferencia de energía, mientras que el PercevalHR es un biosensor que presenta un sitio de unión para ATP o ADP.



Figura 6. Esquema de los sensores y medición de fluorescencia en célula única.

En (A) se observa el sensor de ATP citosolico Ateam, donde se distingue en azul oscuro la proteína de unión de ligando a ATP y en sus extremos se encuentran las proteínas fluorescentes CFP y Venus. Cuando no hay ligando unido al sensor la eficiencia del FRET está muy disminuida, lo cual se revierte cuando el sustrato se une y genera un cambio conformacional en el sensor, reduciendo la distancia entre ambas proteínas fluorescentes, observándose un incremento en la transferencia de energía de CFP a Venus. En (B) se muestra un esquema del sensor de piruvato PYRONIC, está constituido por el segmento de sensing unido en cada extremo a las proteínas mTFP y Venus. Este sensor es inversamente proporcional a la concentración de metabolito, al tener una alta eficiencia de FRET al encontrarse vacío el sitio de sensing, mientras que al unirse una molécula al sitio de sensing produce la baja del rendimiento del FRET. En (C) se muestra un esquema del biosensor del radio ATP/ADP PercevalHR, donde se distingue un sitio de unión para ATP o ADP, dependiendo si se une ATP aumenta la fluorescencia a 500 nm, pero si se une ADP aumenta la fluorescencia a 420 nm pero este punto corresponde al punto isobestico.

Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (22-25 °C), en una solución KRH/HCO₃⁻ gaseada con 95% aire y 5% CO₂. Para las mediciones de piruvato y ATP citoplasmáticos se utilizó el microscopio confocal Olympus FV1000 equipado con un objetivo de inmersión en agua de 20x (N.A 0.95), un láser sólido de 440nm, además cuenta con monocromadores CAIRN (Faversham, UK) y una cámara Hamatsu Orca asociada el software Fluoview (Figura 7). Para realizar las mediciones de la razón de fluorescencia, las células fueron excitadas con el láser 440 nm, luego la emisión fue dividida con un optosplit CAIRN, equipada con filtros de paso de banda a 480 ± 20 nm (CFP y mTFP) y 535 ± 15 nm (Venus). Mientras que las mediciones de la razón ATP/ADP se realizaron en el microscopio invertido Olumpus IX70 equipado con un objetivo de inmersión en aceite 40X (N.A 1.3), un monocromador y Optoslpit Cairn (Faversham, UK), una lámpara de xenón como fuente de excitación y una cámara CCD Hamamatsu Orca que se encontraba controlada por el software Kinetics (Kinetics imaging). Las células utilizadas para estas mediciones fueron excitadas con la lámpara de xenón a 420 y 490 nm durante tiempos de exposición de 35 y 60 milisegundos respectivamente.

Los datos fueron presentados como la razón de fluorescencia entre la emisión de CFP o Venus y la emisión de YFP o Venus, en orden respectivo para los sensores de ATP y piruvato, mientras que en el caso del sensor del radio ATP/ADP los datos fueron presentados como la razón de fluorescencia de las dos longitudes de onda que es excitable el sensor (F490/F420) (**Figura 8**).

22



Figura 7. 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 CFP/Venus (4) y YFP/Venus (5). Ambas señales son captadas por una cámara manejada por un software que entrega un resultado a tiempo real durante el experimento.



Figura 8. Mediciones de las razones de fluorescencia de los nanosensores.

Las señales de fluorescencia tanto para CFP, mTFP y F420 (cian) como Venus o F490 (verde claro) se grafican tanto para el sensor de ATP Ateam 1.03(A), como el sensor de piruvato Pyronic (B) y el sensor del radio ATP/ADP PercevalHR (C). Con los valores obtenidos de unidades arbitrarias (U.A) de fluorescencia se calcula la razón de ambos canales, tal como se muestra en la parte inferior de los cursos temporales de ambos tipos de sensores.

Los resultados de piruvato intracelular fueron expresados como la razón de las proteínas fluorecentes(mTFP/Venus) que componen el PYRONIC, aunque los datos utilizados para los gráficos de barra y celulas individuales corresponden a los puntos sealados con flechas de diferentes colores que se encuentran en los cursos temporales. En todas las mediciones de piruvato se realizó una calibración interna previa al experimento, el que consistía en la utilización de un buffer KRH/HCO₃⁻ enriquecido con 2 mM glucosa y 1 mM lactato, luego de eso se realizó un pulso durante 3 minutos con un buffer 5 mM piruvato, esto nos permite verificar que nuestro sensor se encuentra funcional en nuestra célula.

Los datos de ATP se encuentran expresados como la razón de las proteínas fluorecentes (CFP/Venus), en el caso del Ateam, o las longuitudes de onda (F490/F420) en el caso del PercevalHR. La selección de datos para los gráficos de barra corresponde al último punto antes de la estimulación, denominado control, y el último punto de la estimulación.

Los ensayos se realizaron con un sistema de perfusión utilizando tampón Krebs Ringer Hepes gasificado con 95% $O_2/5\%$ CO₂ (KRH en mM: NaCl 112, KCl 3, MgSO₄ 1.25, CaCl₂ 1,25, HEPES 10, NaHCO₃ 24, glucosa 2, lactato 1, pH ajustado a 7,2 con NaOH).

25

3.2.4 Medición del $\Delta \psi_m$.

Las células fueron cargadas por un periodo de 45 minutos con la sonda catiónica fluorescente ester metílico tetrametilrodamina (TMRM) a una concentración final de 20 μ M en una atmosfera de 5% CO₂ / 95% aire en tampón KRH/HEPES suplementado con 2mM glucosa y 1 mM Lactato. Luego del tiempo de incubación, las células se lavaron con un buffer KRH/HCO₃⁻ en tres oportunidades.

Durante el experimento las células fueron perfundidas con un buffer KRH/HCO₃⁻ suplementado con 2 mM glucosa y 1 mM lactato y excitadas cada 5 segundos con un laser a 543 nm y la emisión fue captada a los 550-580 nm por el microscopio Olympus FV1000. La fluorescencia obtenida de TMRM fue expresada como intensidad fluorecencia TMRM normalizada con respecto a la fluorecencia basal (F/F0). La selección de datos para el grafico de barra fue el ultimo punto antes de la exposición, denominado control, mientras que el otro valor seleccionado corresponde al último punto de la estimulación.

3.2.5 Medición de Ca⁺² intracelular.

Las células fueron cargadas por un periodo de 30 minutos con Fluo-4 AM a una concentración final de 4 μ M en una atmósfera de 5% CO₂ / 95% aire en tampón KRH/ HEPES suplementado con 2mM glucosa y 1 mM Lactato. Luego del tiempo de incubación, las células se lavaron con un buffer KRH/HCO₃⁻ en tres oportunidades. Durante el experimento las células fueron perfundidas con un buffer KRH/HCO₃⁻ suplementado con 2 mM glucosa y 1 mM lactato y excitadas cada 5 segundos con un

láser a 490 nm y la emisión fue captada a los 505-550 nm por el microscopio Olympus FV1000. La fluorescencia obtenida de Fluo-4 AM fue expresada como intensidad fluorecencia Fluo-4 normalizada con respecto a la fluorecencia basal (F/F0). La selección de datos para el gráfico de barra fue el último punto antes de la exposición, que se denominó control, mientras que los demás valores utilizados fueron los valores más altos de fluorecencia, a excepción para bicuculina, debido a que este valor corresponde al valor de fluorecencia más alto de la primera espiga.

3.2.6 Análisis estadístico.

Los resultados son presentados como promedios y/o promedios normalizados \pm error estándar. Para los análisis estadísticos y de regresiones lineales se utilizó el programa computacional Sigma Plot (Jandel). Las diferencias en los valores normalizados fueron evaluados en primera instancia por la prueba de t-Student, debido a que no pasaron el test de normalidad se decidió realizar las evaluaciones con el test de valores no paramétricos Mann – Whitney y en el caso de datos agrupados se utilizó la prueba Kruskal-Wallis. En los análisis estadísticos se consideró significativa p < 0,05.

4. RESULTADOS

4.1 Efecto de GABA, Glutamato y Bicuculina en el cultivo neuronal.

Se ha descrito que el potencial de acción produce la apertura de canales de calcio dependientes de voltaie y su apertura implica alzas de Ca⁺² citoplasmaticos en neuronas (Murakoshi y Yasuda, 2012). Considerando este antecedente, se realizaron mediciones de Ca⁺² citoplasmaticos con el objetivo de validar el modelo experimental, evaluando la modulacion de la actividad neuronal del cultivo primario hipocampal en presencia de diferentes moleculas. Para realizar estas mediciones se incubaron las celulas con la sonda de Ca⁺² citoplasmatico Fluo-4 AM y los experimentos se realizaron bajo un sistema de perfusión utilizando un buffer KRH/HCO₃⁻ enriquecido con 2 mM glucosa y 1 mM lactato. Primero se observó el efecto del acido γ-aminobutírico (GABA) sobre el calcio neuronal, el cual actúa activando a los receptores gabaérgicos tipo A. que son canales de cloruro (Cl⁻), generando la hiperpolarización de la membrana neuronal e inhibiendo la apertura de los receptores ionotrópicos dependientes de glutamato (AMPA, NMDA y Kainato) (Figura 9 A). Se observó el incremento de 1,67 veces de la intensidad de fluorecencia en cultivos neuronales de 2-3 (DIV) (Figura 9 B) durante la exposición a GABA (10µM), mientras que no hubieron alteraciones en los cultivos de 12-14 DIV (Figura 9 C) frente a la exposición del neurotransmisor inhibitorio. Estos resultados nos muestran que existe una respuesta dual de GABA en cultivos neuronales de diferentes edades.




Figura 9. Efecto de GABA, Glutamato y Bicuculina en el cultivo neuronal.

(A, D y H) Esquemas representando el mecanismo de acción de GABA, Glutamato y Bicuculina, respectivamente. (B, C, E, F, G, I, J y K) Cursos temporales representativos de la intensidad de fluorescencia de Fluo-4 (F) normalizada con respecto a la intensidad en tiempo cero (F0), en el que se observan las variaciones de la intensidad de Fluo-4 AM en presencia de GABA (10µM), Glutamato (50 µM), Bicuculina (20 µM) y DNQX (30 µM) + MK-801 (15µM), en cultivos de 2-3 DIV (B, E y I) y en cultivos de 12-14 DIV (C, F, G, J y K). (L) Gráfico de barras de los niveles de intensidad de Fluo-4 AM normalizada con respecto a la intensidad en tiempo cero (F/F0), en que se resume el efecto de GABA. Se observan los valores ante la presencia de GABA (10µM) (barra morada), Glutamato (50 µM) (barra gris), Bicuculina (20 µM) (barra amarillo oscuro) y DNQX (30 µM) + MK-801 (15µM) (barras segmentadas con celeste), en cultivos de 2-3 y 12-14 DIV. *** p < 0,001, N.S= No significativo. En el caso de cultivos 2-3 DIV n=37 en 3 experimentos independientes., mientras que en cultivos 12-14 DIV n=125 en 5 experimentos independientes. Luego se determinó la respuesta de nuestros cultivos neuronales frente a la presencia de glutamato, el principal neurotransmisor excitatorio del sistema nervioso central. Su mecanismo de acción es uniéndose a los receptores ionotrópicoss dependientes de glutamato (NMDA, AMPA y Kainato) (Figura 9 D), permitiendo la apertura de estos canales y con esto la entrada de diversos cationes (Ca⁺² y Na⁺ principalmente), induciendo la activación de los canales dependientes de voltaje y finalmente produciendo los potenciales de accion excitatorios en neuronas hipocampales (Kullmann, 2007).

Los resultados obtenidos muestran que la exposición a glutamato (50 μ M) durante dos minutos induce el aumento de la fluorescencia intracelular en 5,2 veces en el cultivo de 12-14DIV (**Figura 9 F**), mientras que en cultivos de 2-3DIV (**Figura 9 E**) se observó el incremento en 4,7 veces, en ambos casos al retirar el neurotransmisor se observó una lenta recuperación del Ca⁺² intracelular al estado basal.

Se ha descrito que además de los receptores ionotrópicos dependientes de glutamato, existen receptores metabotrópicos y la activación de estos receptores incide en la liberación del calcio de compartimientos intracelulares en neuronas hipocampales (Ross, 2012). Considerando la existencia de estos receptores glutamatérgicos, se evaluó si la presencia de glutamato exógeno es capaz de activar estas vías alternativas que estarían contribuyendo al incremento del calcio intracelular neuronal. Para poder aislar estas vias alternativas, se utilizó un mix farmacológico compuesto por DNQX (30 μ M) y MK-801 (15 μ M), que corresponden a antagonistas de los receptores ionotrópicos dependientes de glutamato (AMPA, NMDA y Kainato). El protocolo utilizado fue la exposición de los cultivos neuronales de 12-14 DIV al mix farmacológico

durante tres minutos. Luego se agregó glutamato (50 μ M) durante dos minutos y finalmente luego de retirar el neurotransmisor se mantuvieron las células expuestas un minuto más al mix farmacológico. Los resultados muestran el incremento de 2,76 veces de la fluoresencia intracelular durante la exposición a glutamato (50 μ M), sin embargo, la cinética del aumento intracelular de Ca⁺² fue lenta durante la exposición al neurotransmisor, y al retirarlo se observó la restauración del estado basal de Ca⁺² (**Figura 9 G**).

Por último, se evaluó el efecto de la bicuculina, que es un alcaloide, y que ha sido reportado como un inhibidor de los receptores Gabaérgicos tipo A (GABAr_a) (Figura 9 H), además de permitir la liberación endógena de glutamato del cultivo neuronal (Johnston, 2013). Cultivos de 12-14 DIV fueron expuestos a bicuculina (20 μM) durante dos minutos, observándose la formación de espigas, que alcanzaban alzas en la fluorescencia de 3,96 con respecto al basal (Figura 9 L). Este fenómeno es similar a lo que sucede en un estado epiléptico, y que al retirar el alcaloide se restablece rápidamente el estado basal de Ca⁺² (Figura 9 J). Esta observación indica que el fenómeno presentado durante la exposición a bicuculina (20 μM) es de carácter reversible. Sin embargo, no se observaron alteraciones del Ca⁺² intracelular en exposición del alcaloide, en conjunto con el mix farmacológico (DNQX (30μM) y MK-801 (15μM), (Figura 9 K). Por otra parte, los cultivos de 2-3 DIV no presentaron incrementos del Ca⁺² frente a la exposición a bicuculina (Figura 9 L).

4.2 Efectos del glutamato exógeno en el metabolismo del piruvato.

En base a los ensayos realizados previamente, se permite corroborar que nuestro cultivo neuronal de 12-14 DIV responde frente a la actividad glutamatérgica. A partir de esto, se utilizaron estos cultivos para evaluar la modulación del metabolismo de piruvato durante la actividad neuronal.

4.2.1Efectos del glutamato en el metabolismo del piruvato en condiciones fisiológicas.

El objetivo de este ensayo fue evaluar el efecto del glutamato sobre el metabolismo del piruvato en condiciones fisiológicas similares a las que se presentan a nivel cerebral. Para ello se transfectaron células de 12 DIV para que puedan expresar el sensor PYRONIC. Luego de uno a dos días, fueron utilizadas para realizar mediciones de piruvato. Durante este ensayo se mantuvieron las células en buffer de perfusión KRH/HCO₃ enriquecido con glucosa, lactato y piruvato, mientras eran expuestas a glutamato exógeno (**Figura 10 A**). Se observó el incremento de la razón de fluorescencia durante la exposición a glutamato (50 μ M), y que luego de retirar el neurotransmisor, no se visualiza una recuperación del estado estacionario a un tiempo mayor, siendo un fenómeno de carácter irreversible (**Figura 10 B**). Lo anterior muestra que frente a la presencia de glutamato (50 μ M), la intensidad de la razón de fluorescencia del sensor aumenta un 4 ± 0,07 % (**Figura 10 C**), y que este fenómeno irreversible ocurre tanto a nivel general como individual de neuronas utilizadas en este experimento (**Figura 10 D**).



Figura 10. La presencia de glutamato exógeno produce el aumento del piruvato en condiciones fisiológicas.

(A) Esquema representativo que define las condiciones en la cual se realizó el experimento. (B) Curso temporal representativo del piruvato intracelular (mTFP/Venus), en el que se observa las variaciones frente a glutamato (50 μM). (C)Gráfico de barras expresado en piruvato intracelular (mTFP / Venus) que se encuentra normalizado con respecto a los puntos señalados con las flechas en (B). *** p< 0,001 n=9 en 9 experimentos independientes. (D) Gráfico de células individuales expresado en el piruvato intracelular (mTFP/Venus) normalizado con respecto a los puntos señalados con las flechas en (B). *** p< 0,001 n=9 en 9 experimentos independientes. (D) Gráfico de células individuales expresado en el piruvato intracelular (mTFP/Venus) normalizado con respecto a los puntos señalados con las flechas en (B). Control: Flecha negra en (B); Glutamato: Flecha azul en (B); Post Glutamato: Flecha naranja en (B).

4.2.2 Efectos del glutamato en el estado estacionario del piruvato.

Para determinar el efecto de la exposición a glutamato (50 μ M) sobre el estado estacionario del piruvato intracelular, se utilizaron neuronas que expresaban el nanosensor PYRONIC y que fueron perfundidas en un buffer que solo contenía piruvato (1mM). El protocolo utilizado nos permite estudiar el estado estacionario del piruvato, que corresponde al acoplamiento entre el transporte y el consumo del monocarboxilato, y sus variaciones frente a glutamato (50 μ M) (Figura 11 A). Se observó la caída de la razón de fluorescencia con respecto al estado estacionario y que no hay una recuperación luego de retirar el neurotransmisor, siendo un fenómeno de carácter irreversible (Figura 11 B). Al analizar los resultados, observamos la caída de la intensidad de la razón de fluorescencia en un 10 ± 0,2 % durante la presencia a glutamato (50 μ M) (Figura 11 C), y que este fenómeno ocurre tanto a nivel general como individual en las neuronas utilizadas en este experimento (Figura 11 D).

4.2.3 Efecto del glutamato sobre la tasa de consumo basal de piruvato.

Las posibles explicaciones para entender la caída del estado estacionario de piruvato durante la exposición a glutamato (50 μ M), podría ser el aumento del consumo de piruvato, o la disminución del transporte del monocarboxilato (**Figura 12**). Para poder determinar cuál de los siguientes postulados explica la caída del estado estacionario durante la exposición al neurotransmisor, se optó por evaluar solamente el consumo de piruvato, utilizando un protocolo de inhibición de transporte. Para esto se utilizaron neuronas que expresaban el nanosensor PYRONIC y que fueron mantenidas en



Figura 11. El glutamato produce una disminución del nivel en el estado estacionario de piruvato.

(A) Esquema representativo que define las condiciones en la cual se realizó el experimento. (B) Curso temporal representativo del piruvato intracelular (mTFP/Venus), en el que se observa las variaciones frente a glutamato (50 μM). (C)Gráfico de barras expresado en piruvato intracelular (mTFP / Venus) que se encuentra normalizado con respecto a los puntos señalados con las flechas en (B). *** p< 0,001 n=13 en 10 experimentos independientes. (D) Gráfico de células individuales expresado en el piruvato intracelular (mTFP/Venus) normalizado con respecto a los puntos señalados con las flechas en (B). Señalados con las flechas en (B): *** p< 0,001 n=13 en 10 experimentos independientes. (D) Gráfico de células individuales expresado en el piruvato intracelular (mTFP/Venus) normalizado con respecto a los puntos señalados con las flechas en (B). Control: Flecha negra en (B); Glutamato: Flecha azul en (B); Post Glutamato: Flecha naranja en (B).



Figura 12. Dos posibles explicaciones de la disminución del estado estacionario de piruvato durante la exposición a glutamato.

La disminución del piruvato durante la exposición a glutamato podría ser explicado por, (A) La inhibición del transporte de piruvato hacia el espacio intracelular. (B) El aumento del consumo del monocarboxilato. un buffer solo con piruvato (1mM), luego de algunos minutos se bloquea la entrada de piruvato mediante la utilización de AR-C1558585 (1µM), un inhibidor de los MCT (Owens *et al* 2010), permitiendo visualizar el consumo basal del piruvato intracelular y su variación frente a la presencia del neurotransmisor **(Figura 13 A)**. Para más detalles del protocolo presentado recurrir a San Martín *et al*, 2014.

Se observó que el consumo basal de piruvato (Línea azul, Figura 13 B), es agudizado frente a la exposición a glutamato (50 μ M) (Línea roja, Figura 13 B). Al analizar los valores de las tasas de consumo, vemos que el consumo basal es de 0,04 ± 0,006 min⁻¹, mientras este valor aumenta al doble (0,08 ± 0,018 min⁻¹) durante la exposición del neurotransmisor (Figura 13 C). El aumento de la tasa de consumo durante la exposición al neurotransmisor fue visualizado tanto a nivel general como individual de neuronas utilizadas en este experimento (Figura 13 D).

4.3 Efectos del bicuculina en el metabolismo del piruvato.

A partir de los resultados obtenidos del efecto glutamato exógeno en el metabolismo de piruvato (Figuras 10,11 y 13), se decidió realizar los mismos protocolos anteriormente utilizados pero esta vez evaluando el efecto del glutamato endógeno.

4.3.1 Efectos de la bicuculina en el metabolismo del piruvato en condiciones fisiológicas.

El objetivo de este ensayo fue evaluar el efecto de bicuculina sobre el metabolismo del piruvato en condiciones fisiológicas similares a las que se presentan a nivel cerebral. Para ello se transfectaron células de 12 DIV para que puedan expresar el sensor PYRONIC.



Figura 13. El glutamato agudiza la tasa de consumo de piruvato.

(A) Esquema que define las condiciones en la cual se realizó el experimento. (B) Curso temporal representativo de piruvato intracelular (mTFP/Venus), en que se muestra la modulación del consumo de piruvato (línea azul) modulación frente a glutamato (50 μ M) (línea roja). (C) Gráfico de barras expresado como la tasa de consumo de piruvato intracelular (min⁻¹), obtenida de la pendiente a partir de la regresión lineal de los puntos azules en (B) (AR, barra azul) y los puntos rojos (AR+ Glutamato, barra roja) * p<0,05 n=10 en 9 experimentos independientes. (D) Gráfico de células individuales expresado como la tasa de consumo de piruvato intracelular (min⁻¹). Luego de uno a dos días, fueron utilizadas para realizar mediciones de piruvato, en el cual en este ensayo se mantuvieron las células en buffer de perfusión KRH/HCO₃⁻ enriquecido con glucosa, lactato y piruvato, mientras eran expuestas a bicuculina (20 μ M), (Figura 14 A). Se observó la caída del piruvato intracelular durante la exposición, y que al retirar el alcaloide, existe una lenta recuperación del estado estacionario, siendo un fenómeno de carácter reversible (Figura 14 B). Lo anterior muestra que frente a la presencia de bicuculina (20 μ M), la razón de fluorescencia disminuyó en un 1,24 ± 0,003 %, y que al retirar el alcaloide aún se mantiene una disminución de un 1,28 ± 0,003 % (Figura 14 C). Este fenómeno fue visualizado tanto a nivel general como individual de neuronas utilizadas en este experimento (Figura 14 D).

4.3.2 Efectos de la bicuculina sobre el piruvato citoplasmático.

Para determinar el efecto de la exposición a bicuculina (20 μ M) sobre el estado estacionario del piruvato intracelular, se utilizaron neuronas de 12-14 DIV que expresaban el nanosensor PYRONC y fueron perfundidas en un buffer que solo contenía piruvato (1mM). El protocolo utilizado nos permite estudiar el estado estacionario del piruvato y sus variaciones frente a bicuculina (20 μ M) (Figura 15 A), observándose el aumento de la intensidad de la razón de fluorescencia y que al retirar la exposición del alcaloide se restablece el estado estacionario (Figura 15 B). Al analizar los resultados, observamos el aumento del estado estacionario en un 1 ± 0,004 % durante la presencia a bicuculina (20 μ M), mientras que al retirar el estímulo no se observaron cambios con respecto al estado estacionario de piruvato (Figura 15 C). Este fenómeno



Figura 14. La presencia de bicuculina induce la disminución del piruvato en condiciones fisiológicas.

(A) Esquema representativo que define las condiciones en la cual se realizó el experimento. (B) Curso temporal representativo del piruvato intracelular (mTFP/Venus), en el que se observan las variaciones frente a bicuculina (20 μM). (C) Gráfico de barras expresado en piruvato intracelular (mTFP / Venus) que se encuentra normalizado con respecto a los puntos señalados con las flechas en (B). *** p< 0,001 n=10 en 9 experimentos independientes. (D) Gráfico de células individuales expresado como piruvato intracelular (mTFP / Venus) normalizado con respecto a los puntos señalados con las flechas en (B). Especto a los puntos señalados con las flechas en (B). *** p< 0,001 n=10 en 9 experimentos independientes. (D) Gráfico de células individuales expresado como piruvato intracelular (mTFP / Venus) normalizado con respecto a los puntos señalados con las flechas en (B). Control: Flecha negra en (B); Bicuculina: Flecha roja oscura en (B); Post Bicuculina: Flecha naranja en (B).



Figura 15.La bicuculina produce un aumento del estado estacionario de piruvato.

(A) Esquema representativo que define las condiciones en la cual se realizó el experimento. (B) Curso temporal representativo del piruvato intracelular (mTFP/Venus), en el que se observan las variaciones frente a bicuculina (20 μM). (C)Gráfico de barras expresado en piruvato intracelular (mTFP / Venus) que se encuentra normalizado con respecto a los puntos señalados con las flechas en (B). *** p< 0,001 N.S =no significativo n=15 en 10 experimentos independientes. (D) Gráfico de células individuales expresado como el piruvato intracelular (mTFP/Venus) normalizado con respecto a los puntos señalados con las flechas en (B). Control: Flecha negra en (B); Bicuculina: Flecha roja oscura en (B); Post Bicuculina: Flecha naranja en (B).

fue observado tanto a nivel general, como individual de neuronas utilizadas en este experimento, a excepción de una neurona (**Figura 15 D**).

4.3.3 Efecto de la bicuculina sobre la tasa de consumo de piruvato

Las explicaciones para entender el aumento del estado estacionario del piruvato durante la exposición a bicuculina (20 µM), podría ser la disminución del consumo de piruvato, o el aumento del transporte del monocarboxilato (Figura 16). Para poder determinar cuál de los siguientes postulados es la respuesta del aumento del piruvato, se optó por realizar el protocolo de inhibición, utilizado anteriormente para evaluar el efecto a glutamato (50µM) en el consumo de piruvato (Figura 13). Para esto se utilizaron neuronas que expresaban el nanosensor PYRONIC y que fueron mantenidas en un buffer solo con piruvato (1mM), luego de algunos minutos se bloguea la entrada de piruvato mediante la utilización de AR-C1558585 (1µM), permitiendo visualizar el consumo basal del piruvato intracelular (Figura 17 A). Se observó una leve agudización del consumo basal (Línea azul, Figura 17 B) de piruvato frente a la exposición a bicuculina (20 µM) (Línea roja, Figura 17 B). Al analizar los valores de las tasas de consumo, vemos que el consumo basal es de 0.07 ± 0.012 min⁻¹, mientras que la exposición del alcaloide no alteró de manera significativa el consumo basal (0,096 ± 0,0132 min⁻¹) (Figura 17 C). Este fenómeno fue visualizado a nivel individual en todas las células utilizadas en este protocolo (Figura 17 D).



Figura 16. Dos posibles explicaciones del aumento del estado estacionario de piruvato durante la exposición a bicuculina.

El aumento del piruvato durante la exposición a bicuculina puede explicarse por: (A) Aumento de la permeabilidad de piruvato. (B) Inhibición de la entrada o consumo del piruvato citoplasmático.



Figura 17. La bicuculina no produce cambios en la tasa de consumo de piruvato.

(A) Esquema que define las condiciones en la cual se realizó el experimento. (B) Curso temporal representativo de piruvato intracelular (mTFP/Venus), en que se muestra la modulación del consumo de piruvato (línea azul) frente a bicuculina (20 μ M) (línea roja). (C) Gráfico de barras expresado como la tasa de consumo de piruvato intracelular (min⁻¹), obtenida de la pendiente a partir de la regresión lineal de los puntos azules en (B) (AR, barra azul) y los puntos rojos (AR+ bicuculina, barra roja) N.S= No significativo n=8 en 8 experimentos independientes. (D) Gráfico de células individuales expresado como la tasa de consumo de piruvato intracelular (min⁻¹).

4.4 Modulación del ATP durante actividad neuronal.

La estabilidad de la actividad neuronal en el cerebro requiere de una alta demanda energética, debido principalmente a la restauración del gradiente electroquímico que es disipado por los potenciales de acción, la que se refleja en el consumo del ATP, molécula esencial para la obtención de energía a nivel celular (Harris *et al*, 2012).

4.4.1 Efecto del glutamato exógeno en el nivel de ATP y la razón ATP/ADP citosólico.

El objetivo experimental fue determinar el efecto del glutamato exógeno en el ATP citosólico. Para ello se transfectaron células de 12 DIV con el fin de expresar el sensor Ateam 1.03, las que luego de dos días se utilizaron para realizar las mediciones. El protocolo consistió en mantener las células en un buffer KRH/HCO₃⁻ enriquecido con un buffer 2 mM glucosa y 1 mM lactato (buffer de referencia). Al mantener una estabilidad en la señal, las neuronas fueron expuestas frente a glutamato (50 μ M) (**Figura 18 A**), observándose la caída de la intensidad de la razón de fluorescencia en un 24,1 ± 0,02% (**Figura 18 D**), y al retirar el neurotransmisor no se recupera el estado estacionario inicial.

Para corroborar este fenómeno se decidió evaluar ahora la razón ATP/ADP, para ello se utilizaron neuronas de 12-14 DIV que fueron transfectadas con el sensor PercevalHR, luego de dos días se utilizaron para realizar las mediciones.



Figura 18. Caída del ATP citosolico tanto a la exposición a glutamato, como a bicuculina, aunque, solo la presencia del neurotransmisor causa la caida del $\Delta \psi_m$.

(A, B y C) Curso temporal promedio del monitoreo del ATP (Venus/CFP), y su variación durante la exposición de glutamato (50 µM), bicuculina (20 µM) y azida (5 mM), respectivamente. Los círculos blancos corresponden al promedio de las células expuestas, mientras que las líneas negras corresponden a las células individuales. D) Gráfico de barras expresado en ATP (Venus/CFP) normalizado que resume los resultados obtenidos en (A), (B) y (C).Para los experimentos de Glutamato fue n= 6 en 6 experimentos independientes, mientras que para bicuculina y azida fue de n=12 en 12 experimentos independientes. (E, F y G) Curso temporal promedio de la razón ATP/ADP (F490/F420), y su variación durante la exposición a glutamato (50 µM), bicuculina (20 µM) y azida (5 mM), respectivamente. Los círculos blancos corresponden al promedio de las células expuestas, mientras que las líneas negras corresponden a las células individuales. H) Gráfico de barras promedio expresado en la razón ATP/ADP (F490/F420), que resume los resultados obtenidos en (E), (F) y (G). n=3 en 3 experimentos independientes. (I, J y K) Curso temporal promedio expresado en intensidad de fluorescencia de TMRM (F/F0), y su variación frente a glutamato (50 µM), bicuculina (20 µM) y FCCP (2 µM), respectivamente. L) Gráfico de barras promedio expresado en la intensidad de fluorescencia de TMRM (F/F0), que resume los resultados obtenidos en (I), (J) y (K).

* p<0,005, ** p< 0,001, *** p< 0,0001, N.S: No significativo. Control Glu: Último punto antes de la exposición a glutamato, Glu: Ultimo punto de exposición de glutamato,

Control Bicu: Último punto antes de la exposición a bicuculina, Bicu: Último punto de exposición de bicuculina, Control Azida: Último punto antes de la exposición a azida, Azida: Último punto de exposición a Azida, Control FCCP: Último punto antes de la exposición a FCCP, FCCP: Itimo punto de exposición a FCCP.

Se observó la caída de la razón 490/420 durante la exposición a glutamato (50 μ M), alcanzando una disminución del 65,4 ± 0,09% (Figura 18 H), y que la caída continua post-exposición del neurotransmisor, siendo un fenómeno de carácter irreversible (Figura 18 E).

4.4.2 Efecto del bicuculina en el ATP y la razón ATP/ADP citosólico.

Luego de observar la caída del ATP frente a la exposición de glutamato (50 μ M), el objetivo era observar si este fenómeno igual se presentaba durante la estimulación a bicuculina (20 μ M). Para realizar estas mediciones se transfectaron neuronas de 12 DIV con el sensor Ateam 1.03, y luego de dos días se realizaron los experimentos. Se observó la caída de la razón de fluorescencia durante la exposición a bicuculina (20 μ M), y que después de retirar la estimulación no se volvió al estado estacionario, indicando que es un efecto de carácter irreversible (**Figura 18 B**). Al analizar los datos vemos que la caída del estado estacionario del fue de un 2,4 ± 0,004 %, con respecto al control (**Figura 18 D**). Por otra parte, cuando se utilizaron neuronas que expresaban el sensor PercevalHR, el resultado fue la caída de la razón 490/420 durante la exposición del alcaloide, y que al retirar la estimulación no se recupera el estado inicial de ATP, indicando que este fenómeno es de carácter irreversible (**Figura 18 F**). El análisis de los datos entregó que la exposición a bicuculina (20 μ M) repercute en la caída del estado estacionario en 12,6 ± 0,04% (**Figura 18 H**).

Durante los experimentos realizados con el nanosensor Ateam 1.03 o PercevalRH, se utilizó como control positivo azida, que se ha descrito como un potente tóxico mitocondrial. Como se observa en **la Figura 18 C**, la presencia de azida (5 mM) durante

4 minutos, produce la caída abrupta de la razón de fluorescencia en un 24,3 \pm 0,06 %, con respecto al control (**Figura 18 D**), y una disminución del 21,7 \pm 0,02 % de la razón 490/420 (**Figura 18 H**).

4.5 Efecto del glutamato y bicuculina sobre el $\Delta \psi_m$.

Finalmente se evaluó el efecto tanto de glutamato (50 µM), como bicuculina (20 µM) en el ($\Delta \psi_m$), debido a que es el principal parámetro controlador de funciones a nivel de la matriz mitocondrial, como la respiración oxidativa y la producción de ATP (Nicholls, 2002). Para efectuar estas mediciones de $\Delta \psi_m$, se utilizó la sonda fluorescente TMRM. La exposición a glutamato (50 µM) produjo la caída irreversible del $\Delta \psi_m$ (Figura 18 I), alcanzando una disminución de la fluorescencia del 14,9 ± 0,016% respecto del estado estacionario (Figura 18 L), efecto similar a lo ocurrido en presencia del FCCP (2 µM) (Figura 18 K), que corresponde a un agente desacoplante de la cadena de electrones a nivel mitocondrial, que disminuyó el estado estacionario en un 22,2 ± 0,03 % (Figura 18 L). Mientras que la exposición a bicuculina (20 µM) no se observaron cambios del $\Delta \psi_m$ (Figura 18 L).

5. DISCUSIÓN

En el presente estudio se planteó determinar la modulación de la actividad metabólica mitocondrial durante actividad glutamatérgica, utilizando como modelo experimental neuronas hipocampales en cultivo, evaluando las variaciones de piruvato citoplasmático como parámetro de la actividad mitocondrial, y la producción de ATP.

Nuestro primer objetivo fue validar nuestro modelo experimental, observándose que en cultivos de 12-14 DIV no existieron alteraciones del Ca⁺² intracelular durante la exposición a GABA (10 μ M) (Figura 9 C), mientras que en cultivos de 2-3 DIV visualizamos un incremento de Ca⁺² intracelular durante la exposición a este neurotransmisor (Figura 9 B), efecto similar a lo observado en cultivos hipocampales de 4-5 DIV (Dynnik *et al*, 2015). El efecto dual de GABA en cultivos neuronales de diferentes estadios se debe a que en etapas tempranas, GABA ejerce una acción excitatoria (Ben-Ari, 2002), sin embargo, en estadios neuronales maduros, GABA ejerce un rol inhibitorio (Kaila *et al*, 2014 y Owens y Kriegstein, 2002). Los resultados obtenidos nos permiten determinar que los cultivos de 12-14 DIV son el modelo experimental óptimo, debido a la madurez neuronal que presentan.

Para determinar si los cultivos neuronales de 12-14 DIV responden frente a la presencia de glutamato, expusimos durante dos minutos este neurotransmisor a una concentración de 50 μ M, observándose un incremento del Ca⁺² intracelular (**Figura 9 F**), fenómeno descrito previamente en cultivos primarios corticales (Connolly *et al*, 2014), cerebelo (Llorente-Folch *et al*, 2015) e hipocampo (Dynnik *et al*, 2015). El uso de esta concentración ha sido utilizada en ensayos in vitro de neuronas (Tantama *et al*, 2013), y astrocitos (Bittner *et al*, 2011), dentro del rango fisiológico (50 - 150 μ M) que

es liberado durante la actividad neuronal (Dzubay y Jahr, 1999).No obstante, el tiempo de exposición no se encuentra dentro del rango fisiológico, ya que este se encuentra en el rango de nanosegundos (Hygley y Sabatini, 2012), siendo la estimulación de carácter supra-fisiológico. Nuestros resultados también indicaron que la exposición a glutamato (50 μ M) activa tanto receptores ionotrópicos como metabotrópicos, al inhibir farmacológicamente con DNQX (30 μ M) y MK-801 (15 μ M) la actividad de los receptores ionotrópicos, observándose un incremento de 3 veces los niveles de Ca⁺² intracelular, mientras que en condiciones control los niveles de Ca⁺² intracelular incrementan 6 veces respecto al basal (**Figura 9 L**). Los resultados obtenidos frente a la exposición a glutamato (50 μ M), indican la activación de todos los receptores de glutamato (ionotrópicos y metabotrópicos) y con ello el aumento desmedido del Ca⁺² intracelular.

Con el objetivo de evaluar otro protocolo de estimulación glutamatérgica, utilizamos el inhibidor farmacológico bicuculina. Las mediciones de Ca⁺² intracelular durante la exposición con bicuculina (20 μ M) (Figura 9 J) mostraron un patrón epiléptico, resultado que concuerda con lo reportado en cultivos primarios de bulbos olfatorios (Kato-Negishi *et al*, 2003), y cultivos primarios hipocampales (Dynnik *et al*, 2015, Birnir *et al*, 2000 y Van Der Linden *et al*, 1993). Además, la exposición a bicuculina (20 μ M) y al mix farmacológico de DNQX (30 μ M) y MK-801 (15 μ M) no generaron incrementos del Ca⁺² intracelular, indicando que la actividad neuronal glutamatérgica depende de los receptores ionotrópicos dependientes de ligando tipo AMPA, NMDA y Kainato y no sobre los receptores metabotrópicos, siendo similar a lo observado en cultivos hipocampales de 10-12 DIV (Bengtson *et al*, 2008). Los

resultados obtenidos de la exposición a bicuculina (20 µM), indican la presencia de tonos gabaérgico y glutamatérgicos basales en nuestros cultivos neuronales.

Nuestro segundo objetivo fue evaluar la actividad metabólica mitocondrial, a través del estado estacionario del piruvato y su consumo a nivel citoplasmático con el nanosensor PYRONIC.

Para poder determinar la modulación del estado estacionario de piruvato durante actividad glutamatérgica se expusieron cultivos neuronales frente a glutamato (50 μ M), observándose una disminución del estado estacionario de piruvato **(Figura 11B)**. Por otra parte, la presencia de bicuculina (20 μ M) generó un aumento del estado estacionario **(Figura 15 C)**.

Para determinar el consumo de piruvato citoplasmático, utilizamos un protocolo de inhibición de transporte, que consiste en el uso de AR-C (1 μ M) para inhibir la entrada de piruvato. Nuestros resultados indican que la exposición de glutamato (50 μ M) produjo el aumento de dos veces el consumo de piruvato (**Figura 13 C**), mientras que no se observaron cambios frente a la presencia de bicuculina (20 μ M) (**Figura 17 C**). La caída del estado estacionario y el aumento de la tasa de consumo del piruvato citoplasmático durante la exposición a glutamato (50 μ M) podría ser generada por la actividad metabólica mitocondrial para suplir los requerimientos energéticos que conlleva la exposición a este neurotransmisor. La agudización de esta tasa de consumo fue reportada previamente por nuestro grupo de trabajo (San Martín *et al*, 2014), sin embargo, este efecto fue observado mediante un protocolo de estimulación eléctrica, el cual genera una respuesta tanto a nivel pre como post-sináptico, a diferencia de los protocolos de estimulación utilizados en nuestro trabajo que son respuestas de tipo post

sináptico al activar los receptores glutamatérgicos. No obstante, ambas estimulaciones son capaces de generar un aumento del consumo de piruvato, efecto que no fue visualizado al estimular con bicuculina, la cual no estaría alterando la fisiología mitocondrial (Figura 18 I), si no que produciría una perturbación de la homeostasis del ATP (Figura 18 B y E), a través de un mayor consumo de energía con respecto a la producción, además del aumento de la permeabilidad del piruvato en la membrana citoplasmática, generando un aumento del estado estacionario. Los experimentos de piruvato indican que existen diferentes respuestas metabólicas de las neuronas, frente a la estimulación a glutamato (50 μ M) o bicuculina (20 μ M).

Nuestro tercer objetivo fue evaluar el efecto de la actividad glutamatérgica sobre el estado estacionario de ATP y el $\Delta \psi_m$. Nuestros resultados indicaron que la estimulación de glutamato (50 µM), o bicuculina (20 µM) inducen la caída del estado estacionario tanto del ATP, como de la razón ATP/ADP citosólico, resultado similar a lo que se ha descrito utilizando diferentes protocolos de estimulación neuronal como NMDA (Lange *et al*, 2015), glutamato (Conolly *et al*, 2014 y Tantama *et al*, 2013) y estimulación eléctrica (Rangaraju *et al*, 2014). Tanto la caída del ATP citosólico durante la exposición a glutamato o bicuculina, podría deberse al incremento intracelular de iones Ca⁺² y Na⁺, que provocan una disipación del gradiente electroquímico, el cual requiere un alto consumo energético para ser restablecido, siendo la bomba de Ca⁺² (PMCA) y Na⁺/K⁺ los que demandan los mayores requerimientos energéticos (Attwell y Laughlin, 2001). Estos experimentos nos permiten comprender las necesidades energéticas a consecuencia de la actividad glutamatérgica. Por otra parte, observamos una disminución significativa del $\Delta \psi_m$ frente a la exposición a glutamato (50µM), efecto similar al reportado en neuronas corticales (Conolly *et al*, 2014 y Ward *et al*, 2007). Estos resultados podrían dar cuenta del rol de la mitocondria como reservorio de Ca⁺², debido a las altas concentraciones citoplasmáticas visualizadas durante la exposición a glutamato, además esta entrada excesiva de Ca⁺² a la mitocondria generaría una alteración en $\Delta \psi_m$ y con ello del desacoplamiento de la maquinaria mitocondrial (Ankarcrona *et al*, 1995).

Las diferencias existentes en los niveles de piruvato y glucosa frente a una estimulación glutamatérgica o con bicuculina no pueden ser esclarecidas en su totalidad, debido a la complejidad que determina el estado estacionario, en conjunto con la falta de herramientas que permitan evaluar con un mayor de grado de precisión su modulación bajo ciertas condiciones de estimulación. Las aproximaciones generadas en este trabajo nos permiten dilucidar el transporte y el consumo de estas moléculas, no obstante, parámetros como la producción, reducción y exportación del piruvato, son fundamentales para comprender en mayor grado la homeostasis energética frente a actividad neuronal.

El siguiente paso es determinar el rol que ejercería la bomba Na⁺/K⁺ sobre la actividad mitocondrial, debido a que esta requiere altas demandas energéticas que gatillan la generación de ATP a través de la fosforilación oxidativa. Una forma de evaluar su actividad es mediante mediciones de Na⁺ citosólico, a través de la inhibición de la bomba con ouabaina (0,1 mM), luego de una estimulación glutamatérgica. Otro punto interesante de abordar es el estudio metabólico neuronal, utilizando diferentes métodos de estimulación farmacológicas como NMDA, el cual actúa como análogo del

57

glutamato, en conjunto con la estimulación eléctrica, comprendiendo los mecanismos de acción de la homeostasis energética que subyacen a la actividad neuronal.

En conclusión, el presente trabajo muestra las diferencias existentes en la respuesta metabólica mitocondrial frente a distintas aproximaciones de estimulación glutamatérgica, estados estacionarios del ATP y variaciones en el $\Delta \psi_m$, que permiten comprender los mecanismos moleculares que modulan la homeostasis energética neuronal.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Allaman, I., and Magistretti, P.J. (2013). "Brain energy metabolism". *In Fundamental Neuroscience* pp. 261-284.
- Ankarcrona, M., Dypbkut, J.M., Bofonco, E., Zhivotovsky, B., Orrenius. S., Lipton, S.A. and Nicotera, P. (1995). "Glutamate-Induced Neuronal Death: A Succession of Necrosis or Apoptosis Depending on Mitochondrial Function." *Neuron. 15 (10)*: 961–973.
- McCommis, K. S. and Finck, B. N. (2015). "Mitochondrial pyruvate transport: a historical perspective and future research directions." *Biochem J* 466(3): 443-454.
- Attwell, D., and Laughlin, A. 2001. "An Energy Budget for Signaling in the Grey Matter of the Brain." *Journal of cerebral blood, flow and metabolism* 21(10): 1133–1145.
- Belanger, M., Yang, J., Petit, J.M., Laroche, T., Magistretti, P.J. and Allaman, I. 2011. "Role of the Glyoxalase System in Astrocyte-Mediated Neuroprotection." *Journal of Neuroscience 31(10)*: 18338–18352.
- Ben-Ari, Y. 2002. "Excitatory Actions of Gaba during Development: The Nature of the Nurture." *Nat Rev Neurosci* 3(9): 728–39.
- Bengtson, C.P., Dick, O., and Bading, H. 2008. "A Quantitative Method to Assess Extrasynaptic NMDA Receptor Function in the Protective Effect of Synaptic Activity against Neurotoxicity." *BMC neuroscience* 9 (11): 1-15.

- Bennett, V.L., and Zukin, S. 2004. "Electrical Coupling and Neuronal Synchronization in the Mammalian Brain." *Neuron 41(4)*: 495–511.
- Birnir, B.M., Everitt, A.B., and Gage, P.W. 2000. "Bicuculline, Pentobarbital and Diazepam Modulate Spontaneous GABA(A) Channels in Rat Hippocampal Neurons." *Br J Pharmacol 131(4)*: 695–704.
- Bittner, C.X., Valdevenito, R., Ruminot, I., Loiza, A., Larenas, V., Sotelo-Hotschfeld, T.,
 Modenhauer, H., San Martín, A., Guitierrez, R., Zambrano, M and Barros, L.F.
 2011. "Fast and Reversible Stimulation of Astrocytic Glycolysis by K+ and a
 Delayed and Persistent Effect of Glutamate." *The Journal of neuroscience 31(12)*:
 4709–4713.
- Cherubini, E., and Fiorenzo, C. 2001. "Generating Diversity at GABAergic Synapses." *Trends in Neurosciences 24(3):* 155–62.
- Chouhan, A.K, Ivannikov, M.V, Lu, Z., Sugimori, M., Llinas, R.R and Macleod, G.T. 2012. "Cytosolic Calcium Coordinates Mitochondrial Energy Metabolism with Presynaptic Activity." *Journal of Neuroscience 32(4):* 1233–43.
- Compan, V., Pierredon, S., Vanderperre, B., Krznar, P., Marchiq, I., Zamboni, N and Martínou, J-C. 2015. "Monitoring Mitochondrial Pyruvate Carrier Activity in Real Time Using a BRET-Based Biosensor: Investigation of the Warburg Effect." *Molecular* Cell 59(3): 491–501.

- Connolly, N.M., Dussman, H., Anuilkumar, U., Huber, H.J and Prehn, J.H. 2014. "Single-Cell Imaging of Bioenergetic Responses to Neuronal Excitotoxicity and Oxygen and Glucose Deprivation." *Journal of* Neuroscience 34(11): 10192–10205.
- Curtis, E. 1970. "GABA, Bicuculline and Central Inhibition". Nature. 226(1): 1222-1224.
- Dynnik, V., Kononov, A.V, Sergeev, A.I., Teplov, I.Y, Tankanaq, A.V and Zinchenko, V.P. 2015. "To Break or to Brake Neuronal Network Accelerated by Ammonium lons?" *PLoS* ONE 10(7): 1–30.
- Dzubay, J., and Jahr, E. 1999. "The Concentration of Synaptically Released Glutamate outside of the Climbing Fiber-Purkinje Cell Synaptic Cleft." *The Journal of neuroscience 19(12)*: 5265–5274.
- Engl, E., and Attwell, D. 2015. "Non-Signalling Energy Use in the Brain." *The Journal of physiology* 593(16): 3417–29.
- Gogolla, N., Leblanc, J.J., Quast, K.B, Südhof, T.C., Fagiolini, M. and Hensch, T.K. 2009. "Common Circuit Defect of Excitatory-Inhibitory Balance in Mouse Models of Autism." *Journal of Neurodevelopmental Disorders* 1(2): 172–181.
- Goodenough, D., and Paul, D. 2009. "Gap Junctions." *Cold Spring Harb Perspect 1(1):*1–21.
- Gray, L., Tompkins, C. and Taylor, B. 2014. "Regulation of Pyruvate Metabolism and Human Disease." *Cellular and Molecular Life Sciences 71(14)*: 2577–2604.

Hall, C.N., Klein-Flugge, M.C., Howarth, C. and D. Attwell. 2012. "Oxidative Phosphorylation, Not Glycolysis, Powers Presynaptic and Postsynaptic Mechanisms Underlying Brain Information Processing." *Journal of Neuroscience* 32(26): 8940–8951.

Hamberger, A., and Hyden, H. (1963). Inverse enzymatic changes in neurons and glia during increased function and hypoxia. *J. Cell Biol. 16*(*3*): 521–525.

- Harris, J. and Attwell, D. 2012. "Synaptic Energy Use and Supply." *Neuron 75(5)*: 762–777.
- Herrero-Mendez, A., Almeida, A., Fernandez., Maestre, C., Mondaca, S., and Bolaños, J.P. 2009. "The Bioenergetic and Antioxidant Status of Neurons Is Controlled by Continuous Degradation of a Key Glycolytic Enzyme by APC/C-Cdh1." *Nature cell biology 11(6)*: 747–752.
- Higley, M.J., and Sabatini, B.L. 2012. "Calcium Signaling in Dendritic Spines." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 4*(*4*): 5686–5686.
- Higley, M.J. 2014. "Localized GABAergic Inhibition of Dendritic Ca2+ Signalling." *Nature Reviews Neuroscience* 15(9): 567–572.
- Hyder, F., Patel, A.B., Gjedde, A., Rothman, D.L., Behar, K.L., and Shulman, R.G. 2006.
 "Neuronal–glial Glucose Oxidation and glutamatergic–GABAergic Function." *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 26(7): 865–877.

- Imamura, H., Nhat, K.P, Togawa, H., Iino, R., Kato-Yadama, Y., Nagai, T., and Noji, H. 2009. "Visualization of ATP Levels inside Single Living Cells with Fluorescence Resonance Energy Transfer-Based Genetically Encoded Indicators." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106(37)*: 15651–15656.
- Johnston, R. 2013. "Advantages of an Antagonist: Bicuculline and Other GABA Antagonists." *British Journal of Pharmacology 169(2)*: 328–36.
- Kaech, S., Banker, G. 2006. "Culturing hippocampal neurons". *Nature Protocols 1 (5):* 2406-2415.
- Kaila, K., Price, T.J., Payne, J.A., Puskarjov, M., and Voipio, J. 2014. "Cation-Chloride Cotransporters in Neuronal Development, Plasticity and Disease." *Nature reviews. Neuroscience* 15(10): 637–654.
- Kato-Negishi, M., Muramoto, K., Kawahara, M., Hosada, R., Kuroda., and Ichikawa., M. 2003. "Bicuculline Induces Synapse Formation on Primary Cultured Accessory Olfactory Bulb Neurons." *European Journal of Neuroscience 18*(6): 1343–1352.
- Kullmann, D. 2007. "Long-Term Synaptic Plasticity in Hippocampal Interneurons." *Nat Rev Neurosci 8(9)*: 687–699.
- Lange, S.C., Winkler, U., Andresen, L., Byhro, M., Waagepetersen, H.S., Hirrlinger, J., and Bak, L.K. 2015. "Dynamic Changes in Cytosolic ATP Levels in Cultured Glutamatergic Neurons During NMDA-Induced Synaptic Activity Supported by Glucose or Lactate." *Neurochemical Research* 40(12): 2517–2526.

Lennie, P. 2003. "The cost of cortical computation". Curr. Biol. 13(4): 493–497.

Hyden, H., and Lange, P.W. (1962). "A kinetic study of the neuronglia relationship". *J. Cell Biol. 13(8)*: 233-237.

Lerchundi, R., Fernández-Moncada, I., Contreras-Baeza, Y., Sotelo-Hitschfeld, T., Máchler, P., Wyss, M.T., Stobart, J., Baeza-Lehnert, F., Alegria, K., Weber, B., and Barros, L.F. 2015. "NH4+ Triggers the Release of Astrocytic Lactate via Mitochondrial Pyruvate Shunting." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 112(35):* 11090–11095.

- Lewis, D., and Hashimoto, T. 2007. "Deciphering the Disease Process of Schizophrenia: The Contribution of Cortical Gaba Neurons." *International Review of Neurobiology 78(06)*: 109–131.
- Llorente-Folch, I., Rueda, C.B., Pardo, B., Szabadkai, G., Duchen, M.R, and Satrustegui, J. 2015. "The Regulation of Neuronal Mitochondrial Metabolism by Calcium." *The Journal of physiology 593(16)*: 3447–3462.
- Magistretti, J.P., and Allaman, I. 2015. "A Cellular Perspective on Brain Energy Metabolism and Functional Imaging." *Neuron 86(4)*: 883–901.

McLennan, H. 1970. "Bicuculline and inhibition of crayfish stretch receptor neurones". *Nature*. *228 (3)*:674–675.

Murakoshi, H., and Yasuda, R. 2012. "Postsynaptic Signaling during Plasticity of Dendritic Spines." *Trends in Neurosciences 35(2)*: 135–143.
- Nicholls, D.G. 2002. "Mitochondrial Function and Dysfunction in the Cell: Its Relevance to Aging and Aging-Related Disease." *International Journal of Biochemistry and Cell Biology 34(11)*: 1372–81.
- 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." *The Biochemical journal 425(3)*: 523–530.
- Owens, D.F., and Kriegstein, A.R. 2002. "Is There More to GABA than Synaptic Inhibition?" *Nat Rev Neurosci* 3(9): 715–727.
- Pellerin, L., Pellegri, G., Bittar, P.G., Charnay, Y., Bouras, C., Martín, J.L., Stella, N., and Magistretti, P.J. 1998. "Evidence Supporting the Existence of an Activity-Dependent Astrocyte-Neuron Lactate Shuttle." *Developmental Neuroscience 20(4-5)*: 291–299.
- Pereda, A.E. 2014. "Electrical Synapses and Their Functional Interactions with Chemical Synapses." *Nat Rev Neurosci 15(4)*: 250–263.
- Porras, O.H., Loiza, A., and Barros, L.F. 2004. "Glutamate Mediates Acute Glucose Transport Inhibition in Hippocampal Neurons." *Journal of Neuroscience 24(43)*: 9669–9673.
- Rangaraju, V., Calloway, N., and Ryan, T. 2014. "Activity-Driven Local ATP Synthesis Is Required for Synaptic Function." *Cell 156(4)*: 825–835.

- Ross, W. 2012. "Understanding Calcium Waves and Sparks in Central Neurons." *Nature Reviews Neuroscience* 13(3): 157–168.
- San Martín, A., Ceballo, S., Baeza-Lehnert, F., Lerchundi, R., Valdevenito, 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)*: 86-95.
- Sheng, M, and Hoogenraad, C. 2007. "The Postsynaptic Architecture of Excitatory Synapses: A More Quantitative View." *Annual review of biochemistry* 76: 823–847.
- Sheng, M, and Kim, E. 2011. "The Postsynaptic Organization of Synapses." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 3(12)*: 1–20.
- Schurr, A. (2006). "Lactate: the ultimate cerebral oxidative energy substrate? *J.Cereb. Blood Flow Metab.* 3 (26):142-152.

Sokoloff L. 1960. "The metabolism of the central nervous system *in vivo*". In: *Handbook* of *Physiology, Section I, Neurophysiology. 3(1):* 1843–1864

Sotelo-Hitschfeld, T., Niemeyer, M.I., Mächler, P., Ruminot, I., Lerchundi, L., Wyss, M.T,
Storbart, J., Fernández-Mondaca, I., Valdevenito, R., Garrido-Gerter, P., ContrerasBaeza, Y., Scheneider, B.L., Aebscher, P., Lengacher, S., San Martín, A., Le
Douce, J., Bonvento, G., Magistretti, J.P., Sepulveda, F.V., Weber, B., and Barros,
L.F.2015. "Channel-Mediated Lactate Release by K+-Stimulated Astrocytes." *Journal of Neuroscience* 35(10): 68–78.

- Tantama, M., Martínez-Francois, J.R., Mongeon, R., and Yellen, G. 2013. "Imaging Energy Status in Live Cells with a Fluorescent Biosensor of the Intracellular ATP-to-ADP Ratio." *Nature communications* 4(6): 25-50.
- Van der Linden, J.A.M, Joëls, M., Karst, H., Juta, A.J.A., and Wadman, W.J. 1993. "Bicuculline Increases the Intracellular Calcium Response of CA1 Hippocampal Neurons to Synaptic Stimulation." *Neuroscience Letters 155*(*2*): 230–33.

Warburg, O. (1956). On the origin of cancer cells. Science 123(2), 309-314.

- Ward, M.W., Huber, H.J., Weisová, P., Düssmann, H., Nicholls, D.G., and Prehn, J.H.
 2007. "Mitochondrial and Plasma Membrane Potential of Cultured Cerebellar
 Neurons during Glutamate Induced Necrosis, Apoptosis and Tolerance." *Journal of Neuroscience* 27(31): 98-107.
- Zhang, Y., Chen, K., Sloan, S.A., and Wu, J.Q. 2014. "An RNA-Sequencing Transcriptome and Splicing Database of Glia, Neurons, and Vascular Cells of the Cerebral Cortex." *Journal of Neuroscience 34*(*36*): 29–47.