



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

Efecto del reciclamiento de la vitamina C sobre el metabolismo energético de astrocitos y neuronas en cultivo.



PEDRO ANTONIO CISTERNAS FUENTES
CONCEPCIÓN-CHILE
2012

Profesor Guía: Francisco Nualart Santander
Dpto. de Biología Celular, Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Biología Celular de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesores integrantes Comisión Evaluadora:

Dr. Francisco Nualart Santander

Profesor Guía de Tesis
Facultad de Ciencias Biológicas

Dr. Nelson Carvajal

Facultad de Ciencias Biológicas



Dr. Juan Pablo Henriquez

Facultad de Ciencias Biológicas

Dr. Christian Bonansco

Profesor Evaluador Externo
Universidad de Valparaíso

Dr. José Guzmán G.

Director
Programa Doctorado en Ciencias Biológicas
Área Biología Celular y Molecular



Tesis de doctorado financiada por:

Beca CONICYT para estudios de doctorado (2006-2010).

Proyecto Anillo Conicyt-PIA, ACT-02 (2007-2009).

Beca CONICYT para la asistencia de congresos en el extranjero (2007).

Escuela de Graduados de la Universidad de Concepción (2005-2010).

Beca CONICYT # 24080069 de apoyo a tesis doctoral (2008-2009).

Beca CHILE para realizar pasantías doctorales en el extranjero (2009).

Beca CONICYT para término de tesis doctoral (2010).

Proyecto FONDECYT # 1100396 (2010).

Proyecto Centro Microscopia Avanzada, ECM-12, Conicyt-PIA (2010-2014).

AGRADECIMIENTOS

Al fin los agradecimientos, después de escribir hojas y hojas llegó a la que de seguro será la mas difícil de escribir, ya que diversas personas me han acompañado durante este tiempo.

En primer lugar, agradezco a Dios, por todo, por la posibilidad de estudiar, por acompañarme todo este tiempo, por darme las fuerzas para seguir adelante en los momentos difíciles y por sobre todo por la hermosa familia que me ha ayudado a formar, lo cual, sin lugar a dudas representa el mejor regalo que me ha entregado.

De manera mas terrenal, agradezco sinceramente a mi familia "original", a mis padres Yoli y Manolo a mis hermanas Anita e "Isabela" quienes me apoyaron desde que entre a la U y pese a que aún no entienden en que trabaja un Bioquímico, igual me apoyan y me aguantan cuando les doy la lata científica.

Le agradezco muy sinceramente a mi tutor Francisco Nualart por acogerme y aguantarme en su laboratorio, por la paciencia y confianza que deposito en mi, para desarrollar el presente trabajo y por las largas reuniones intentando buscar una explicación a mis resultados e ideas. En lo personal le agradezco la buena onda y la capacidad de compartir su experiencia personal y laboral con el deseo de que uno tenga las mejores herramientas para elegir de mejor manera el camino a seguir.

Las gracias no pueden faltar para mis compañeros de laboratorio quienes ayudaron ha que las horas de laboratorio pasaran mas rápido y mas entretenidas al Feñax, Patty, Katty, Marco, Pato, Claudio, Fede, Vivi, Fedex, Nery, Gustavo,

Flaka a todos ustedes gracias por la compañía y por los momentos de sano entretenimiento. Entre el equipo de trabajo también debo agradecer a la Marilo, Xime, Rosita, Vivi quienes de diversas maneras también contribuyeron en la parte científica o personal para el desarrollo de este trabajo. A Don Luchito, Don Isaías, Don Eliseo, Don Óscar y Jorge, por su excelente disposición y buena onda.

De forma muy especial agradezco a mis amigos personales e íntimos, con quienes he compartido gratos momentos, me refiero a Paula, Kari y Robert para ustedes un gran gracias por su apoyo, compañía, consejos y por sobre todo por su gran amistad, un abrazo fuerte para ustedes.

Por ultimo quiero agradecer con todo mi ser y sinceridad al par de personas mas importantes de mi vida me refiero a Carmen y Benjamín a ellos gracias por todo, y aunque suene majadero las palabras sobran para expresarles todo lo que les quiero decir. A Carmen por acompañarme siempre en las buenas y en las malas, por entregarme su amor y amistad y por ser siempre un pilar para mi durante todo este tiempo, por estar siempre ahí, donde las papas queman, con tus abrazos y comentarios. Gracias por construir un hogar junto a mi y por compartir el hermosos hijo que tenemos. A ti Benjita te agradezco el que estés a mi lado para ayudarme con tu sonrisa y caricias por estar a mi lado con tu inocencia y alegría, por estar a mi lado jugando o comiendo en fin hijo gracias simplemente por estar conmigo. En fin Carmen y Benja gracias a ustedes por estar junto a mi y por hacerme sentir apreciado las 24 horas del día, los 365 días del año y los primero 5 años de nuestra familia.

“... todo viaje de mil leguas comienza con el primer paso...”

Sun Tzu, El Arte de la Guerra



A Carmen y Benjamín

Con todo mi yo.. y todo my love!!!

INDICE GENERAL

	Página
Índice General.	I
Índice de Figuras.	VII
Índice de Tablas.	X
Abreviaturas.	XI
RESUMEN.	XIV
ABSTRACT.	XVI
	
I. INTRODUCCIÓN.	1
1. Generalidades de la Vitamina C.	1
1.1 Biosíntesis y funciones de la vitamina C.	3
2 Transporte de la vitamina C.	6
2.1 Transporte de vitamina C asociado a transportadores dependiente de sodio (SVCTs).	7
2.2 Transporte de vitamina C asociado a transportadores facilitativos de glucosa (GLUTs).	8
2.2.1 Aspectos generales de los transportadores de glucosa.	8
2.2.2 Incorporación de DHA a través de GLUTs	10
2.3 Liberación de la vitamina C.	12
3 La vitamina C en el sistema nervioso central (SNC).	15

3.1	Entrada de la vitamina C al cerebro.	15
3.2	Distribución de la vitamina C en el cerebro	16
3.3	Liberación de la vitamina C en el SNC.	17
3.4	Reciclaje de la vitamina C en el cerebro.	19
4	Importancia del reciclaje de la vitamina C para el metabolismo cerebral.	19
4.1	Relación entre el reciclaje de vitamina C, niveles de glutamato y metabolismo glucolítico.	20
4.1.2	Interacción entre los niveles de vitamina C y transmisión glutamatérgica.	22
4.1.3	Efecto de la vitamina C sobre el metabolismo energético cerebral	25
II	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA EN ESTUDIO.	28
III	HIPÓTESIS	30
1	Objetivo general	31
2	Objetivos específicos	31
IV	MATERIALES Y MÉTODOS	32
1	Animales de experimentación.	32
2	Cultivos celulares	32
2.1	Cultivos primarios de astrocitos corticales.	32
2.2	Cultivos primarios de neuronas corticales.	33
2.3	Cultivo de células C6.	34
3	Análisis inmunocitoquímico.	35
3.1	Análisis inmunocitoquímico de células en cultivo.	35
3.2	Microscopía confocal.	37
3.3	Cuantificación de la intensidad de fluorescencia en muestras	37



	inmunocitoquímicas.	
4	RT-PCR convencional.	37
4.1	Extracción de ARN total.	37
4.2	Transcripción reversa del ARN total (RT).	38
4.3	Amplificación del cADN por PCR.	38
4.4	Electroforesis en geles de agarosa.	41
5	RT-PCR cuantitativo en tiempo real (qRT-PCR).	41
6	Ensayos de inmunodetección de proteínas	42
6.1	Obtención de extractos de proteínas totales.	42
6.2	Electroforesis en gel de poliacrilamida y electrotransferencia.	42
6.3	Inmunodetección de las proteínas.	43
7	Ensayos de transporte.	44
7.1	Ensayos de captación en el tiempo.	45
7.2	Determinación de los parámetros cinéticos.	46
7.3	Estudios de inhibición.	46
7.4	Experimentos de liberación de vitamina C.	47
8	Ensayos metabólicos de utilización de glucosa	48
8.1	Determinación del flujo glucolítico.	49
8.2	Determinación de la actividad de la vía de las pentosas fosfato (PPP).	50
8.3	Cuantificación de la actividad de las enzimas <i>hexoquinasa</i> y <i>Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa</i> .	51
9	Cuantificación de los niveles de GSH	52
9.1	Determinación de los niveles de glutatión en astrocitos y neuronas.	52
10	Determinación de apoptosis celular	52
10.1	Análisis de apoptosis por el método de tinción nuclear con DAPI.	52
11	Cromatografía líquida de alta presión (HPLC)	53
11.1	Identificación de la forma redox de vitamina C intracelular.	53

V	RESULTADOS.	55
1	CAPITULO 1. Función de los transportadores de glucosa/DHA en astrocitos y su modulación por glutamato.	55
1.1	Caracterización de los cultivos primarios de astrocitos.	56
1.2	Efecto del periodo de cultivo de los astrocitos en la expresión del transportador GLUT1.	56
1.3	Captación de 2-DOG y DHA en astrocitos mantenidos por diferentes periodos en cultivo.	60
1.4	Efecto de glutamato en la captación de 2-DOG y DHA en astrocitos mantenidos por diferentes periodos en cultivo.	73
1.5	Análisis inmunocitoquímico de marcadores de astrocitos activados en cultivos primarios de astrocitos de 15 y 30DIV.	77
1.6	Resumen de resultados del Capítulo 1.	84
2.	CAPITULO 2. Efecto de la acumulación de DHA, sobre el metabolismo redox y energético de astrocitos en cultivo.	85
2.1	Análisis del potencial reductor de los astrocitos mantenidos por diferentes periodos <i>in vitro</i> .	85
2.2	Efecto de la acumulación de DHA sobre la velocidad glicolítica, actividad de la vía de las pentosas fosfato (PPP) y niveles de glutatión (GSH) en astrocitos mantenidos en cultivo.	89
2.3	Efecto de la acumulación de vitamina C intracelular, sobre la utilización de lactato en astrocitos mantenidos en cultivo.	101

2.4	Liberación de vitamina C desde astrocitos en cultivo.	105
2.5	Efecto de glutamato sobre el metabolismo redox y energético en astrocitos mantenidos en cultivo.	110
2.6	Resumen del capítulo 2.	111
3	CAPITULO 3. Estudio de la acumulación de DHA sobre el metabolismo energético y redox de neuronas corticales mantenidas <i>in vitro</i>.	115
3.1	Análisis de la incorporación de 2-DOG, AA y DHA en neuronas corticales mantenidas en cultivo.	115
3.2	Análisis de la capacidad reductora y de liberación de vitamina C en neuronas corticales de 5 DIV.	121
3.3	Efecto de la acumulación de vitamina C sobre velocidad glicolítica, actividad de la vía PPP y niveles de GSH en neuronas corticales.	125
3.4	Efecto de la acumulación de vitamina C en la incorporación de lactato en neuronas corticales.	133
3.5	Efecto de glutamato sobre el metabolismo de la vitamina C y de glucosa en neuronas.	136
3.6	Resumen del capítulo 3.	139
VI	DISCUSIÓN.	140
6.1	Modelo propuesto para explicar la expresión y función de los transportadores de vitamina C/glucosa y el efecto de DHA.	141
6.2	El periodo de cultivo de los astrocitos incrementa la captación de DHA y no la captación de 2-DOG.	144
6.3	¿Qué representan los astrocitos de 15 y 30 DIV, astrocitos fisiológicos o activados?.	150

6.4	¿Qué ocurre con el DHA una vez en el interior de los astrocitos?.	152
6.5	¿Son realmente los astrocitos células capaces de liberar vitamina C?.	155
6.6	¿Cómo afecta la acumulación de DHA el metabolismo de glucosa?.	157
6.7	El DHA como regulador del metabolismo energético en astrocitos.	158
6.8	La acumulación de vitamina C en astrocitos modula el metabolismo de lactato.	160
6.9	Transporte de AA y DHA en neuronas	162
6.10	Efecto de la acumulación de vitamina C en neuronas.	163
6.11	Modelo propuesto para la interacción neurona-astrocito y neurona-astrocito activado	168
VII	CONCLUSIONES GENERALES	172
VIII	BIBLIOGRAFÍA	174
IX	ANEXO 1	192



INDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Estructura química de la vitamina C y sus derivados.	2
Figura 2	Modelo de acoplamiento entre la vitamina C y otros agentes antioxidantes presentes en la célula.	4
Figura 3	Captación de ambas formas redox de la vitamina C.	9
Figura 4	Modelo de reciclamiento de la vitamina C.	21
Figura 5	Interacción entre el reciclamiento de vitamina C, glutamato y metabolismo glucolítico.	24
Figura 6	Caracterización de los cultivos primarios de astrocitos corticales.	57
Figura 7	Expresión del ARNm y proteína del transportador GLUT1 en astrocitos in vitro.	59
Figura 8	Expresión de GLUT1 en astrocitos mantenidos en cultivo por diferentes periodos.	62
Figura 9	Curva de tiempo y análisis farmacológico de la incorporación de 2-DOG y DHA en astrocitos de 15 y 30DIV.	64
Figura 10	Análisis de inhibición del transporte de DHA por diferentes compuestos, en cultivos primarios de astrocitos.	66
Figura 11	Expresión del mRNA y proteína del transportador GLUT3 en astrocitos mantenidos en cultivo.	69
Figura 12	Expresión de GLUT3 en astrocitos mantenidos en cultivo por diferentes periodos.	72
Figura 13	Análisis funcional de la incorporación de 2-DOG en astrocitos de 15 y 30DIV.	74
Figura 14	Efecto de glutamato sobre la captación de 2-DOG y DHA en astrocitos mantenidos en cultivo por 15 y 30 días.	76
Figura 15	Efecto de glutamato sobre la viabilidad celular en astrocitos de 15 y 30 DIV.	78

Figura 16	Expresión de EAAT1 en astrocitos mantenidos en cultivo por diferentes periodos.	79
Figura 17	Análisis de la expresión de GFAP, vimentina, MAP-2 y nestina en astrocitos mantenidos por 15 y 30 DIV y en la línea celular C6.	83
Figura 18	Análisis cinético del potencial reductor de astrocitos de 15 y 30 DIV.	87
Figura 19	Efecto de la acumulación de vitamina C sobre la actividad glicolítica de astrocitos en cultivo.	91
Figura 20	Efecto de la acumulación de AA o DHA sobre la actividad de la enzima hexoquinasa (HK) en astrocitos de 15 y 30 DIV.	93
Figura 21	Efecto de la acumulación de vitamina C sobre la actividad de la vía de las pentosas fosfato (PPP) y la actividad de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) en astrocitos en cultivo.	96
Figura 22	Efecto de la acumulación de vitamina C sobre los niveles de GSH en astrocitos de 15 y 30 DIV.	100
Figura 23	Curva de progreso y análisis farmacológico de la incorporación de lactato en astrocitos de 15 y 30DIV.	103
Figura 24	Estudio farmacológico de la liberación de vitamina C desde astrocitos mantenidos en cultivo.	108
Figura 25	Análisis del efecto de glutamato sobre el potencial reductor y energético de los astrocitos en cultivo.	114
Figura 26	Análisis inmunocitoquímico de la expresión de SVCT2, GLUT1 y GLUT3 en cultivos primarios de neuronas de 5 DIV.	117
Figura 27	Curva de tiempo y análisis farmacológico de la incorporación de AA, 2-DOG y DHA en neuronas de 5 DIV.	120
Figura 28	Análisis del potencial reductor y de liberación de vitamina C en neuronas corticales.	124

Figura 29	Efecto de la acumulación de vitamina C sobre la actividad glicolítica y la actividad de la vía de las pentosas fosfato (PPP) en cultivos neuronales.	127
Figura 30	Efecto de la acumulación de AA y DHA sobre la actividad hexoquinasa y G6PDH en neuronas de 5 DIV.	129
Figura 31	Efecto de la acumulación de vitamina C sobre los niveles de GSH en neuronas de 5 DIV.	132
Figura 32	Curva de progreso y análisis farmacológico de la incorporación de lactato en astrocitos de 15 y 30DIV.	135
Figura 33	Análisis del efecto de glutamato sobre la captación de 2-DOG y DHA y sobre el metabolismo redox y energético neuronal.	138
Figura 34	Modelo propuesto para el metabolismo energético/redox en astrocitos de 15 DIV.	143
Figura 35	Modelo propuesto para el metabolismo energético/redox en astrocitos de 30 DIV.	146
Figura 36	Modelo propuesto para el efecto de DHA sobre el metabolismo energético neuronal	167
Figura 37	Modelo propuesto para la interacción astrocito-neurona y astrocito activado-neurona.	171



INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1 Mecanismos propuestos para la liberación de vitamina C.	14
Tabla 2 Anticuerpos primarios utilizados	36
Tabla 3 Anticuerpos secundarios utilizados	36
Tabla 4 Partidores utilizados para RT-PCR convencional y qRT-PCR.	40
Tabla 5 Agentes farmacológicos utilizados en los estudios de captación de AA, DHA, 2-DOG y lactato.	47
Tabla 6 Agentes farmacológicos utilizados en los estudios de liberación de vitamina C.	48
Tabla 7 Características inmunohistoquímicas y funcionales en los astrocitos de 15 y 30 DIV.	153



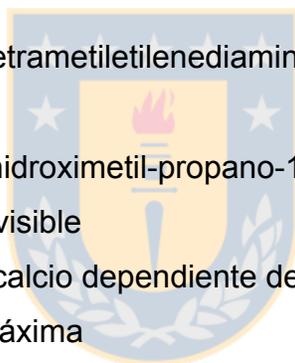
ABREVIATURAS

ADN	:	ácido de soxirribonucleico
ADNase	:	enzima desoxirribonucleasa
ADNc	:	ácido desoxirribonucleico copia
ADP	:	adenosin difosfato
AA	:	Áscorbato
ARNasas	:	enzima ribonucleasa
ARNm	:	Ácido ribonucleico mensajero
as	:	antisentido
ATP	:	adenosin trifosfato
BDNF	:	factor neurotrófico cerebral
BSA	:	albúmina de suero bovino
4-CIN	:	4-hidroxicinamato
Cx43	:	conexina 43
cy ²	:	cinanina 2
cy ³	:	cianina 3
cy ⁵	:	cianina 5
DEPC	:	dietilpirocarbonato
DIDS	:	ácido 4,4-di-isotiocianoestibeno-2,2-disulfónico
DHA	:	acido deshidroascórbico
DKG	:	ácido 2,3 diceto-1-gulónico
DMEM	:	medio minimo de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	:	dimetil sulfóxido
2-DOG	:	2-deoxi-D-glucosa
dNTPs	:	desoxirribonucleotidos
DTT	:	ditiotreitól
EDTA	:	ácido etilendiaminotetracético
G6PDH	:	glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
GFAP	:	proteína ácida fibrilar glial
GFP	:	proteína fluorescente verde



GLUT1	:	transportador de glucosa
Glu	:	glutamato
Gluc	:	glucosa
GSH	:	glutati3n
GSSG	:	glutati3n oxidado
H ₂ SO ₄	:	3cido sulf3rico
HBSS	:	soluci3n tamp3n salina de HEPES
HCl	:	3cido clorh3drico
HCO ₃	:	bicarbonato
HEPES	:	3cido 4-(2-hidroxi3til)-1-piperazineetanosulf3nico
HK	:	hexoquinasa
HL	:	hipot3lamo lateral
HPLC	:	cromatograf3a l3quida de alta presi3n
HRP	:	peroxidasa de rabano picante
IP	:	ioduro de propideo
K ⁺	:	potasio
KCl	:	cloruro de potasio
KH ₂ PO ₄	:	dihidr3geno fosfato de potasio
K _m	:	constante de Michaelis
LCR	:	l3quido cefalorraqu3deo
LDH	:	enzima l3ctico deshidrogenasa
MAP-2	:	prote3na asociada a microt3bulos 2
MEM	:	medio minimo esencial de Eagle
MgCl ₂	:	cloruro de magnesio
MgSO ₄	:	sulfato de magnesio
Na ₂ HPO ₄	:	hidr3geno fosfato de sodio
Nac	:	n3cleo acumbens
NaCl	:	cloruro de sodio
NADH	:	nicotinamida di nucle3tido reducido
NADHP	:	nicotinamida di nucle3tido fosfato reducido
PAGE	:	electroforesis en gel de poliacrilamida

PBS	:	tampón fosfato salino
PCR	:	reacción de la polimerasa en cadena
PFA	:	paraformaldehído
PMSF	:	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PPP	:	vía de las pentosas fosfato
ROS	:	especies reactivas derivadas de oxígeno
SDS	:	dodecilsulfato de sodio
SFB	:	suero bovino fetal
sn	:	sentido
SNC	:	sistema nervioso central
TAE	:	tampón tris acetato EDTA
TBS	:	tampón tris salino
TE	:	tampón tris
TEMED	:	N,N,N',N'-Tetrametiletilediamina
TL	:	tween leche
Tris	:	2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
UV-VIS	:	ultravioleta-visible
VDCC	:	canales de calcio dependiente del voltaje
V _{máx}	:	velocidad máxima



RESUMEN

La vitamina C cumple un rol fundamental como el agente antioxidante soluble más importante del cerebro. La forma reducida de la vitamina C, ascorbato (AA) es incorporada por los cotransportadores de sodio ascorbato (SVCTs), los cuales en el cerebro se expresan exclusivamente en neuronas. La forma oxidada de la vitamina C, el ácido deshidroascórbico (DHA) es incorporada a través de algunas isoformas de los transportadores facilitativos de glucosa (GLUTs), los cuales se expresan preferentemente en astrocitos.

En la presente tesis hemos estudiado varios aspectos del reciclamiento de la vitamina C mediante la interacción astrocito – neurona. Por lo cual postulamos que: “El reciclamiento de la vitamina C en el sistema nervioso central modula el metabolismo energético de astrocitos y neuronas, efecto que es modulado por glutamato.

Los experimentos realizados en astrocitos nos permitieron describir que el periodo de cultivo de estas células modula drásticamente la capacidad para reciclar el DHA incorporado. De esta forma, los astrocitos de 15 DIV son capaces de incorporar DHA, vía GLUT1 y generar AA intracelularmente, el cual es liberado al espacio extracelular. La acumulación de DHA potencia la capacidad reductora de estas células; provocando un aumento en la actividad de la vía de las pentosas fosfato (PPP) y en los niveles de glutatión reducido (GSH), favoreciendo la reducción del DHA.

En astrocitos de 30 DIV, observamos una baja en el potencial reductor de estas células, posiblemente por encontrarse en un estado reactivo, ya que inducen

la expresión de diferentes marcadores de gliosis. El estado reactivo, afecta diversos parámetros relacionados con el reciclaje de la vitamina C, de esta forma se induce la expresión del transportador GLUT3 y se incrementa la capacidad para incorporar DHA. Sin embargo, estas células pierden la capacidad de reducir en el tiempo, eficientemente el DHA. Además, la acumulación de DHA inhibe la actividad de la vía PPP, lo que conlleva a una pérdida de los niveles de GSH.

Finalmente, demostramos que las neuronas son principalmente productoras de DHA y presentan un bajo potencial reductor. La acumulación de DHA afecta significativamente al metabolismo energético neuronal ya que inhibe drásticamente la glicólisis e inhibe la actividad de la vía PPP, efectos que en su conjunto representan una condición de estrés celular.

Con la evidencia obtenida en este trabajo de tesis proponemos que los astrocitos de 15 DIV representan a un astrocito cerebral normal, el cual tiene la capacidad de reducir eficientemente el DHA y liberar AA al espacio extracelular. Además, la incorporación de DHA potencia su reducción estimulando la actividad de la vía PPP, y con ello aumentando los niveles de GSH. El AA liberado podría ser incorporado por las neuronas y ser utilizado como agente antioxidante para evitar el daño oxidativo. Por otro lado, los astrocitos de 30 DIV tendrían propiedades de un astrocito reactivo, no reciclarían eficientemente DHA, liberando esta molécula al medio extracelular, probablemente generando más daño oxidativo.

En este trabajo de tesis hemos profundizado en el mecanismo del reciclamiento de la vitamina C cerebral y en el efecto de este proceso sobre algunos aspectos que regulan el balance energético cerebral.

ABSTRACT

Vitamin C is the most important soluble antioxidant in the brain. The reduced form of vitamin C, ascorbate (AA), is incorporated by sodium ascorbate cotransporters (SVCTs), which, in the brain, are expressed exclusively in neurons. In contrast, astrocytes only incorporate the oxidized form of vitamin C, dehydroascorbic acid (DHA), through glucose transporters (GLUTs).

In this work, we analyzed the vitamin C recycling associated with neuron-astrocyte interactions. We hypothesized that “the recycling of vitamin C in the central nervous system modulates energy metabolism of astrocytes and neurons, a process modulated by glutamate”. To test this hypothesis, we analyzed the vitamin C recycling capacity of neurons and astrocytes. To address the effect of vitamin C recycling on energy metabolism, we determined the effect of AA or DHA accumulation over the rate of glycolysis, pentose phosphate pathway activity (PPP) and glutathione (GSH) levels in astrocytes and neurons.

Experiments in astrocytes established that the culturing time drastically modulates DHA recycling. After 15 DIV, astrocytes are able to uptake and reduce the DHA to AA, which is released into the extracellular space. Accumulation of DHA increases the redox metabolism in these cells, stimulating the activity of the PPP and increasing the intracellular GSH levels.

We also analyzed the reduction of DHA by astrocytes of 30 DIV. We found that these cells are able to uptake higher levels of DHA, but cannot reduce it. Also, we found that the accumulation of DHA in this model inhibits the PPP activity and

decreases the GSH levels. In parallel, we observed that astrocytes of 30 DIV induce the expression of reactive astrocytes markers such as vimentin and MAP-2. Therefore, astrocytes of 30 DIV could be a model of reactive astrocytes.

Finally, we showed that neurons are mainly producing DHA, but have a low potential to uptake or reduce it. The accumulation of DHA in neurons significantly affects the energy metabolism since the DHA inhibits the glycolysis in these cells, which could generate neuronal death.



I.- INTRODUCCIÓN

1.- Generalidades de la Vitamina C.

La vitamina C es un micronutriente esencial para el funcionamiento metabólico normal del organismo. Es utilizada como cofactor en reacciones de hidroxilación, es un poderoso antioxidante hidrosoluble y recientemente se ha determinado su participación en procesos de diferenciación en diversos tipos celulares. En el plasma sanguíneo se encuentra en una concentración cercana a 50 μM principalmente en su forma reducida o ascorbato (AA) y en un $<5\%$ en su forma oxidada o ácido deshidroascórbico (DHA) (Rice, 2000; Savini et al., 2005). El AA tiene dos protones disociables con valores de pKa de 4,2 y 11,8 por lo que a pH fisiológico se encuentra como el anión monovalente ascorbato (Rice, 2000).

La función del ascorbato como un poderoso antioxidante se basa en la alta capacidad de donar electrones, ayudando a reducir radicales libres generados en diversos procesos fisiológicos y fisiopatológicos. Cuando el AA dona un electrón se genera el radical ascorbilo y cuando dona el segundo electrón se produce el ácido deshidroascórbico (DHA) (Figura 1). El DHA es una molécula inestable que presenta una vida media de 3-5 minutos, en condiciones fisiológicas (Bode et al., 1990; Halliwell, 1996; May et al., 2003; Linster and Van Schaftingen, 2007). La reducción del DHA a AA no es favorable energéticamente, por ende necesita de un dador de electrones que permita regenerar el AA.

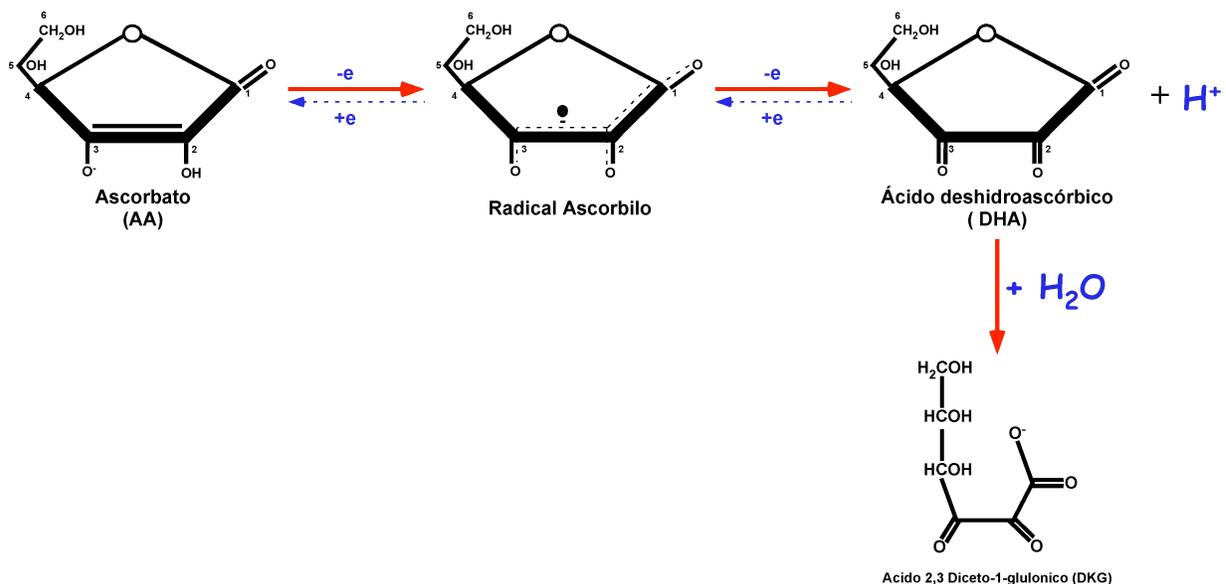


Figura 1: Estructura química de la vitamina C y sus derivados.

El ácido L-Ascórbico (ascorbato) se oxida rápidamente en condiciones fisiológicas. Al liberar un electrón se genera el radical ascorbilo, el cual es altamente inestable y transiente, el radical ascorbilo libera un segundo electrón y genera el producto oxidado final de la vitamina C el ácido deshidroascórbico (DHA). Si el DHA no es reducido por la acción de dadores de electrones enzimáticos o no enzimáticos es hidrolizado rápidamente y de forma irreversible generando el ácido 2,3 diceto-1-gulónico (DKG), el cual es metabolizado como fuente de carbono celular a través de las vía de las pentosas fosfato (Bode et al., 1990; Carr and Frei, 1999a; Carr and Frei, 1999b; Rice, 2000; Linster and Van Schaftingen, 2007).

1.1.- Biosíntesis y funciones de la vitamina C.

En la mayoría de los mamíferos la vitamina C es sintetizada en el hígado a partir de glucosa. Sin embargo, el ser humano, otros primates y el cobayo han perdido la capacidad de sintetizar la vitamina C, ya que poseen un gen no funcional para la enzima L-gulono- γ -lactona oxidasa, necesaria para el último paso en la biosíntesis del AA (Nishikimi and Yagi, 1991; Meister, 1994).

El potencial de reducción del AA es muy bajo, lo cual le permite regenerar otros agentes antioxidantes como la vitamina E o el glutati6n (GSH), lo que sumado a su pequeño tama1o y alta hidrosolubilidad, hace que sea uno de los principales antioxidantes de los fluidos biol6gicos (Meister, 1994; May et al., 1996; Dringen and Hirrlinger, 2003). La capacidad de la vitamina C de interactuar con otros agentes antioxidantes toma gran importancia en condiciones de estr6s oxidativo, ya que es en estas condiciones donde la c6lula necesita mantener el balance redox (Figura 2), (Halliwell, 1996; Carr and Frei, 1999b; Banhegyi et al., 2007).

La carencia de vitamina C genera diferentes des6rdenes, tales como, escorbuto, alteraciones neurol6gicas y des6rdenes 6seos (Carr and Frei, 1999a). Entre los s6ntomas derivados de la deficiencia de vitamina C se encuentran la debilidad muscular, sangramiento de las enc6as, p6rdida de dientes y problemas de cicatrizaci6n. Los efectos antiescorb6uticos de la vitamina C tienen relaci6n con su participaci6n como cofactor de las enzimas prolina hidroxilasa y lisina hidroxilasa en la s6ntesis del col6geno. La vitamina C tambi6n es cofactor de otras dioxigenasas que participan en la s6ntesis de carnitina, esencial para el transporte de los 6cidos grasos

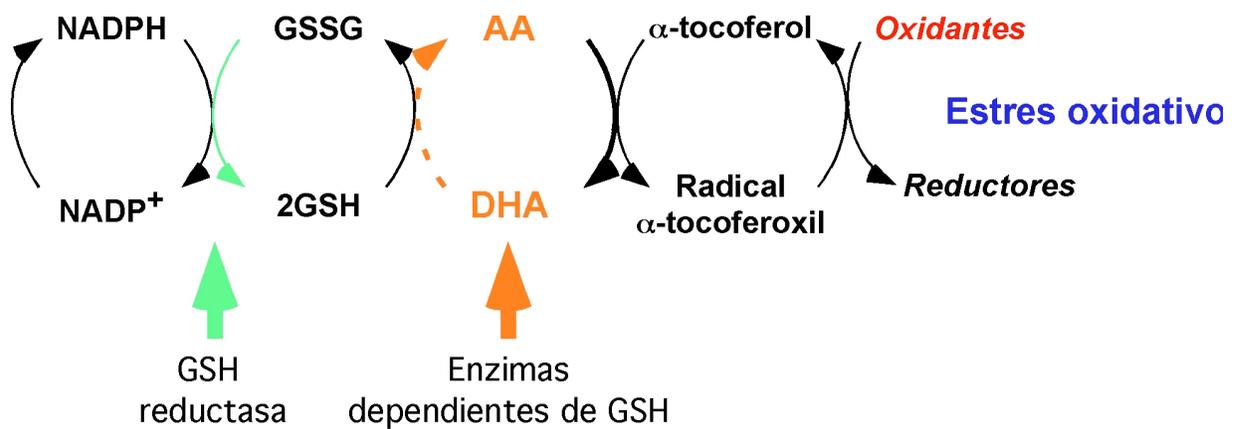


Figura 2: Modelo de acoplamiento entre la vitamina C y otros agentes antioxidantes presentes en la célula.

El AA puede interactuar con la forma oxidada del glutatión (GSSG) para regenerar glutatión reducido (GSH), el acoplamiento antioxidante también se puede producir con el proceso de oxidación y reducción del α -tocoferol (vitamina E). Los procesos de reducción del DHA y GSSH necesitan la participación de diferentes enzimas tales como las tioredoxinas o la GSH reductasa, las cuales utilizan como dadores de electrones al derivado del ciclo glicolítico, NADPH (Dringen and Hirrlinger, 2003; Franco and Cidlowski, 2009).

de cadena larga a la mitocondria, la deficiencia en la síntesis de carnitina puede explicar síntomas como la letargia y la fatiga (Englard and Seifter, 1986; Carr and Frei, 1999b).

Un aspecto importante de la acción antioxidante de la vitamina C es su capacidad de interaccionar con otras moléculas antioxidantes, como el glutatión (GSH), el antioxidante más abundante en el organismo, la interacción entre el AA y GSH es bidireccional, es decir, el AA puede regenerar el glutatión oxidado (GSSG) de la misma forma que el GSH puede reducir el DHA para generar nuevamente AA, este ciclo de oxido reducción puede además ser modulado por diferentes enzimas antioxidantes, las cuales en su mayoría acoplan la oxidación de GSH para cumplir con su función (Reiter, 1995; Dringen, 2000a; Dringen and Hirrlinger, 2003; Franco and Cidlowski, 2009). Considerando que la gran mayoría de las enzimas antioxidantes presentes en la célula, realizan su función acopladas a la oxidación del GSH y visto que el AA es capaz de regenerar el GSH, la vitamina C participa indirectamente en una amplia gama de mecanismos diseñados para proteger a la célula de compuestos oxidantes y del estrés oxidativo (Figura 2).

Recientemente, se ha ampliado el estudio de las funciones asociadas a la vitamina C, de esta forma se ha determinado que tendría un rol en la diferenciación de distintos tipos celulares. En este sentido, se ha demostrado que el AA favorece la diferenciación a neuronas dopaminérgicas a partir de precursores mesencefálicos expandidos en presencia del factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) y promueve la diferenciación de precursores corticales del SNC a neuronas y astrocitos (Lee et al., 2003). Recientemente, se ha descrito que la vitamina C es capaz de

augmentar la generación de *stem cells* inducidas (iPSCs) tanto desde células de ratón como desde células somáticas humanas (Esteban et al., 2010).

Las funciones anteriormente descritas se asocian a la forma reducida de la vitamina C. el AA. Por años se descartó que los derivados oxidados de la vitamina C cumplieran alguna función relevante en el metabolismo celular, sin embargo, diversos grupos han descrito que el DHA tendría una serie de funciones en la célula. De esta forma se ha descrito que el DHA podría inhibir a algunas enzimas de la glicólisis, como la *hexoquinasa (HK)*. Por otro lado, podría estimular la actividad de algunas enzimas de la vía de las pentosas fosfato, como la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) (Fiorani et al., 1996; Fiorani et al., 2000; Puskas et al., 2000). Además, se ha demostrado que el DHA actuaría como un agente pro-oxidante, provocando la muerte neuronal (Song et al., 1999, 2001; Song et al., 2002; Wilson, 2002). Este efecto, no se ha observado en células capaces de reducir el DHA y generar AA, tales como los astrocitos (Kim et al., 2005).

2.- Transporte de la vitamina C.

Para ingresar a la célula, la vitamina C puede seguir diversas rutas, las cuales dependen de su forma redox (Esteban et al., 2010). El AA es incorporado por un transporte activo dependiente de un gradiente electroquímico de sodio llevado a cabo por los transportadores SVCTs. El DHA es incorporado por algunas isoformas de los transportadores facilitativos de hexosas (GLUTs) (Figura 3) (Welch et al., 1995; Nualart et al., 2003; Astuya et al., 2005; Wilson, 2005; Savini et al., 2008; Corti et al., 2010).

2.1.- Transporte de vitamina C asociado a transportadores dependiente de sodio (SVCTs).

Hasta la fecha se han clonado dos isoformas funcionales de los co-transportadores sodio/ascorbato, denominados SVCT1 y SVCT2. Estos estudios se realizaron en una genoteca de ADNc de rata y humano, a partir de la cual se definió a SVCT1 como una proteína de 604 aminoácidos y a SVCT2 como una proteína de 592 aminoácidos, con un 65% de homología con SVCT1 (Daruwala et al., 1999; Tsukaguchi et al., 1999). Ambas proteínas presentan diferente distribución en el organismo de tal manera que el transportador SVCT1 se localiza principalmente en tejidos epiteliales tales como intestino delgado, hígado y riñón (Rice, 1999; Tsukaguchi et al., 1999; Savini et al., 2008). Por otro lado SVCT2 se presenta en el sistema endocrino, ojo, meninges y neuronas (Tsukaguchi et al., 1999; Castro et al., 2001; Savini et al., 2008; Caprile et al., 2009). Ambos transportadores son estereoespecíficos para el L-Ascorbato, dependientes de la temperatura y fuertemente dependientes de un gradiente de Na^+ (Tsukaguchi et al., 1999). Además presentan una alta afinidad para el transporte de AA con valores de Km que fluctúan entre 100-300 μM para SVCT1 (Castro et al., 2008b; Savini et al., 2008) y de 20-60 μM para el transportador SVCT2 (Castro et al., 2001; Savini et al., 2008). Recientemente, se describió una isoforma de SVCT2 que aparentemente jugaría un rol en la regulación del transporte. Esta consiste en una delección de los dominios transmembrana 5, 6 y parte del 4 de SVCT2, la cual no sería funcional para el transporte de AA. Sin embargo, inhibiría fuertemente el transporte mediado por SVCT2 y en menor medida

de SVCT1, actuando de esta manera como un dominante negativo del transporte de AA (Lutsenko et al., 2004).

La importancia del transportador SVCT2 en la entrada de vitamina C al cerebro, se ve reflejada en estudios realizados en ratones *knockout* para SVCT2. Estos estudios revelan que SVCT2 es una proteína esencial para el transporte de vitamina C hacia el cerebro y para la supervivencia perinatal, debido a que los ratones homocigotos mueren dentro de pocos minutos después del nacimiento, debido a defectos respiratorios y hemorragias cerebrales intraparenquimales (Sotiriou et al., 2002).

2.2.- Transporte de vitamina C asociado a transportadores facilitativos de glucosa (GLUTs).



2.2.1- Aspectos generales de los transportadores de glucosa.

En mamíferos se conocen dos familias de transportadores involucradas en el transporte de hexosas, la familia denominada GLUT (transporte facilitado) y la familia denominada SGLT (transporte activo asociado a sodio) (Mueckler, 1994; Vannucci et al., 1997; Augustin, 2010). Los GLUTs son proteínas integrales de membrana con trece isoformas conocidas, GLUT1 a GLUT12 y HMIT (Thorens and Mueckler; Mueckler, 1994; Augustin, 2010; Thorens and Mueckler, 2010). Los GLUTs pertenecen a una superfamilia de proteínas transportadoras con 12 segmentos de transmembrana, que incluye a transportadores de diferentes hexosas y otros

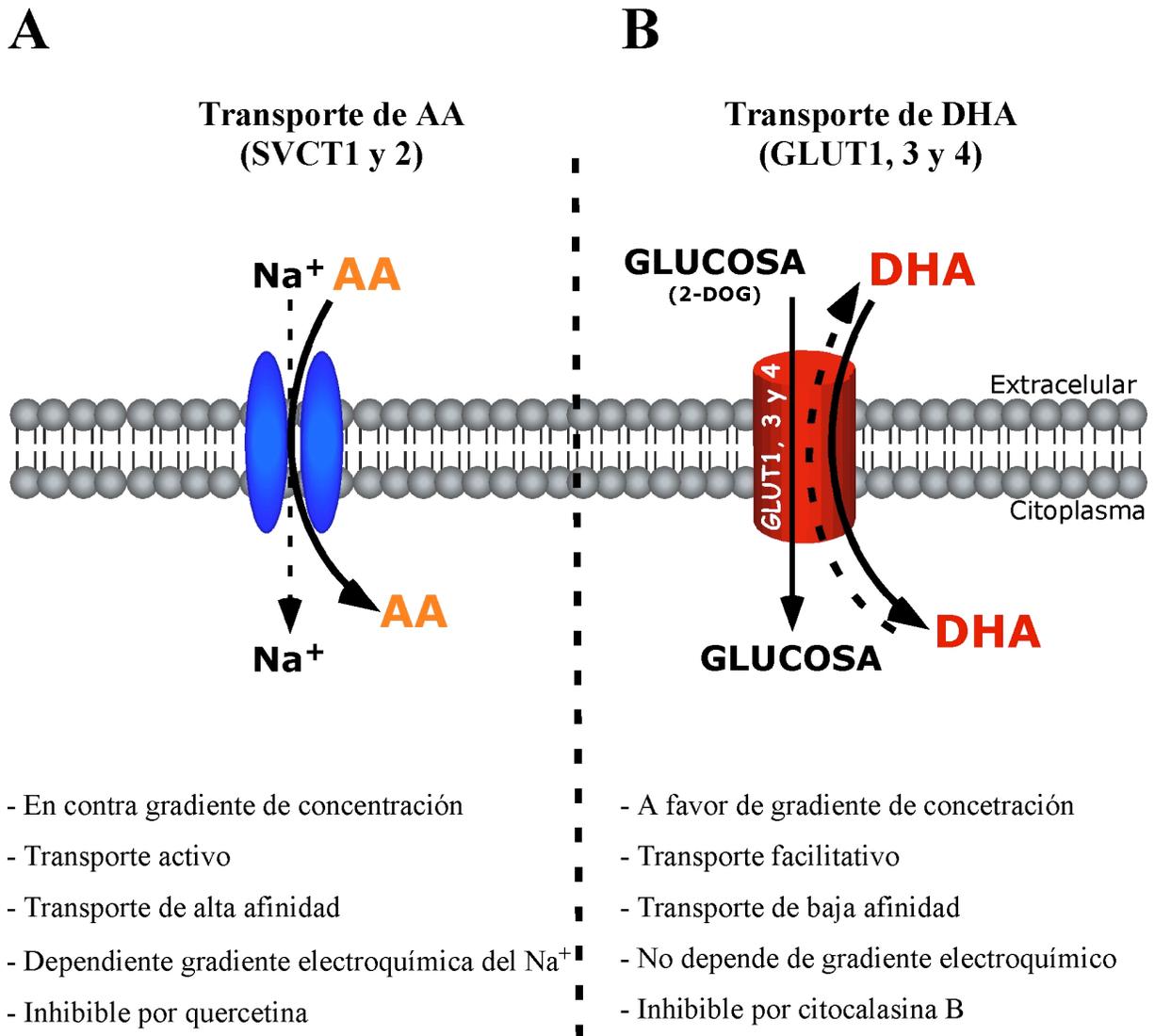


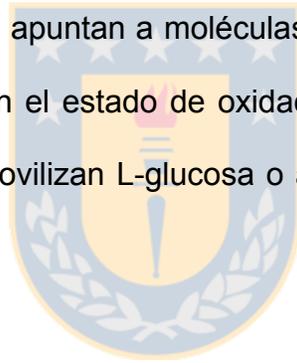
Figura 3: Captación de ambas formas redox de la vitamina C.

A. El AA es incorporado a través de los transportadores SVCT1 y SVCT2, es un transporte de alta afinidad y dependiente de la gradiente electroquímica de Na^+ (Wilson, 2005; Savini et al., 2008; Caprile et al., 2009). **B.** El DHA es incorporado por los transportadores GLUT1, 3 y 4; es un transporte facilitado y a favor de gradiente de concentración, de esta forma puede ocurrir en ambas direcciones (Wilson, 2005; Savini et al., 2008; Corti et al., 2010).

compuestos con carbono (Joost and Thorens, 2001; Joost et al., 2002; Macheda et al., 2005; Nualart et al., 2009).

La región carboxilo terminal es propia para cada isoforma y se encuentra extremadamente conservada entre distintas especies (Mueckler, 1994; Augustin, 2010).

Las cinco primeras isoformas (GLUT1 a GLUT5) fueron descritas originalmente como transportadores de glucosa, sin embargo, transportan otros sustratos como fructosa, galactosa, agua y DHA (Nualart et al., 2003; Wilson, 2005). A pesar de que las evidencias apuntan a moléculas multifuncionales, los GLUTs han demostrado ser específicos en el estado de oxidación e isómeros de las moléculas que transportan, ya que no movilizan L-glucosa o ácido ascórbico reducido (Wilson, 2005).



2.2.2.- Incorporación de DHA a través de GLUTs.

Por años el transporte de DHA no fue estudiado en profundidad, debido a que en condiciones normales, el DHA se encuentra en un pequeño porcentaje en el plasma sanguíneo (<5%) (Rice, 2000). Sin embargo, estudios posteriores determinaron que en ciertas condiciones patológicas, como la neuroinflamación, se observa un aumento en los niveles transientes de DHA. Además, se determinó que la forma oxidada de la vitamina C es incorporada a través de los transportadores de glucosa GLUTs, debido a su semejanza estructural con la D-glucosa (Figura 1) (Vera

et al., 1993; Wolf, 1996). Sin embargo, aun no se describen los mecanismos regulatorios asociados a este transporte, o el efecto que esta forma de vitamina C tiene sobre el metabolismo celular.

Se ha propuesto que la incorporación de DHA es una vía alternativa para aumentar los niveles de vitamina C reducida intracelularmente. Esto implica que las células deberían reducir el DHA incorporado, reacción que se ha observado en células endoteliales, musculares, condrocitos, células de la barrera hematorretinal y astrocitos (May et al., 2001; Korcok et al., 2002; Korcok et al., 2003; May et al., 2003; Catani et al., 2005; Wilson, 2005; May et al., 2006).

Hasta la fecha se ha descrito que sólo las isoformas GLUT1, 3 y 4 son capaces de transportar DHA con valores de K_m de 1,1 mM, 1,7 mM y 0,98 mM, respectivamente (Rumsey et al., 1997; Rumsey et al., 2000; Wilson, 2005). Es importante señalar que no se descarta que otras isoformas GLUTs sean capaces de transportar DHA. De esta forma existen evidencias que señalan que GLUT2, GLUT5 y GLUT10 (en ciertas condiciones) serían capaces de incorporar DHA. Sin embargo, la caracterización de este proceso no ha sido descrita para estas tres isoformas de transportador (Angulo et al., 2008; Lee et al., 2010).

Los datos cinéticos determinados para el transporte del DHA a través de los transportadores GLUTs han sido determinados en estudios *in vitro* utilizando como modelo *Ovocitos de Xenopus laevis*, existiendo a la fecha un número limitado de publicaciones que describen los parámetros cinéticos del transporte del DHA en células de mayor complejidad tales como astrocitos o glóbulos rojos (Wilson, 2005).

En relación a los mecanismos regulatorios del transporte del DHA, no hay publicaciones que describan cómo los diferentes estados de activación celulares afectan la incorporación de DHA. Este aspecto es de gran importancia ya que en condiciones fisiológicas el DHA debería competir con la glucosa por los transportadores GLUTs y la relación DHA/glucosa en el organismo es de 1/60, de esta forma el transporte del DHA debería ser despreciable (Wilson, 2005). Sin embargo, se ha demostrado que algunos tipos celulares, como los astrocitos, son capaces de incorporar altos niveles de DHA (Astuya et al., 2005). Resultados similares han sido propuestos en eritroblastos humanos en desarrollo (Montel-Hagen et al., 2008). Estas células son capaces de aumentar la afinidad por DHA al disminuir la afinidad por glucosa. Este mecanismo ocurriría debido a la expresión de *estomatina*, proteína que es capaz de interactuar con el transportador GLUT1 y cambiar su afinidad por glucosa.

2.3.- Liberación de la vitamina C.

Existe un gran avance en el estudio de los mecanismos involucrados en la captación de la vitamina C en diferentes tipos celulares, y una amplia caracterización cinética de los transportadores involucrados. Sin embargo existe poca información detallada sobre la liberación de la vitamina C de diferentes tipos celulares (Upston et al., 1999; Wilson, 2005).

Respecto a la salida de AA hay varios modelos propuestos (Corti et al., 2010) (Tabla 1). En primer lugar se ha observado liberación de vitamina C en varios tipos

celulares al incubar con glutamato extracelular, lo que ha llevado a proponer la existencia de un heterointercambiador glutamato/ascorbato, sin que todavía se haya demostrado la estructura de esta proteína (Grunewald, 1993). En segundo lugar, se ha descrito la salida de AA a través de un transportador sensible al volumen celular. Este parece ser el mecanismo utilizado por enterocitos, los que al realizar un transporte transepitelial modifican su volumen celular, activando este transportador localizado en la membrana basolateral (Furst et al., 2002). Un tercer modelo propuesto es la salida de AA mediada por exocitosis en diversas glándulas exocrinas. Entre estas se destaca la acumulación de AA en gránulos secretores de la glándula parótida, en donde esta molécula actúa como cofactor para la alfa-amidación de diversos productos generados en aquellos gránulos (von Zastrow et al., 1986). Además se ha propuesto la liberación de AA a través de hemicanales formados por conexinas. Este mecanismo ha sido planteado por un estudio que demostró que el AA es capaz de pasar a través de los hemicanales de conexina 26 (Cx26). Sin embargo, este estudio fue realizado en liposomas y por ende se desconoce la importancia de esta vía *in vivo* (Ahmad and Evans, 2002).

El último mecanismo propuesto para explicar la liberación de vitamina C, plantea que células como las neuronas de la retina de pollo pueden liberar AA a través de un transporte reverso de la proteína SVCT2 y que este eflujo sería controlado por la presencia de glutamato, ya que la incorporación de glutamato generaría un cambio en el gradiente de Na^+ capaz de revertir la direccionalidad del transportador SVCT2 (Tabla 1) (Portugal et al., 2009).

Tabla 1: Mecanismos propuestos para la liberación de vitamina C.

Mecanismo	Descripción	Modelos	Referencias
Glutamato-ascorbato heterointercambiador	Liberación de vitamina C en respuesta a glutamato, proteína no identificada	- Neuronas	(Grunewald, 1993)
Canales de aniones orgánicos sensibles a volumen	Apertura de canales en respuesta a cambio de volumen celular	<ul style="list-style-type: none"> - Células cromafines - Astrocitos - Línea neuronal SH-SY5Y - Células endoteliales 	(Knoth et al., 1987; Siushansian et al., 1997; Upston et al., 1999; May et al., 2006)
Exocitosis vesicular	Liberación en conjunto con hormonas	<ul style="list-style-type: none"> - Glándula parótida de rata - Células cromafines 	(Daniels et al., 1982; von Zastrow et al., 1986)
Hemicanales de Conexina	Difusión de AA a través de hemicanales de conexina 43	- Liposomas	(Ahmad and Evans, 2002)
Transporte reverso SVCT2	SVCT2 libera AA por inversión en la gradiente electroquímica del Na ⁺	- Neuronas retinales de pollo	(Portugal et al., 2009)

Respecto al eflujo de DHA no hay trabajos que lo caractericen. Sin embargo, la bidireccionalidad de los transportadores GLUTs sugiere que la salida de DHA podría ocurrir en aquellas células que tiendan a acumular este compuesto (Wilson, 2005; Corti et al., 2010).

3.- La vitamina C en el sistema nervioso central (SNC).

3.1.- Entrada de la vitamina C al cerebro.

Hace más de tres décadas se postuló que el ingreso de vitamina C al cerebro ocurre a nivel de la barrera constituida por los plexos coroideos, proceso que involucra la existencia de un mecanismo de transporte activo y un componente de difusión facilitada (Spector and Lorenzo, 1973). Posteriormente, estudios realizados en cultivos bicamerales de plexos coroideos de porcino, han demostrado la funcionalidad de SVCT2 en la cara basolateral de estas células. Sin embargo, actualmente se desconocen los mecanismos involucrados en la salida de la vitamina C desde la membrana apical de estas células hacia el LCR, donde alcanza una concentración 10 veces mayor a la concentración plasmática. La concentración de vitamina C en el LCR (400 μ M) se mantiene en equilibrio con la del líquido extracelular (LEC) del cerebro, principalmente porque existe difusión de esta vitamina entre las células endoteliales.

3.2.- Distribución de la vitamina C en el cerebro

En el tejido cerebral adulto la vitamina C se concentra en regiones como el hipocampo, tálamo, hipotálamo y la corteza olfatoria. Por otra parte, las concentraciones de vitamina C en el cerebro adulto están reguladas homeostáticamente, con un recambio diario de un 2% por hora. Sin embargo, durante períodos de déficit prolongados de este sustrato en la dieta, el cerebro actúa reteniendo altos niveles de ésta, con un recambio inferior a un 2% por día (Hughes et al., 1971; Spector and Lorenzo, 1973; Rice, 2000) (Rice, 2000; Hediger, 2002) (Figura 4).

La vitamina C presente en el SNC alcanza una concentración promedio de 2-3 mM, varias veces superior a la encontrada en el plasma (50 μ M) (Rice, 2000). Dicha concentración es regionalmente dependiente, con altos niveles en las regiones anteriores, como corteza cerebral e hipocampo y con niveles progresivamente menores en regiones posteriores, como tronco cerebral (Rice, 1999, 2000).

Una vez dentro del cerebro, la vitamina C presenta una gran compartimentalización, alcanzando concentraciones de 400 μ M en el líquido cefalorraquídeo (LCR), 200-300 μ M en el parénquima cerebral, 10 mM en neuronas y 1 mM en astrocitos (Rice and Russo-Menna, 1998; Rice, 2000).

La alta concentración de vitamina C en ambos tipos celulares (astrocitos y neuronas) se explica por la presencia de transportadores específicos, que actúan de manera eficiente en la incorporación de esta molécula al interior celular. En la neurona se ha descrito la presencia del transportador SVCT2 (Castro et al., 2001) y

el transportador GLUT3, siendo este capaz de transportar DHA (Mueckler, 1994; Vannucci et al., 1997).

Respecto de la entrada de vitamina C al astrocito, se describió en un comienzo que estas células expresaban el transportador SVCT2 y que la presencia de esta proteína era la responsable de que estas células mantuvieran altos niveles de AA intracelulares (Korcok et al., 2000). Sin embargo, estudios posteriores demostraron que los astrocitos *in situ* no expresan el transportador SVCT2 y que son las condiciones de cultivo las que inducen la expresión de este transportador (Berger and Hediger, 2000; Astuya et al., 2005). Con estos antecedentes, se acepta que el astrocito es una célula capaz de incorporar solo DHA *in vivo*, transporte que sería realizado a través del transportador GLUT1.

3.3.- Liberación de la vitamina C en el SNC.

Diversos estudios han analizado la liberación de vitamina C en el sistema nervioso central (SNC), pero hasta la fecha no se ha establecido el mecanismo responsable de este proceso. En estos estudios se ha determinado que bajo diversas condiciones, tales como la etapa del día o la actividad neural del animal, se produce una variación en la cantidad de vitamina C presente en el líquido extracelular. Sin embargo, no se ha definido si el aumento de vitamina C en el líquido extracelular corresponde a una liberación producida por neuronas o por células gliales (Milby et al., 1981; O'Neill and Fillenz, 1985; Danbolt, 2001).

En estudios realizados *in vivo* en el cerebro de ratas, se ha determinado que la liberación de vitamina C es afectada por la presencia extracelular de glutamato, lo

cual produce un aumento en los niveles extracelulares de la vitamina C. Una posible explicación para este fenómeno sería el efecto neuroprotector del AA frente a la neurotoxicidad producida por glutamato (Milby et al., 1981; Rebec et al., 2005). El glutamato es el aminoácido que se encuentra en mayor concentración en el cerebro y además es el principal neurotransmisor excitatorio del SNC presentando una concentración que bordea los 5-15 mmol/Kg de peso (Danbolt, 2001; Nedergaard et al., 2002). Debido a la importancia de esta molécula, existen numerosos estudios que describen el efecto de este aminoácido sobre la liberación de vitamina C al medio extracelular.

El mecanismo propuesto para explicar la liberación de vitamina C inducida por glutamato, es la existencia de un intercambiador glutamato/ascorbato (Grunewald, 1993). Sin embargo, se ha establecido que ambos procesos son independientes y que la liberación de AA inducida por glutamato sería consecuencia del aumento de volumen intracelular, lo que activaría a los canales de aniones orgánicos sensibles a volumen (VSOACs) (Tabla 1) (Siushansian et al., 1996; Siushansian et al., 1997; Wilson et al., 2000; Wilson, 2005).

Diversos estudios sugieren que los astrocitos serían los responsables de liberar vitamina C frente a la presencia de glutamato en el medio extracelular (Tabla 1) (Siushansian et al., 1996; Siushansian et al., 1997; Wilson et al., 2000; Wilson, 2005). En estos estudios se trabajó con cultivos primarios de astrocitos los cuales al ser incubados con glutamato producen un aumento en la concentración de vitamina C extracelular. Este efecto es inhibido por agentes que bloquean la captación de glutamato y por inhibidores de los VSOACs (Siushansian et al., 1996; Wilson et al., 2000; Song et al., 2002; Wilson, 2005).

3.4.- Reciclaje de la vitamina C en el cerebro.

La idea del reciclaje de la vitamina C a nivel cerebral surge de la observación que en condiciones de deficiencia nutricional de vitamina C, lo que lleva a la pérdida masiva del AA de todos los órganos y células del organismo, sin embargo, las concentraciones de AA cerebral se mantienen altas por un mayor período de tiempo (Hughes et al., 1971; Englard and Seifter, 1986). Esto indica que el cerebro es el órgano con mayor capacidad de retención de AA, o en otras palabras, es el órgano que recicla el DHA de forma más eficiente (Hediger, 2002).

Los astrocitos serían las células encargadas de captar y reducir el DHA extracelular. El AA generado en los astrocitos sería liberado al espacio extracelular para quedar nuevamente a disposición de la neurona, célula que utiliza al AA como el principal agente antioxidante (Wilson et al., 2000; Castro et al., 2001; Wilson, 2005). El modelo de reciclaje de la vitamina C involucra un acoplamiento astrocito-neurona y una serie de procesos que aún no se comprenden en su totalidad (Figura 4). Además, no hay publicaciones que describan la regulación de este proceso ni la importancia que tendría este fenómeno en condiciones de estrés oxidativo.

4.- Importancia del reciclaje de la vitamina C para el metabolismo cerebral.

El reciclaje de la vitamina C mediante la interacción astrocito-neurona implica la participación de una serie de moléculas de gran importancia para el funcionamiento normal del cerebro, tales como GSH y glutamato, las cuales a su vez son capaces de

interaccionar con múltiples vías metabólicas que regulan el funcionamiento normal de las células. De esta forma nos interesó analizar el posible efecto del reciclaje de la vitamina C sobre el metabolismo energético del cerebro, principalmente sobre el metabolismo de la glucosa. Considerando estudios previos de nuestro laboratorio, que describen que la acumulación de AA es capaz de inhibir la captación de un análogo estructural de la glucosa y que este efecto es observado solo en neuronas y no en astrocitos. En esta dirección no existen antecedentes que describan la relación entre el reciclaje de la vitamina C, niveles de DHA, metabolismo energético y el efecto de glutamato sobre esta red de rutas metabólicas (Figura 5).

4.1- Relación entre el reciclaje de vitamina C, niveles de glutamato y metabolismo glucolítico.

Diversos estudios han determinado que la vitamina C es capaz de actuar como un neuromodulador de diversos neurotransmisores y nuestro laboratorio ha señalado evidencia de que la vitamina C tendría un rol como regulador metabólico en neuronas corticales (Castro et al., 2007; Castro et al., 2008a; Castro et al., 2009). Con estas evidencia podemos concluir que la vitamina C está involucrada en una serie de procesos celulares.

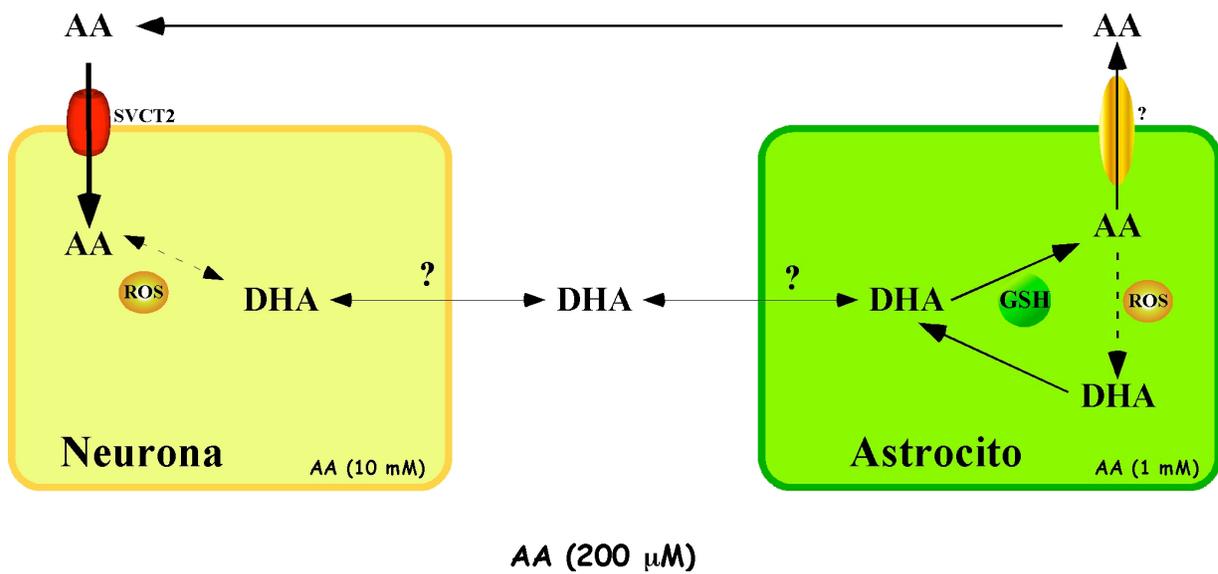


Figura 4: Modelo de reciclamiento de la vitamina C.

El reciclaje de la vitamina C entre neurona-astrocito involucra la captación específica de AA (mediado por SVCT2) por parte de las neuronas y la de DHA por parte de los astrocitos. Se ha postulado que el AA presente en las neuronas es oxidado a DHA producto del alto metabolismo oxidativo de estas células. El DHA generado saldría de la neurona a través del transportador GLUT3. El DHA extracelular podría ser incorporado por los astrocitos vía GLUT1. En el interior de los astrocitos, el DHA sería reducido a AA, para ser liberado y quedar nuevamente a disposición de las neuronas.

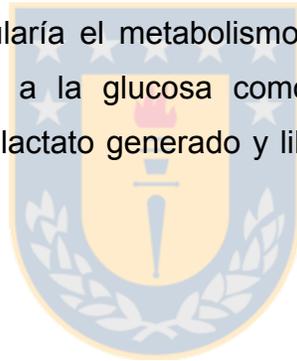
4.1.2- Interacción entre los niveles de vitamina C y transmisión glutamatérgica.

Glutamato, el principal neurotransmisor excitatorio del SNC, afecta profundamente la actividad neuronal mediante la interacción específica con receptores metabotrópicos e ionotrópicos (Danbolt, 2001). Las concentraciones fisiológicas de glutamato fluctúan entre 20 μ M en condición de reposo y 10 mM en condición de actividad sináptica (Nedergaard et al., 2002). En condiciones cerebrales normales, las concentraciones tóxicas de glutamato son prevenidas gracias a la rápida re-captación de esta molécula por los astrocitos. El glutamato incorporado por los astrocitos es transformado a glutamina, molécula que es liberada por los astrocitos al espacio extracelular desde donde es captada por la neurona célula que utiliza la glutamina como precursor para la síntesis de glutamato (Danbolt, 2001; Nedergaard et al., 2002).

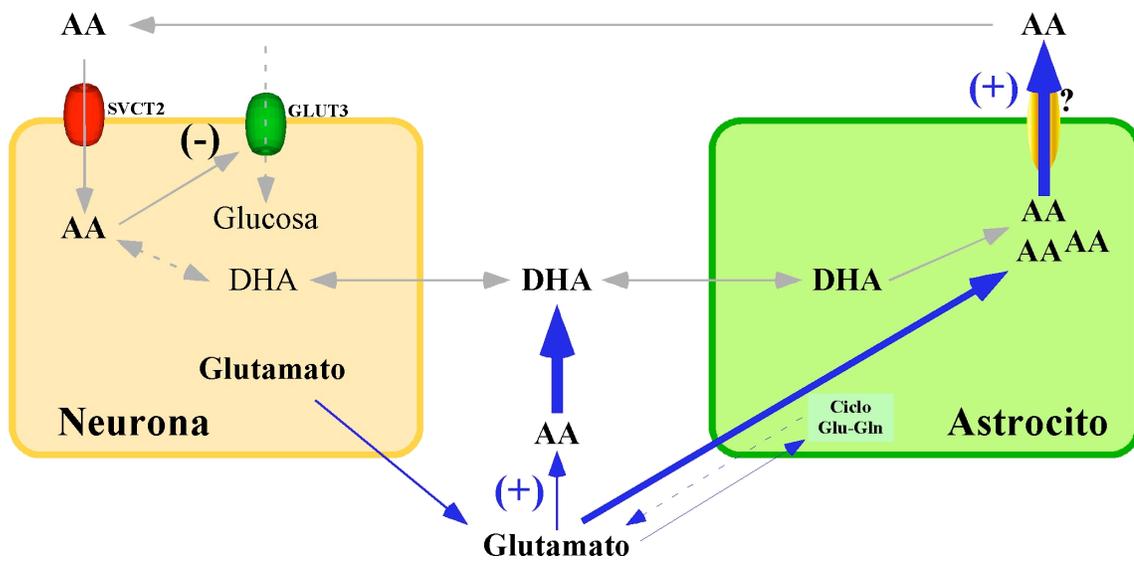
La relación entre la vitamina C y el metabolismo del glutamato surge de experimentos *in vivo* donde se demostró que la actividad glutamatérgica cerebral es acompañada por un aumento en los niveles extracelulares de vitamina C, posiblemente para impedir el daño oxidativo. Además se ha descrito que glutamato estimula la liberación de vitamina C desde los astrocitos (Figura 5A), (Milby et al., 1981; O'Neill and Fillenz, 1985; Rebec and Pierce, 1994).

Figura 5: Interacción entre el reciclamiento de vitamina C, glutamato y metabolismo glucolítico.

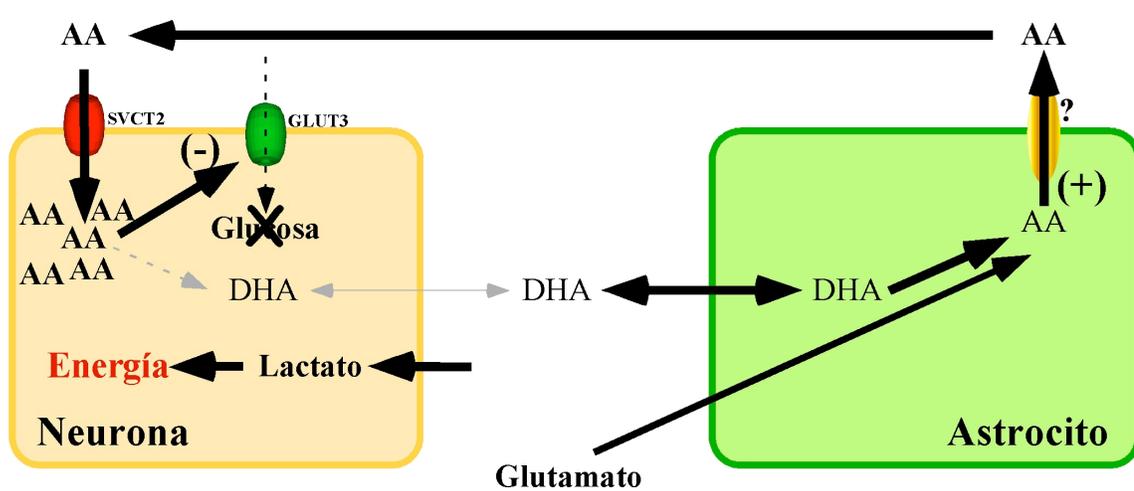
A. En condiciones de actividad glutamatérgica sostenida, el aumento del glutamato extracelular favorecería un microambiente oxidativo y la oxidación del AA a DHA. Además, se ha descrito que la presencia de glutamato estimula la liberación de vitamina C desde los astrocitos, no describiéndose hasta la fecha si afecta otros procesos implicados en el reciclaje de la vitamina C, tales como captación o reducción del DHA en astrocitos. **B.** El AA es capaz de modular la captación de 2-DOG en neuronas en cultivo, durante la transmisión glutamatérgica. El AA liberado desde los astrocitos por acción del glutamato es incorporado por las neuronas vecinas, esta acumulación inhibiría la incorporación de 2-DOG mediada por GLUT3 y por ende la vitamina C modularía el metabolismo energético neuronal, ya que las neuronas no podrían utilizar a la glucosa como principal fuente de energía y metabolizarían en su lugar al lactato generado y liberado por los astrocitos (Pellerin and Magistretti, 1994).



A)



B)



4.1.3- Efecto de la vitamina C sobre el metabolismo energético cerebral

Como se mencionó anteriormente, la actividad sináptica se encuentra fuertemente relacionada con el metabolismo energético del cerebro. En experimentos *in vivo*, mediante el uso del método de desoxiglucosa autorradiográfico, se ha demostrado una estrecha relación entre la actividad funcional y el consumo local de glucosa por el tejido nervioso (Yarowsky et al., 1983; Gross et al., 1985). Por consiguiente, las fluctuaciones en la concentración extracelular de AA, no tan sólo se relacionarían con la actividad sináptica cerebral, sino que también con el metabolismo energético del cerebro, en particular, con la utilización de glucosa cerebral.

Nuestro laboratorio ha descrito que la acumulación de AA intracelular en neuronas es capaz de inhibir la incorporación de 2-DOG en estas células. En estas condiciones las neuronas comenzarían a utilizar lactato como fuente energética. El lactato sería producido y exportado por los astrocitos para mantener el balance energético en las neuronas (Figura 5 B) (Magistretti et al., 1994; Pellerin and Magistretti, 1994; Allaman et al., 2011).

Paralelamente, se ha demostrado que el DHA sería capaz de afectar directamente el metabolismo glucolítico actuando como un inhibidor competitivo para diversas enzimas, destacando su acción sobre la *HK*. Se ha demostrado que altas dosis de DHA serían capaces de inhibir completamente y de forma irreversible a la *HK* humana de tipo I (Fiorani et al., 1996; Fiorani et al., 2000). Este resultado es de gran importancia ya que la *HK* cumple un rol clave en el metabolismo de la glucosa,

pues es la enzima encargada de generar *glucosa-6-fosfato*, molécula con la cual se originan 3 importantes rutas metabólicas, glicólisis, vía de las pentosas fosfato (PPP) y formación de glicógeno. La vía de las pentosas fosfato (PPP), vía metabólica mediante la cual se genera el cofactor NADPH, molécula vital para la defensa antioxidante. Pocos estudios han analizado la regulación de esta vía en el SNC y los estudios disponibles han analizado la importancia de PPP en neuronas, no existiendo información detallada en astrocitos u otras células gliales. Sin embargo, estudios realizados *in vitro* en la línea celular Jurka T, han demostrado que la incubación de las células con DHA provoca un aumento en la actividad PPP, principalmente por un aumento en la actividad de la enzima *G6PDH* (Puskas et al., 2000; Bolaños et al., 2007; Bolaños et al., 2008).

Por último la *HK* al generar *glucosa-6-fosfato* da inicio a la glicólisis. Sin lugar a dudas, es la ruta metabólica más estudiada y comprendida ya que mediante ésta se genera el piruvato, molécula principal para iniciar el ciclo de Krebs y por ende para generar los cofactores necesarios para la fosforilación oxidativa y generación de ATP. Pese a la importancia de esta ruta y al extenso análisis al que ha sido sometida, aún no se comprende en su totalidad los mecanismos regulatorios que la afectan ni cómo esta vía es regulada en el SNC y en patologías como el Alzheimer o cáncer (Herrero-Mendez et al., 2009; Israelsen and Vander Heiden, 2010; Vaishnavi et al., 2010; Vander Heiden et al., 2010).

Pese a que se describió el efecto del DHA sobre la *HK* no hay estudios que describan el efecto del DHA sobre el metabolismo de la glucosa en el cerebro.

Con lo expuesto anteriormente, queda claro que la vitamina C tendría un rol importante en el cerebro, ya que funcionaría como el principal antioxidante de las

neuronas, regularía indirectamente los niveles de otros agentes antioxidantes como el GSH. Además la vitamina C podría regular la acción de el neurotransmisor excitatorio más importante del SNC, el glutamato y por último podría regular fuertemente el metabolismo glucolítico de neuronas y células gliales (Figura 5).



II.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA EN ESTUDIO.

El cerebro mantiene altos niveles de vitamina C, incluso en condiciones de déficit nutricional, lo cual es una ventaja que no poseen otros órganos (Hughes et al., 1971; Englard and Seifter, 1986). Esta alta capacidad de retener la vitamina C ha sido explicada por la existencia de un acoplamiento entre neuronas y astrocitos que permitiría reciclar la vitamina C (Hediger, 2002). En el reciclaje de la vitamina C el astrocito cumpliría un importante rol, pues sería la célula encargada de captar y reducir el DHA desde el espacio extracelular, para impedir el efecto tóxico sobre las neuronas (Song et al., 2001; Song et al., 2002). Existen diversos estudios funcionales que describen la captación del DHA en astrocitos (Siushansian and Wilson, 1995; Siushansian et al., 1996; Siushansian et al., 1997), sin embargo, estos análisis han sido realizados utilizando como modelo astrocitos mantenidos en cultivo por largos periodos de tiempo, los cuales no representarían fielmente el comportamiento de estas células en el cerebro *in vivo*. Además, estos estudios no describen de forma detallada el transporte del DHA ni tampoco cómo cambia éste a lo largo de la maduración glial. El DHA captado por los astrocitos provendría de la oxidación previa del AA, el cual sería liberado desde las neuronas y oxidado en el espacio extracelular. La regulación de este proceso sigue siendo un aspecto desconocido. Sin embargo, se ha postulado que glutamato podría modular este fenómeno ya que un aumento en la actividad glutamatérgica se correlaciona con un alza en los niveles de vitamina C extracelulares, no describiéndose la forma redox liberada (O'Neill and Fillenz, 1985; Rebec and Pierce, 1994; Rebec et al., 2005). Además, se ha

determinado que la presencia de glutamato genera un micro ambiente oxidativo debido al aumento en la producción de ROS (Coyle and Puttfarcken, 1993; Danbolt, 2001; Nedergaard et al., 2002). Estos agentes oxidantes acelerarían la oxidación del AA y por lo tanto, un aumento en los niveles de DHA. En estas condiciones el astrocito captaría mayor cantidad de DHA para evitar el daño generado por éste manteniendo el balance redox del cerebro.

Una etapa fundamental en el reciclaje de la vitamina C es la capacidad del astrocito para generar AA a partir del DHA incorporado, para luego liberar el AA al espacio extracelular (Siushansian and Wilson, 1995; Siushansian et al., 1996; Siushansian et al., 1997). Se ha postulado que la reducción del DHA sería mediada por GSH (Dringen, 2000a; Daskalopoulos et al., 2002; Dringen and Hirrlinger, 2003; Kim et al., 2005; Kim et al., 2008). Sin embargo, esta afirmación es controversial ya que algunos autores cuestionan el papel del GSH (Kim et al., 2005; Kim et al., 2008). Por ende la reducción del DHA y liberación de AA por parte de los astrocitos sería clave para mantener el balance redox en neuronas.

Considerando los datos que describen la relación entre la vitamina C y el metabolismo energético celular, se postula que el reciclaje de la vitamina C de forma directa o indirecta es capaz de modular el metabolismo energético de neuronas y astrocitos. La regulación del reciclaje de la vitamina C por glutamato, el efecto del protocolo de cultivo de astrocitos y el efecto de la vitamina C sobre el metabolismo energético de astrocitos y neuronas fue abordado en la presente tesis doctoral.

III.- HIPÓTESIS

La vitamina C es el antioxidante más importante del cerebro, función que es fundamental debido a que este órgano es muy sensible al daño generado por agentes oxidantes. Por esta razón es importante que el cerebro regule estrictamente los niveles de vitamina C por medio del reciclamiento de esta molécula, generado por la interacción de astrocitos y neuronas. El reciclaje de la vitamina C podría afectar el metabolismo energético de estas células, debido al efecto intracelular de AA y DHA. Glutamato también estaría involucrado en la regulación de este proceso, sobre todo en la salida de vitamina C del astrocito.

En base a lo anteriormente planteado, nuestra hipótesis postula que:

“El reciclamiento de vitamina C en el sistema nervioso central cambia el metabolismo energético de astrocitos y neuronas, efecto que es modulado por glutamato”.

1. Objetivo general

Definir el efecto de DHA y glutamato en el metabolismo y reciclamiento de vitamina C en astrocitos y neuronas

2. Objetivos específicos

1.- Evaluar en astrocitos la expresión de transportadores de glucosa y la captación de glucosa/DHA y su modulación por glutamato en astrocitos.

2.- Analizar el efecto de vitamina C y glutamato en el metabolismo de astrocitos.

3.- Analizar el efecto de DHA y glutamato en el metabolismo neuronal.



IV.- MATERIALES Y MÉTODOS

1.- Animales de experimentación.

En esta tesis se utilizaron ratas *Sprague-Dawley* embrionarias de 17 días de gestación y de 1 día postnatal. Los animales se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura 20-25°C, fotoperíodo 12/12 horas luz/oscuridad, recibieron acceso libre al agua y fueron alimentados diariamente. Todos los animales de experimentación se manejaron según las normas de bioética del *National Institutes of Health, Bethesda, MD* y por el manual de Bioseguridad (2008) de CONICYT.



2.- Cultivos celulares.

Los cultivos celulares fueron realizados en una incubadora a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad. Los procedimientos de obtención y expansión celular fueron realizados en un gabinete de seguridad biológica nivel II y las células fueron almacenadas por congelamiento con DMSO 5% v/v en nitrógeno líquido.

2.1.- Cultivos primarios de astrocitos corticales. Los cultivos primarios de astrocitos fueron preparados a partir de ratas de 1 día post natal, las cuales fueron sacrificadas por dislocación cervical para la obtención del cerebro. El cerebro extraído fue mantenido en tampón de disección (glucosa 2 mM, sacarosa 44 mM,

HEPES 10 mM, NaCl 135 mM, KCl 5 mM, Na₂HPO₄ 0,15 mM, KH₂PO₄ 0,2 mM, pH 7,4). Posteriormente, utilizando lupa estereoscópica se extrajeron las cortezas cerebrales y se eliminaron las meninges, todo el proceso es llevado a cabo a una temperatura de 4°C.

Las cortezas extraídas fueron cortadas en pequeños trozos y mantenidas en tampón de disección. Luego se sometieron a disgregación enzimática por 15 min a 37°C en presencia de tripsina 0,25% p/v (Gibco) y EDTA 0,20% p/v (Sigma) y posteriormente sometidos a disgregación mecánica en solución MEM suplementado con 10% v/v de SBF (Gibco), glutamina 2 mM, penicilina 100 U/mL, estreptomina 100 µg/mL, glucosa 2 mM y fungizona 2.5 µg/mL.

Posteriormente, se realizó el recuento y estimación de la viabilidad celular, por el método de exclusión con azul de tripán 0.2% p/v. Las células obtenidas fueron sembradas en placas de cultivo a una densidad aproximada de 2x10⁴ células/cm². Se realizó el primer cambio de MEM, suplementado con 10% v/v de SBF, glutamina 2 mM, penicilina 100 U/mL, estreptomina 100 µg/mL y fungizona 2.5 µg/mL, a las 4 h de realizada la disección para retirar los restos generados por el proceso de disección. Posteriormente, el medio de cultivo suplementado fue cambiado cada 48 h. Los astrocitos fueron mantenidos en cultivo por 7, 15 y 30 días, luego de los cuales se utilizaron para realizar los experimentos pertinentes.

2.2.- Cultivos primarios de neuronas corticales. Los cultivos primarios fueron obtenidos de embriones de ratas *Sprague-Dawley* de 17 días de gestación y mantenidos a 37°C y 5% de CO₂ en incubadora. La corteza cerebral fue micro diseccionada bajo lupa estereoscópica, previa eliminación de las meninges, este

proceso se llevó a cabo en tampón de disección mantenido a 4°C. Posteriormente, el tejido se sometió a disgregación enzimática por 15 min a 37°C en presencia de tripsina 0,25% p/v (Gibco) y EDTA 0,20% p/v (Sigma), y luego a disgregación mecánica en una solución de plantado MEM (Gibco) suplementada con 10% de SBF (Gibco), glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 µg/ml y fungizona 2,5 µg/ml (Gibco). El tejido disgregado se resuspendió en la solución de plantado. El recuento y la estimación de la viabilidad celular fueron realizados por el método de exclusión con azul de tripán 0,2% p/v. Las células obtenidas se sembraron en placas de cultivo de 12 y 24 pocillos (Corning Costar), cubiertos previamente con poli-L-lisina 0,2 mg/ml (SIGMA), a una densidad aproximada de 2×10^5 células/cm² por 30 min, al cabo de los cuales se reemplazó el medio de cultivo por medio Neurobasal (Gibco) suplementado con B27 (Gibco), glutamina 2 mM, penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100 mg/mL y fungizona 2,5 mg/mL. Las células fueron mantenidas en cultivo por 5 días, al cabo de los cuales se utilizaron para los experimentos pertinentes.

2.3.- Cultivo de células C6. Las células de la línea celular C6 son derivadas de un glioma de rata (ATCC: CCL-107). Las células fueron mantenidas en cultivo utilizando medio D-MEM (Gibco) suplementado con 5% v/v de SBF (Gibco), penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 µg/ml, glutamina 2 mM y fungizona 2,5 µg/ml (Gibco). Las células fueron mantenidas en placas Petri de 10 cm de diámetro (Falcon) con 10 mL de medio de cultivo y con cambios de medio cada 2 días. Cuando las células en cultivo alcanzaron un 85% de confluencia, fueron expandidas en una proporción de 1:10. El recuento y la estimación de la viabilidad

celular fue realizada por el método de exclusión con azul de tripán 0,2% p/v Para los experimentos de transporte y metabólicos se sembraron a una densidad de 2×10^4 células/cm² y fueron mantenidas en cultivo por 24 h antes de realizar los experimentos pertinentes.

3.- Análisis inmunocitoquímico.

3.1.- Análisis inmunocitoquímico de células en cultivo. Para estos estudios los astrocitos fueron cultivados en placas de 12 pocillos a una concentración de 2×10^4 células/cm², el mismo protocolo se utilizó para las células C6, las neuronas fueron cultivadas en cubreobjetos de vidrio recubiertos con poli-L-lisina (Sigma).

Para comenzar el análisis todas las células fueron lavadas en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,8 (320 mOsm) y fueron fijadas durante 30 min en paraformaldehído al 4% (Merck) preparado en el mismo tampón. Posteriormente, se permeabilizaron las células con Tritón X-100 (Sigma) al 0.2% por 10 min, y se incubaron con el primer anticuerpo (Tabla 1) diluido en tampón Tris-fosfato 10 mM (pH 7,8) BSA 1%, en cámara húmeda durante toda la noche. Una vez transcurrido este tiempo, los preparados se lavaron tres veces por 10 min en tampón Tris-fosfato 10 mM (pH 7,8) con BSA al 1% y se incubaron con el segundo anticuerpo (Tabla 2) marcado con un fluoróforo durante 2 h, para realizar marcaje nuclear se utilizó TOPRO-3 (Invitrogen) 1 mM, el cual fue incubado junto con el segundo anticuerpo. Una vez realizado los lavados correspondientes se realizó el montaje con solución líquida de montaje (DAKO). Como control negativo se utilizó el mismo procedimiento pero en ausencia del primer anticuerpo.

Tabla 2: Anticuerpos primarios utilizados

Anticuerpo	Especie	Dilución
Anti-Cx43	Conejo	1/300
Anti-GFAP	Conejo	1/200
Anti-GLUT1	Conejo	1/100
Anti-GLUT3	Conejo	1/50
Anti-MAP2	Ratón	1/50
Anti-Nestina	Ratón	1/100
Anti-SVCT2	Cabra	1/50
Anti-Tubulina_{βIII}	Ratón	1/1000
Anti-Vimentina	Ratón	1/1000

Tabla 3: Anticuerpos secundarios utilizados

Anticuerpo	Especie	Dilución	Origen
Anti-IgG cabra-Cy2	Burro	1/200	Jackson Immunoresearch
Anti-IgG cabra-Cy3	Burro	1/200	Jackson Immunoresearch
Anti-IgG cabra-HRP	Conejo	1/200	Jackson Immunoresearch
Anti-IgG conejo-Cy2	Burro	1/200	Jackson Immunoresearch
Anti-IgG conejo-Cy3	Burro	1/200	Jackson Immunoresearch
Anti-IgG conejo-HRP	Cabra	1/200	Jackson Immunoresearch
Anti-IgG ratón-Cy2	Burro	1/200	Jackson Immunoresearch
Anti-IgG ratón-Cy3	Burro	1/200	Jackson Immunoresearch
Anti-IgG ratón-HRP	Cabra	1/200	Jackson Immunoresearch

3.2.- Microscopía confocal. Las imágenes (1024 x 1024 x 8 bits) fueron obtenidas en un microscopio Eclipse TE2000-U-C138 (Nikon), equipado con un sistema confocal compuesto por láseres de argón (488 nm) y de helio-neón (543 y 633nm).

3.3.- Cuantificación de la intensidad de fluorescencia en muestras inmunocitoquímicas. La cuantificación de la inmunofluorescencia de los marcadores utilizados se realizó en fotografías tomadas al alzar de experimentos inmunofluorescencia en células tratadas con los anticuerpos respectivos y teñidas con la tinción de contraste nuclear TOPRO-3 (Invitrogen). En cada muestra, se tomaron 10 campos en los cuales se cuantificó la señal de reacción positiva y se calculó la expresión relativa del marcador en los diferentes periodos de cultivo. Los resultados corresponden al promedio \pm desviación estándar de 3 experimentos independientes. Los datos fueron analizados estadísticamente utilizando el programa Graph Pad Prism 4.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

4.- RT-PCR convencional.

4.1.- Extracción de ARN total. Se extrajo ARN total desde los cultivos primarios de astrocitos y neuronas. El ARN fue extraído homogenizando las muestras en 500 μ L de Trizol[®] e incubándolas por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras fueron tratadas con 100 μ L de cloroformo, agitadas por 15 segundos e incubadas a temperatura ambiente por 3 min. Luego las muestras fueron

centrifugadas a 12,000 xg por 15 min a 4°C, para separar las fases. Una vez recuperada la fase acuosa, se agregaron 250 µL de isopropanol a cada muestra, las que fueron incubadas por 10 min a temperatura ambiente y luego centrifugadas a 12.000 xg por 10 min a 4°C. El sobrenadante fue eliminado y el pellet fue lavado con 500 µL de etanol 70% v/v y centrifugado a 7,500 xg por 5 min a 4°C. El sobrenadante fue eliminado y el pellet fue resuspendido en 20 µL de agua libre de ARNsa. El ARN total fue cuantificado midiendo su absorbancia a 260 nm y su pureza se midió por la relación 260/280 nm.

4.2.- Transcripción reversa del ARN total (RT). La síntesis de cADN fue realizada utilizando el RevertAid[®] H Minus First Strand cADN Synthesis Kit (Fermentas). Para un volumen final de 20 µl, se incubaron 2 µg del ARN total de las muestras con 0,5 µg de OligodT, denaturado a 70°C por 5 min y llevado a hielo por 2 min. Posteriormente, se agregó el tampón de transcripción (Tris-HCl 50 mM, pH 8,3, KCl 50 mM, MgCl₂ 4 mM, DTT 10 mM), la mezcla de dNTPs (1 mM de cada uno) y 20 U del inhibidor de ARNsa, esta mezcla fue incubada por 5 min a 37°C. Finalmente, se agregaron 200 U de la enzima transcriptasa reversa RevertAid[®] H Minus M-MuLV y se incubó por 1 h a 42°C. Al finalizar la reacción la muestra fue calentada a 70°C por 10 min. Los controles negativos para la amplificación de las muestras fueron tratados con el mismo protocolo de transcripción, pero sin la enzima transcriptasa reversa.

4.3.- Amplificación del cADN por PCR. La reacción de amplificación del cADN obtenido se realizó en un termociclador Mastercycler (Eppendorf) en presencia de los distintos partidores específicos (Tabla 3). La mezcla de reacción contenía Tris-HCl

10mM (pH 8,8), KCl 50 mM, Nonidet P40 0,8% v/v, MgCl₂ 1,5 mM, mezcla de dNTPs (0,2 mM de cada uno), partidores específicos (0,2 μM de cada uno), Taq ADN polimerasa 0,31 U (Fermentas) y 1 μL del producto de transcripción reversa, en un volumen final de 12,5 μL. La mezcla fue incubada inicialmente a 95°C por 5 min, luego se realizaron 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 52-60°C (dependiendo de los partidores usados) por 30 segundos y 72°C por 30 a 40 segundos, por último se realizó una extensión final de 72°C por 7 min. Todos los cADNs utilizados fueron testeados con partidores específicos para β-actina. Los partidores utilizados para amplificar los distintos genes fueron diseñados utilizando el programa Oligo Primer[®], teniendo en cuenta su T_m, el porcentaje de GC y la formación de dímeros y loops (Tabla 3). Además, en algunos casos cada partidor se encuentra en un exón distinto por lo que a lo menos se flanquea un intrón, siendo esto un control para la amplificación de ADN genómico contaminante.

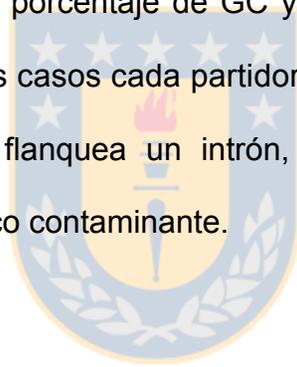


Tabla 4: Partidores utilizados para RT-PCR convencional y qRT-PCR.

Nombre	Partidor 5` (5`→3)	Partidor 3` (5`→3)	Producto (pb)
Ciclofilina	TGGAGATGAATCTGTAGGAGGAG	TACCACATCCATGCCCTCTAGAA	382
GFAP	CTCAATGCTGGCTTCAAGGAGA	GACGCAGCGTCTGTGAGGTC	350
GLUT1	CATGTATGTGGGGGAGGTGT	GACGAACAGCGACACCACAG	559
GLUT3	GGGCATGATTGGCTCTTTTT	GGGCTGCGCTCTGTAGGATA	386
β-Actina	GCTCGTCGTCGACAACGGCTC	CAAACATGATCTGGGTCATCTTCTC	353

4.4.- Electroforesis en geles de agarosa. Para la identificación de los productos de PCR se prepararon geles de agarosa 1,2% p/v en tampón TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM) y bromuro de etidio 0,2 µg/mL. Se utilizó tampón de carga 6X que contenía glicerol 30% v/v, azul de bromofenol 0,5% p/v en tampón TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM). Como estándar de peso molecular se sembraron 0,5 µg de un estándar de 100 pares de bases. Los geles fueron sometidos a un campo eléctrico de 100 V por 30 min en tampón TAE en una cámara de electroforesis. Los fragmentos de ADN en el gel fueron visualizados por el bromuro de etidio, en un transiluminador de luz ultravioleta. Las imágenes de los geles se obtuvieron en el equipo Molecular Imagen FX (Bio-Rad).



5.- RT-PCR cuantitativo en tiempo real (qRT-PCR). Este ensayo fue realizado en muestras obtenidas desde cultivos primarios de astrocitos y neuronas. Para ello, la extracción del ARN total y la transcripción reversa fueron realizadas de la misma forma que para el RT-PCR convencional. La cuantificación del ARNm de GLUT1 y GLUT3 fue realizada en forma relativa al gen de referencia ciclofilina. Para la cuantificación se adaptaron los protocolos utilizados para los partidores de RT-PCR convencional (Tabla 3) y se aplicó el kit “Brilliant® SYBR® Green QPCR master mix” (Stratagene, Cedar Creek, Texas) que utiliza SYBR green para la detección de amplicones. Se utilizó el termociclador MX3005P (Stratagene). Las muestras de ARN fueron obtenidas por triplicado y las síntesis de cADN se realizaron a partir de 1 µg de ARN. Se realizaron curvas de calibración, con diluciones seriadas, de una de las muestras para determinar la eficiencia de cada una de las reacciones. La

cuantificación se realizó comparando el número de ciclos requeridos para amplificar cada gen sobre el ciclo umbral (Ct) en relación al número de ciclos requeridos para amplificar un gen de referencia sobre su umbral. Como gen endógeno se comparó la expresión de ciclofilina para asegurar que no hay variaciones del gen de referencia. Los resultados fueron expresados aplicando el método $\Delta\Delta C_t$ en los cuales la cantidad de ARN fue expresado como veces sobre los astrocitos mantenidos en cultivo por 7 DIV.

6.- Ensayos de inmunodetección de proteínas

6.1.- Obtención de extractos de proteínas totales. Las células en cultivo, astrocitos y neuronas, fueron extraídas y homogenizadas con 3 volúmenes de solución de homogenización (sacarosa 0,3 M, DTT 3 mM, aprotinina 2 $\mu\text{g/ml}$, pepstatina A 1 $\mu\text{g/ml}$, leupeptina 2 $\mu\text{g/ml}$, EDTA 1 mM y PMSF 100 $\mu\text{g/ml}$). Luego las células homogenizadas fueron sonicadas a 4°C y posteriormente centrifugadas por 10 min a 8.000 g a 4°C y el sobrenadante resultante se conservó a -80°C. La concentración de proteínas fue cuantificada por el método de Bradford (Bio-Rad) midiendo su absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro.

6.2.- Electroforesis en gel de poliacrilamida y electrotransferencia. Para resolver las proteínas de interés, se utilizaron geles en gradiente de 5 a 15% v/v de acrilamida/bisacrilamida. El gel separador fue preparado utilizando dos mezclas, una que contenía acrilamida-bisacrilamida 5% p/v y otra 15% p/v, además de SDS 0,4% p/v, TEMED 0,1% v/v y persulfato de amonio 0,02% p/v, preparados ambos en

tampón Tris-HCl 750 mM (pH 8,8). El gel espaciador fue preparado utilizando una mezcla acrilamida/bisacrilamida 5% p/v, SDS 0,5% p/v, TEMED 0,1% v/v y persulfato de amonio 0,02% p/v, preparado en tampón Tris-HCl 60 mM (pH 6,8). Como tampón de corrida se utilizó un tampón Tris-glicina (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1% p/v, pH 6,8). Se sembraron 80 a 100µg de extractos de proteínas diluidas en tampón de carga 5X (Tris-HCl 250 mM, pH 6,8, SDS 4% p/v, glicerol 20% v/v, β-mercaptoetanol 1,25 M, azul de bromofenol 0,04% p/v). Se aplicó un voltaje de 100 V al gel montado en la cámara de electroforesis por 6 h aproximadamente. Las proteínas del gel resultante fueron transferidas a membranas de fluoruro de polivinilideno Immobilon-P®. Para esto, el gel fue puesto en contacto con la membrana en una cámara de electrotransferencia en presencia de tampón Tris-HCl 25 mM (pH 8,8), glicina 192 mM y metanol 20% v/v. La electrotransferencia fue realizada a 80 mA durante 14-16 h a temperatura ambiente.

6.3.- Inmunodetección de las proteínas. Una vez realizada la transferencia se tiñó la membrana con una solución de rojo Ponceau-S 0,2% p/v para confirmar la correcta transferencia de las proteínas a la membrana. Posteriormente, la membrana fue bloqueada con leche descremada 5% p/v en tampón TBS (NaCl 150 mM, Tris 10 mM, pH 7,4) y Tween-20 0,05% v/v (TBS-TL) durante 1 h. Luego, las membranas fueron incubadas con el primer anticuerpo (Tabla 1), diluido en TBS-TL por 12 h o en tampón TBS (NaCl 150 mM, Tris 10 mM, pH 7,4)-Tween 20 0,5%-BSA 3%-Azida 0,1-0,05% (TBS-TBA), con agitación suave a temperatura ambiente. Posteriormente, la membrana fue lavada con TBS-T y bloqueada con TBS-TL. Luego, la membrana fue incubada por 2 h con un segundo anticuerpo anti-IgG conjugado con peroxidasa

diluido en TBS-TL (Tabla 2). Una vez finalizada la incubación, la membrana fue lavada con TBS-T y luego revelada con un sistema de detección quimioluminiscente (SuperSignal[®] West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce ó Western Lightning Plus-ECL, PerkinElmer), incubando la membrana durante 1 ó 5 minutos en el reactivo respectivo. La emisión de luz por parte de la peroxidasa acoplada a los anticuerpos secundarios fue captada por exposición de la membrana a una película fotográfica. La película fotográfica fue expuesta a la membrana por aproximadamente 1 a 5 min y luego revelada. En la mayoría de los experimentos las membranas fueron reincubadas con anticuerpos para otras proteínas, previo al tratamiento con una solución comercial para reblotear membranas (Re-Blot Plus Mild Antibody Stripping Solution, Chemicon). Esta incubación se realizó por 45 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas fueron lavadas con TBS-T, bloqueadas con TBS-TL por 30 min e incubadas con el primer anticuerpo, tal como se describió anteriormente.

7.- Ensayos de transporte.

Los ensayos de transporte fueron realizados en cultivos de astrocitos mantenidos en cultivo por 15 y 30 DIV y en cultivos de neuronas corticales mantenidas por 5 DIV. Además, se realizaron ensayos de transporte en las células C6 en estado de confluencia.

Para caracterizar el transporte de AA se utilizó ácido-L- [¹⁴C]-ascórbico (actividad específica 4-8 mCi/mmol, NEN-DuPont). El AA se preparó momentos antes de usar, para evitar su oxidación, este se disolvió en 1,4-ditiotreitol (DTT) 0,1 mM y

se mantuvo a 4°C. En los estudios de transporte del DHA, el AA marcado radiactivamente se incubó con la enzima ascorbato oxidasa 1 U/ μ mol (Sigma) durante 15 min a temperatura ambiente. La conversión de AA a DHA fue confirmada por HPLC de intercambio iónico.

Para analizar el transporte de glucosa se utilizó el análogo no metabolizable [3 H]-2-deoxi-glucosa (2-DOG, actividad específica 8Ci/mmol, PerkinElmer). Para analizar el transporte de lactato se utilizó [14 C]-Lactato (actividad específica 150mCi/mmol, American Radiolabeled Chemicals). En los estudios de velocidad glicolítica se utilizó [3 H]-Glucosa, actividad específica 20 Ci/mol, PerkinElmer). Para determinar la actividad de la vía de las pentosas se realizaron estudios de transporte utilizando [14 C] glucosa y [3 H]-glucosa (actividad específica 8 Ci/mol, PerkinElmer).

Los ensayos fueron hechos por triplicado y los resultados representan el promedio de al menos tres experimentos. Los datos fueron analizados utilizando el programa Prism 4.0b y el análisis estadístico se realizó utilizando el programa GraphPad InStat 3.06.

7.1.- Ensayos de captación en el tiempo. Para este tipo de ensayos las células fueron cultivadas tal como se describió anteriormente. Los ensayos se realizaron en presencia diferentes concentraciones del sustrato radioactivo (AA, DHA, lactato o 2-DOG). Las células fueron lavadas con 500 μ l/pocillo de tampón de transporte (HEPES 15 mM pH 7,4, NaCl 135 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 1,8 mM, MgCl₂ 0,8 mM,) y luego incubadas por 10 min a 37°C en este mismo tampón. Posteriormente, las células fueron incubadas a diferentes tiempos en tampón de transporte junto con el

sustrato marcado. Una vez finalizado el tiempo de incubación, el proceso de transporte se detuvo con 1 ml de tampón de transporte conteniendo HgCl_2 0,2 mM a 4°C. Luego, las células fueron lisadas con 500 μl de tampón de lisis (Tris-HCl 10 mM, SDS 0,2% p/v, pH 8,0) y el lisado fue mezclado con 4 ml de líquido de centelleo. La medición de la radioactividad se realizó en un contador de centelleo líquido LS 6500 (Beckman Coulter). En cada ensayo de captación se realizó un recuento celular por triplicado, utilizando el método de exclusión de azul de tripán 0,2% p/v.

7.2.- Determinación de los parámetros cinéticos. Se determinaron los valores de K_m para la captación de 2-DOG en astrocitos de 15 y 30 DIV, para lo cual las células fueron incubadas 15 segundos en 500 μl de tampón de transporte que contenía concentraciones crecientes de 2-DOG (0-14mM). Posteriormente, se detuvo la captación y la recolección de las células fueron realizadas tal como se describieron previamente

7.3.- Estudios de inhibición. Los astrocitos y neuronas en cultivo fueron incubadas en tampón de transporte conteniendo diferentes moléculas (Tabla 5) con el fin de analizar el efecto de estas moléculas sobre la captación de AA, DHA, lactato o 2-DOG, cada agente farmacológico fue pre-incubado por diferentes tiempos a 22 °C. Luego del periodo de pre-incubación se continuó con los experimentos de captación como se describió previamente.

Tabla 5: Agentes farmacológicos utilizados en los estudios de captación de AA, DHA, 2-DOG y lactato.

Agente Farmacológico	Concentración	Tiempo de Pre-incubación
Ácido deshidroascórbico (DHA)	0,2-1mM	10-90 minutos
Ascorbato (AA)	0,2-1mM	10-90 minutos
Citocalasina B	0,001-0,1mM	10 minutos
Citocalasina E	0,001-0,05mM	10 minutos
Glucosa	0,01-5mM	1-10 minutos
Glutamato	0,05-5mM	10 minutos
α -cinohidroxicinamato (4-CIN)	5mM	20 minutos

7.4.- Experimentos de liberación de vitamina C. En estos estudios los cultivos de astrocitos de 15 y 30 DIV y neuronas de 5 DIV fueron sometidos a captación de DHA 500 μ M por diferentes tiempos a 22°C, según la metodología de captación descrita previamente. Posteriormente, las células fueron lavadas con tampón de transporte, sin marca radioactiva, y mantenidas por diferentes tiempo en este tampón. Para poder describir los mecanismos de liberación de la vitamina C esta incubación fue llevada a cabo en presencia de diferentes agentes farmacológicos (Tabla 6). Trascurridos los diferentes tiempos (10-30min) se recolectó en primer lugar el sobrenadante, que contiene la vitamina C liberada, y luego se recolecto el lisado celular utilizando la metodología descrita previamente, ambas fracciones se

mezclaron separadamente con 4 mL de líquido de centelleo, de manera de cuantificar la marca radiactiva liberada al medio y la marca que permanece al interior de la célula.

Los resultados se expresan como porcentaje de radioactividad en el medio con respecto a la radioactividad total (radioactividad en medio + radioactividad en células).

Tabla 6: Agentes farmacológicos utilizados en los estudios de liberación de vitamina C.

Agente Farmacológico	Concentración	Tiempo de Eflujo
4,4-diisotiociano-2,2-ácido estilbenodisulfónico (DIDS)	1mM	30 minutos
Citocalasina B (Cit B)	0,02mM	30 minutos
Glutamato (Glu)	0,05-5mM	30 minutos
Lantano (La ⁺³)	0,2mM	30 minutos
Octanol	3mM	30 minutos
Peróxido de Hidrógeno (H ₂ O ₂)	0,05-0,5mM	30 minutos

8.- Ensayos metabólicos de utilización de glucosa

Para determinar mediante que vía metabólica es oxidada la glucosa en astrocitos y neuronas, se utilizaron dos técnicas que mediante el uso de glucosa marcada radiactivamente, en carbonos específicos, nos permitieron cuantificar la actividad glicolítica y la actividad de la vía de las pentosas fosfato (PPP) en astrocitos

y neuronas. La ventaja de esta aproximación es que al ocupar glucosa esta molécula sigue la ruta metabólica completa por ende entrega un resultado más representativo y directa del metabolismo celular.

8.1.- Determinación del flujo glucolítico. El flujo glucolítico en astrocitos y neuronas se determinó por la producción de $^3\text{H}_2\text{O}$ a partir de $[3\text{-}^3\text{H}]$ -glucosa. Para estos experimentos se utilizaron cultivos de astrocitos de 15 y 30 DIV y neuronas de 5 DIV. Para realizar estos experimentos las células fueron previamente incubadas con diferentes concentraciones de AA, DHA y glutamato, posterior a la incubación las células fueron resuspendidas con Tripsina/EDTA para ser luego incubadas en tubos eppendorf sellados (tubo de reacción) que contenían el tampón Krebs-Henseleit (Na_2HPO_4 11 mM, NaCl 122 mM, KCl 3,1 mM, K_2HPO_4 0,4 mM, MgSO_4 1,2 mM y CaCl_2 1,3 mM a pH 7.4) suplementado con D-glucosa 5 mM (concentración final) y con 5 μCi de $[3\text{-}^3\text{H}]$ -glucosa (Perkin Elmer) en una atmósfera saturada de oxígeno, para permitir el metabolismo oxidativo. La incubación se realizó a 37 °C durante 90 minutos en agitación, tras los cuales las reacciones se detuvieron con HClO_4 al 3 % v/v. Para la cuantificación del $^3\text{H}_2\text{O}$, los tubos de reacción se depositaron dentro de viales de centelleo que contenían 1 mL de agua ultra pura, estos viales fueron equilibrados durante 24 horas en agitación y a 37°C, luego el agua ultra pura conteniendo las moléculas de $^3\text{H}_2\text{O}$ generadas en el proceso glucolítico se mezcló con 4 mL de líquido de centelleo para cuantificar la radioactividad.

Como blanco se realizó el mismo procedimiento pero sin añadir la suspensión celular al tubo de reacción.

8.2.- Determinación de la actividad de la vía de las pentosas fosfato (PPP). La proporción de glucosa oxidada a través de la vía PPP fue medida esencialmente como describe (Hothersall et al., 1982), el método se basa en determinar la diferencia en la producción de $^{14}\text{CO}_2$ desde la $[6\text{-}^{14}\text{C}]$ glucosa (descarboxilada por la enzima 6-fosfogluconato deshidrogenasa y en el ciclo de Krebs) y la $[1\text{-}^{14}\text{C}]$ glucosa (solo descarboxilada en el ciclo de Krebs). En estos experimentos se analizó el efecto de AA, DHA y glutamato sobre la actividad de la vía PPP en astrocitos y neuronas mantenidos en cultivo, para lo cual las células fueron tratados previamente con diferentes concentraciones de AA, DHA y glutamato, transcurridos los diferentes tiempos de incubación se eliminó el medio y las células fueron lavadas con PBS y recolectadas por tratamiento con Tripsina /EDTA y posterior centrifugación a 1200 rpm por 5 minutos. Luego las células fueron resuspendidas en tampón Krebs-Henseleit saturado con oxígeno. De cada tratamiento se tomaron 500 μL de la suspensión celular los cuales fueron añadidas a tubos Erlenmeyer conteniendo 2 mCi of D- $[1\text{-}^{14}\text{C}]$ glucosa o 2 mCi of D- $[6\text{-}^{14}\text{C}]$ glucosa y 5.5 mM D-glucosa (concentración final). El Erlenmeyer fue provisto con un pocillo central el cual contiene 500 μl de hidróxido de bencetonio (solución capaz de retener el $^{14}\text{CO}_2$ generado). El Erlenmeyer fue saturado con oxígeno por 20 segundos, sellado e incubado por 30 minutos a 37°C en agitación. La incubación se detuvo con inyección de 0.2 ml of 1.75 M HClO_4 , aunque la agitación continuó por otros 30 minutos para facilitar la captura del $^{14}\text{CO}_2$. El recipiente central con el hidróxido de bencetonio fue mezclado en tubos de centelleo con 4 ml de líquido de centelleo para determinar la radioactividad generada.

Como blanco se realizó el mismo procedimiento pero sin agregar la suspensión celular al Erlenmeyer de reacción.

8.3.- Cuantificación de la actividad de las enzimas *hexoquinasa* y *Glucosa -6-fosfato deshidrogenasa*. Para cuantificar la actividad enzimática, las células fueron tratadas previamente con AA o DHA 1 mM en presencia o ausencia de glucosa, por 45 min a 37°C. Luego las células fueron lavadas con PBS, tratadas con T/E y centrifugadas a 500g por 5 min a 4°C. Luego las células fueron resuspendida 1:3 en medio de aislamiento (sacarosa 250 mM, HEPES 20 mM, KCl 10 mM, MgCl 1.5 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, aprotinina 2 µg/ml, pepstatina A 1 µg/ml, leupeptina 2 µg/ml) y fueron sonicadas a 4°C y posteriormente centrifugadas por 5 min a 1500 g a 4°C. Posteriormente se descarto el pellet y el sobrenadante fue centrifugado a 13000 g por 30 min a 4°C, por último el sobrenadante es utilizado para cuantificar las reacciones enzimáticas.

Para cuantificar la actividad hexoquinasa, la fracción purificada fue mezclada con el medio de reacción (Tris-HCl 25 mM, DTT 1 mM, NADP/Na⁺ 0.5 mM, MgCl₂ 2 mM, ATP 1 mM, G6PDH 2 U/ml, glucosa 10 mM) y la mezcla se incubó por diferentes tiempos a 37 °C, la reacción fue detenida añadiendo TCA 10% para luego medir la generación de NADPH a 340 nm.

Para cuantificar la actividad G6PDH se realizó el protocolo descrito previamente reemplazando glucosa por glucosa-6- fosfato 10 mM y omitiendo G6PDH del medio de reacción.

9.- Cuantificación de los niveles de GSH

9.1.- Determinación de los niveles de glutatión en astrocitos y neuronas. Se analizó el efecto de AA, DHA y glutamato en los niveles de GSH, para lo cual las células fueron pre-incubadas con estas moléculas a una concentración de 1mM por diferentes tiempos, luego las células fueron lavadas con PBS e inmediatamente despegadas de las placas de cultivo utilizando ácido sulfosalísílico 1% v/v (Sigma). El lisado celular fue centrifugado a 13.000g por 5 minutos a 4°C. El sobrenadante fue utilizado para determinar los niveles de GSH total (GSH + 2xGSSG). La cuantificación se realizó en placas de 96 pocillos (Cornig) las cuales contienen el tampón de reacción (Tampón fosfato 0,1 M, EDTA 0,2 M, ácido 6,6'-Ditionitro-3,3'-benzoico 0,3 mM, β -Nicotinamida adenina dinucleótido 2'-fosfato 0,4 mM y la enzima GSH reductasa 1 U/mL). El sobrenadante se distribuye en los pocillos y se determinó la absorbancia a 405 nm durante 2,5 minutos realizando lecturas cada 15 segundos.

Para cuantificar el GSSG se mezcló volúmenes iguales del sobrenadante celular y 2-vinilpiridina (Sigma) la mezcla se incubó por 1 h, luego se añadió 1 mL de tampón de reacción y se midió absorbancia a 405 nm durante 5 minutos, tomando lecturas cada 30 segundos.

10.- Determinación de apoptosis celular

10.1- Análisis de apoptosis por el método de tinción nuclear con DAPI. Para determinar el efecto de AA, DHA y glutamato en la viabilidad celular se utilizó la

técnica de tinción nuclear con 4-6-diamidino-2-phenylindola (DAPI), para lo cual las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de las moléculas de interés y por diferentes tiempos. Luego las células fueron lavadas con PBS y fijadas con PFA al 4%, posteriormente fueron incubadas con el marcador nuclear DAPI por 30 min a 22°C. Posteriormente, las células fueron lavadas con PBS y analizadas mediante microscopia fluorescente. Por condición se contabilizaron 200 núcleos en tres diferentes cultivos y los resultados fueron expresados en proporción a núcleos normales y núcleos que presentaban condensación de la cromatina.

11.- Cromatografía líquida de alta presión (HPLC)

11.1.- Identificación de la forma redox de vitamina C intracelular. Con el fin de identificar la forma redox de la vitamina C presente en el interior de neuronas y astrocitos, se estandarizó la separación de ambas formas redox de la vitamina C (AA y DHA), mediante HPLC. Para esto se inyectaron en el equipo de HPLC 20 μ L de estándares radioactivos de AA o DHA disueltos en una solución de metanol 60% v/v– EDTA 1mM, (pH 7,8), y se recolectaron fracciones cada 3 min, las cuales fueron mezcladas con líquido de centelleo y analizadas para determinar la cantidad de radioactividad presente. En base a la radioactividad presente en cada fracción se logró identificar a qué fracción eluye el AA y el DHA, con lo cual logramos separar ambas formas de la vitamina C

Para determinar la forma redox presente intracelularmente, los astrocitos y las neuronas fueron incubadas con AA o DHA 100 μ M radiactivo por diferentes tiempos a 37°C en presencia o ausencia de diferentes concentraciones de glutamato, luego

de lo cual fueron lisadas utilizando una solución de metanol 60% (v/v)–EDTA 1 mM, (pH 7,8). El lisado fue filtrado (filtros de 20 μ m) y se inyectaron 20 μ L de este al equipo de HPLC cuya separación se realizó utilizando una columna de intercambio aniónico Partisil 10 SAX (Whatman) y una pre columna de sílice.

La separación se realizó en un tiempo total de 39 min con las siguientes condiciones de elución: temperatura ambiente, flujo de 0,5 ml/min, tampón fase móvil KH_2PO_4 7 mM, KCl 7 mM (pH 4,0), se recolectaron fracciones cada 3 min. La detección del AA y DHA se realizó por detección de la marca radioactiva por método de centelleo, las fracciones recolectadas fueron luego graficadas en función del tiempo de elución.



V.- RESULTADOS

CAPITULO 1. Función de los transportadores de glucosa/DHA en astrocitos y su modulación por glutamato.

Para que el reciclaje de la vitamina C se lleve a cabo en el cerebro, los astrocitos deben incorporar el DHA desde el espacio extracelular a través de transportadores GLUTs. Diversos estudios han descrito que los astrocitos solo expresan el transportador GLUT1 en cultivo (Vannucci, 1994; Maher, 1995), sin embargo, este análisis ha sido realizado en astrocitos establecidos por más de 40 días en cultivo (Wilson y Dixon, 1989). Este protocolo afectaría la expresión y función de diferentes transportadores (Berger and Hediger, 2000; Astuya et al., 2005). Por ejemplo, se ha descrito que largos periodos de cultivo generan la activación de los astrocitos, estimulando una pseudo gliosis, lo cual generaría cambios en el patrón de expresión de proteínas relacionadas con el potencial proliferativo de los astrocitos (Robel et al., 2011).

Considerando estos antecedentes, en esta tesis utilizamos astrocitos mantenidos en cultivo por diferentes periodos, con el objetivo de determinar cómo el periodo de cultivo afecta el metabolismo de la vitamina C y el metabolismo energético de los astrocitos.

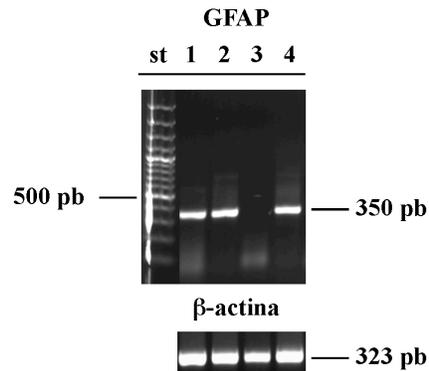
1.1- Caracterización de los cultivos primarios de astrocitos.

Mediante RT-PCR evaluamos la presencia del ARN mensajero de GFAP en cultivos primarios de astrocitos de 15 y 30 DIV (Figura 6 I, línea 1 y 2 respectivamente) y los comparamos con una muestra control, cerebro de rata adulta (Figura 6 I, línea 4), como control negativo del RT-PCR utilizamos reacciones en las cuales se omitió la transcriptasa reversa, no observando amplificación (Figura 6 I, línea 3). Con los partidores utilizados se amplificó una banda de 350 pb que corresponde al tamaño esperado para GFAP. La integridad del ARN y del ADNc fue evaluada mediante la amplificación del gen control β -actina, detectando una única banda de similar intensidad en las muestras evaluadas. Al realizar el estudio inmunocitoquímico (Figura 6 II) determinamos que los cultivos primarios de 15 y 30 DIV presentan una alta pureza no observando células positivas para el marcador neuronal tubulina β III (Figura 6 II, B y D) y observamos que la totalidad de las células expresa el marcador glial GFAP (Figura 6 II, A y C).

1.2- Efecto del periodo de cultivo de los astrocitos en la expresión del transportador GLUT1.

Por medio de RT-PCR observamos la expresión del transportador GLUT1 en todos los periodos de cultivo analizados (Figura 7, A), no observando cambios significativos en el nivel de expresión del mensajero. Sin embargo, con RT-PCR

A



B

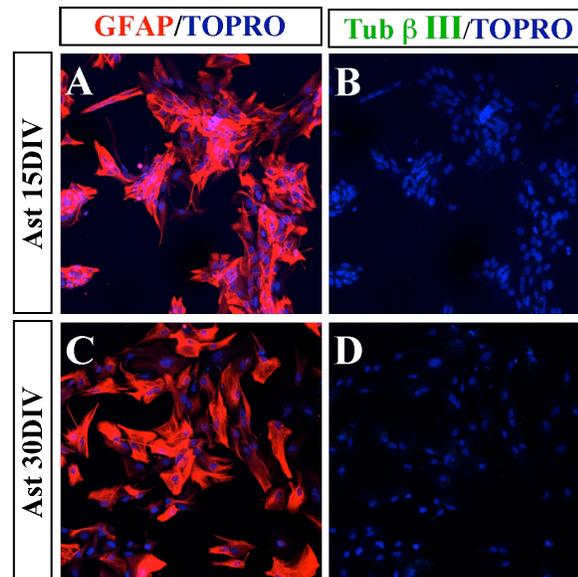


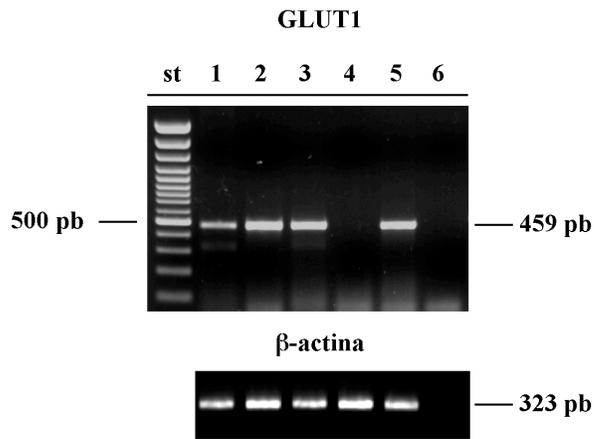
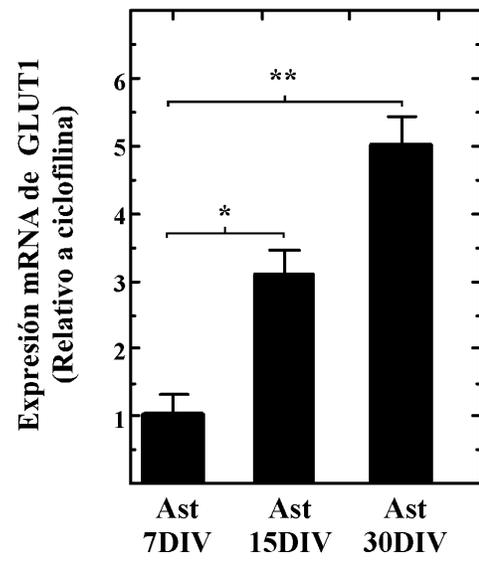
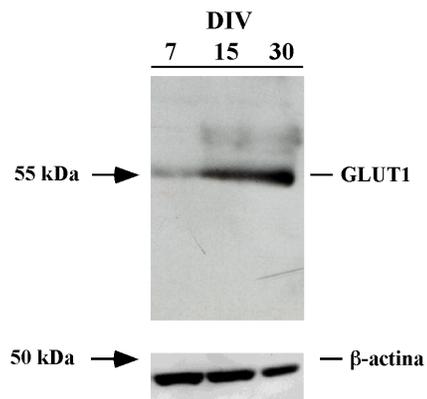
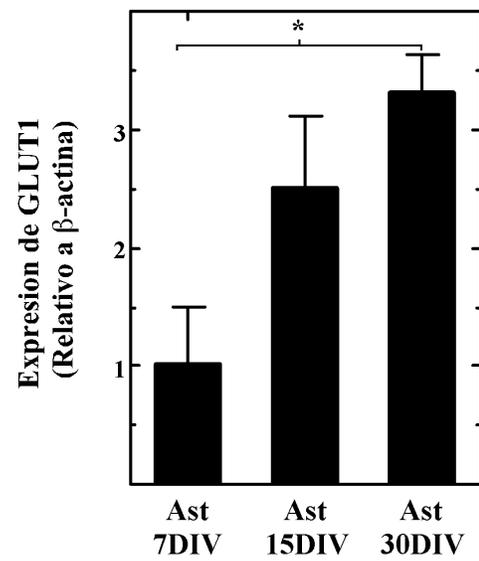
Figura 6: Caracterización de los cultivos primarios de astrocitos corticales.

A. Determinación del ARNm para el marcador glial GFAP en ADNc de astrocitos de 15 DIV (línea 1), astrocitos de 30 DIV (línea 2), control negativo, ausencia de transcriptasa reversa (línea 3) y cerebro de rata (línea 4). Se muestra además la amplificación para el gen de referencia β -actina. **B.** Caracterización inmunohistoquímica de los cultivos de astrocitos mantenidos por 15 y 30 DIV. En rojo se observa la inmunoreacción para GFAP (A y C) y en azul la tinción de contraste nuclear del marcador TOPRO (A-D). Aumento x400

Figura 7: Expresión del ARNm y niveles de proteína de GLUT1 en astrocitos *in vitro*.

Los astrocitos fueron extraídos desde el cerebro de ratas de 1 día postnatal y mantenidos en cultivo por 7, 15 y 30 DIV. **A.** Análisis de RT-PCR de GLUT1. Los productos de RT-PCR de GLUT1 se obtuvieron amplificando ADNc de astrocitos de 7, 15 y 30 DIV (líneas 1, 2 y 3, respectivamente), neuronas de 5 DIV (línea 4), cerebro total (línea 5) y el control negativo (línea 6). **B.** Estudios de RT-PCR cuantitativo de GLUT1 en astrocitos de 7, 15 y 30 DIV. **C.** *Western blot* para GLUT1 en extracto de proteínas de astrocitos de 7, 15 y 30 DIV. **D.** Cuantificación de la intensidad de banda obtenida en el ensayo de *Western blot* de la figura C. Los resultados corresponden al promedio \pm DS de tres experimentos realizados por triplicado. Los asteriscos indican qué valores son significativos, mediante análisis estadístico utilizando el Test de Bonferroni (*p, 0.05; **p, 0.01).



A**B****C****D**

cuantitativo observamos que el transportador GLUT1 incrementa su expresión 5 veces al comparar los astrocitos de 7 y 30 DIV (Figura 7, B).

El análisis de *Western blot* de astrocitos de 7, 15 y 30 DIV confirmó un aumento en la expresión de GLUT1 al incrementar el periodo de cultivo de las células (Figura 7, D).

Utilizando estudios inmunocitoquímicos observamos una débil expresión de GLUT1 en los astrocitos de 7 DIV, concentrada en la zona perinuclear (Figura 8, G flechas). En los astrocitos de 15 DIV se observó un débil aumento en la reacción que ahora se encuentra uniformemente distribuida en el cuerpo celular (Figura 8, D-F). En los astrocitos de 30 DIV se observó un aumento en la reacción positiva para GLUT1 (Figura 8, G-I). Al cuantificar la intensidad de señal determinamos que la expresión del transportador incrementa 2 y 3 veces, al analizar los astrocitos de 15 y 30 DIV en comparación a las células de 7 DIV (Figura 8, J).

En conjunto los resultados descritos anteriormente confirman que la expresión de GLUT1 varía durante el periodo de cultivo, incrementando prácticamente al triple después de 30 DIV.

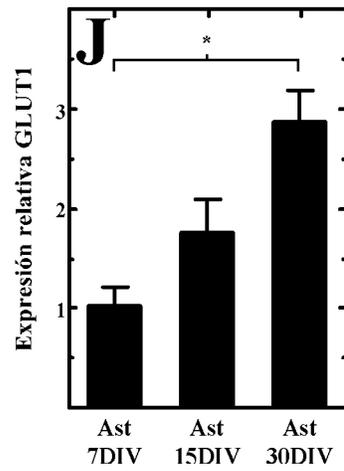
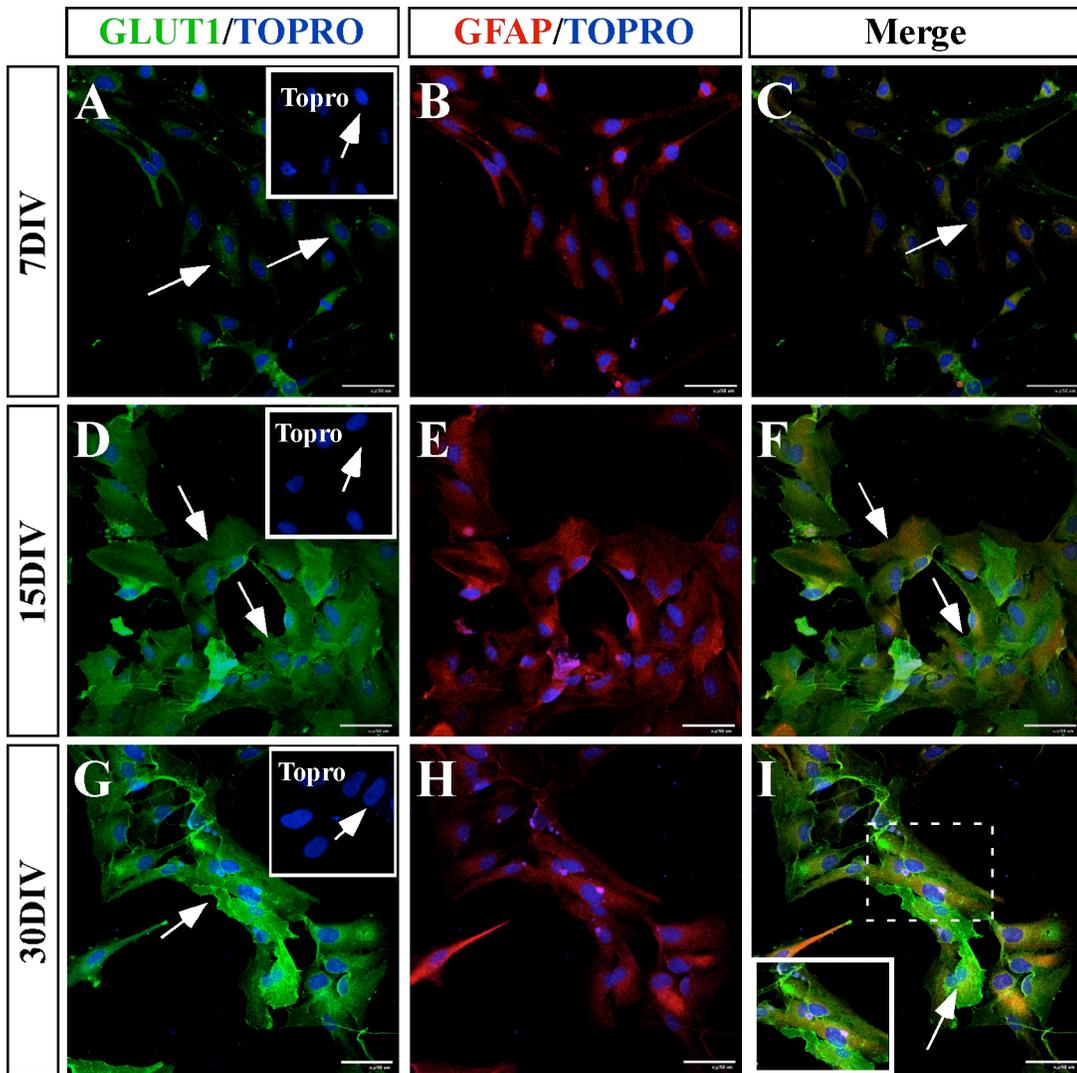
1.3- Captación de 2-DOG y DHA en astrocitos mantenidos por diferentes periodos en cultivo.

En este capítulo de la Tesis estudiamos la funcionalidad de GLUT1 y el efecto generado por el periodo de cultivo de los astrocitos. Se realizaron experimentos de

Figura 8: Expresión de GLUT1 en astrocitos mantenidos en cultivo por diferentes periodos.

Análisis de inmunofluorescencia y microscopía confocal. Se analizó la expresión de GLUT1 en astrocitos de 7, 15 y 30 DIV. En verde se observa la reacción para GLUT1, en rojo la reacción para GFAP y en azul la tinción de contraste nuclear con TOPRO. Se observó una débil inmunoreactividad para GLUT1 en astrocitos de 7 DIV (A-C), en astrocitos de 15 DIV (D-F) aumentó la señal para el transportador, sin embargo, la mayor intensidad de reacción fue encontrada en astrocitos de 30 DIV (G-I). Los insertos en las imágenes A, D y G representan el control negativo para el anticuerpo contra GLUT1. **J.** Cuantificación de la señal de inmunofluorescencia para GLUT1 en astrocitos de 7, 15 y 30 DIV. Los resultados corresponden al promedio \pm DS de tres experimentos realizados por triplicado. Los asteriscos indican qué valores son significativos, mediante análisis estadístico utilizando el Test de Bonferroni (*p, 0,01); Aumento x400.





transporte utilizando el análogo no metabolizable de la glucosa, 2-deoxiglucosa (2-DOG) y la forma oxidada de la vitamina C, DHA.

En los estudios de captación en el tiempo de 2-DOG 250 μM , se observó una velocidad inicial de incorporación, que fue mantenida de forma lineal hasta los 45 segundos de incubación, tanto en los astrocitos de 15 y 30 DIV (Figura 9, A). Se alcanzaron niveles de $6 \pm 0.9 \text{ nmoles} \times 10^6 \text{ células}$ en los astrocitos de 15 DIV y $7 \pm 0.5 \text{ nmoles} \times 10^6 \text{ células}$ en los astrocitos de 30 DIV. Para corroborar que el transporte se realiza a través de transportador GLUT1, analizamos el efecto de citocalasina B 20 μM . En presencia de citocalasina B, la captación de 2-DOG fue inhibida en un $88 \pm 5\%$ en los astrocitos de 15 DIV y en un $74 \pm 9\%$ en astrocitos de 30 DIV, como control de la acción de citocalasina B se utilizó citocalasina E 20 μM , análogo estructural que no ejerce efecto sobre la funcionalidad de los transportadores GLUTs. La presencia de citocalasina E, no generó cambios en el transporte de 2-DOG en los diferentes tipos de astrocitos (Figura 9, B y C).

Para estudiar el transporte de DHA determinamos la curva de tiempo a 22°C para la incorporación de DHA 100 μM en astrocitos de 15 y 30 DIV (Figura 9, E). Los astrocitos de 15 DIV son capaces de incorporar DHA en forma lineal hasta los 4 minutos, llegando a niveles de $2000\text{-}200 \text{ pmoles} \times 10^6 \text{ células}$ a los 8 minutos de captación. En los astrocitos de 30 DIV la captación fue lineal hasta los 4 minutos, llegando a niveles cercanos de $6000\text{-}230 \text{ pmoles} \times 10^6 \text{ células}$ a los 8 minutos.

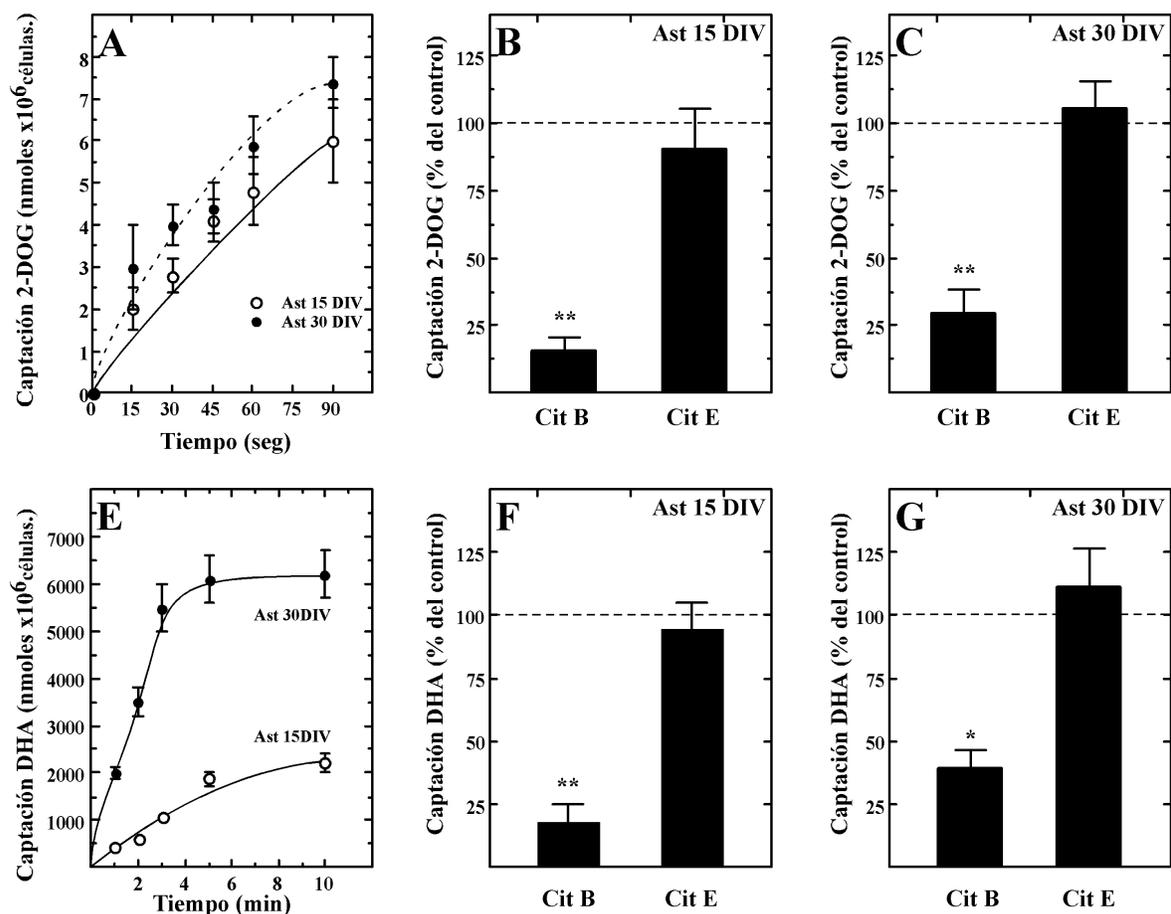


Figura 9. Curva de tiempo y análisis farmacológico de la incorporación de 2-DOG y DHA en astrocitos de 15 y 30DIV.

Los astrocitos mantenidos en cultivo por 15 DIV y 30 DIV fueron incubados con 2-DOG 250 μ M por diferentes tiempos (0-90 seg) a 22°C. **B-C.** Análisis farmacológico de citocalasina B (Cit B, 20 μ M) y citocalasina E (Cit E, 20 μ M) sobre la captación de 2-DOG en astrocitos de 15 DIV (B) y 30 DIV (C). **E.** Curva de tiempo de la captación de DHA 100 μ M a 22 °C en astrocitos en cultivo. **F-G.** Análisis farmacológico de citocalasina B (Cit B, 20 μ M) y citocalasina E (Cit E, 20 μ M) sobre la captación de DHA en astrocitos de 15 DIV (F) y 30 DIV (G). Los resultados corresponden al promedio \pm DS de tres experimentos realizados por triplicado. Los asteriscos indican qué valores son significativos, mediante análisis estadístico utilizando el Test de Bonferroni (*p, 0,01; **p, 0,005).

Este resultado muestra que los astrocitos de 30 DIV son capaces de incorporar 3 veces más DHA que los astrocitos de 15 DIV, resultado inesperado, al considerar que la captación de 2-DOG es similar en ambos tipos de astrocitos. Al analizar el efecto de citocalasina B sobre el transporte de DHA, determinamos que la presencia de citocalasina B inhibe en un 80.7% la captación de DHA en astrocitos de 15 DIV (Figura 9, F), mientras que en los astrocitos de 30 DIV la inhibición fue solo de un 55.7%, inhibición inesperada ya que citocalasina B es un poderoso inhibidor de los transportadores GLUTs (Figura 9, G).

La diferencia en la inhibición de citocalasina B se podría explicar por un cambio en la afinidad por el inhibidor en los astrocitos de 30 DIV. Para analizar este aspecto, determinamos los valores de IC_{50} en la captación de DHA 100 μ M en astrocitos de 15 y 30 DIV. Mediante este análisis se determinaron valores de IC_{50} de 0.8-0.2 μ M en astrocitos de 15 DIV (Figura 10, A) y de 1-0.3 μ M en astrocitos de 30 DIV (Figura 10, B), no observándose diferencias significativas.

Con el objetivo de describir de mejor manera el transporte de DHA y las posibles diferencias entre los modelos utilizados, analizamos el efecto de glucosa sobre la incorporación de DHA en astrocitos de 15 y 30 DIV. Para realizar estos experimentos se co-incubó glucosa con DHA, de manera de simular lo que ocurre *in vivo*. En los astrocitos de 15 DIV la presencia de glucosa no provocó un cambio significativo en el transporte de 100 μ M DHA.

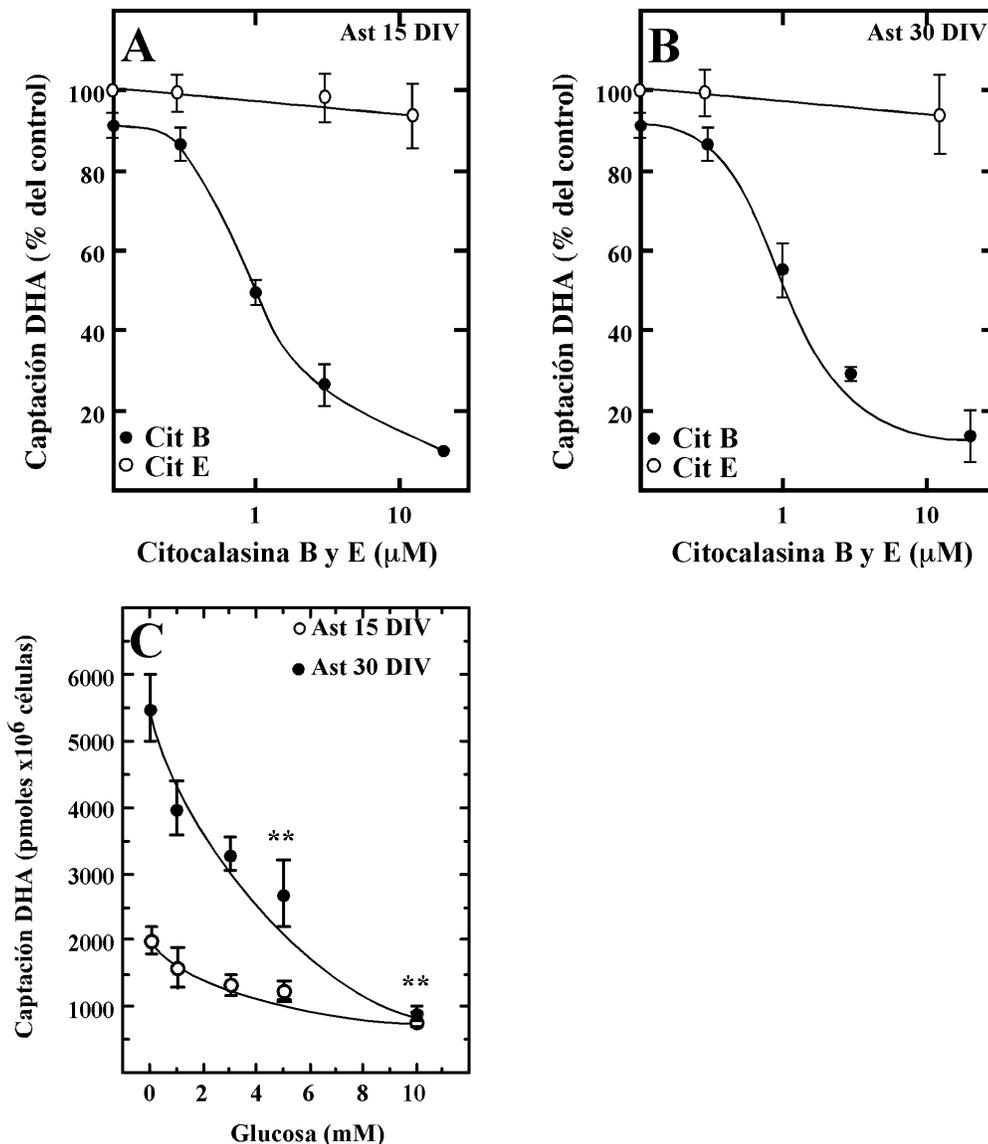


Figura 10: Análisis de inhibición del transporte de DHA por diferentes compuestos, en cultivos primarios de astrocitos.

A-B. Determinación valor de IC_{50} para citocalasina B en astrocitos de 15 (A) y 30 DIV (B) en presencia de citocalasina E (○) o de citocalasina B (●) a diferentes concentraciones. **C.** Efecto de la presencia de glucosa sobre la captación de DHA 100 μ M en astrocitos de 15 (○) y 30 (●) DIV. Los resultados corresponden al promedio \pm DS de tres experimentos realizados por triplicado. Los asteriscos indican qué valores son significativos, mediante análisis estadístico utilizando el Test de Bonferroni (*p, 0.05; **p, 0,01).

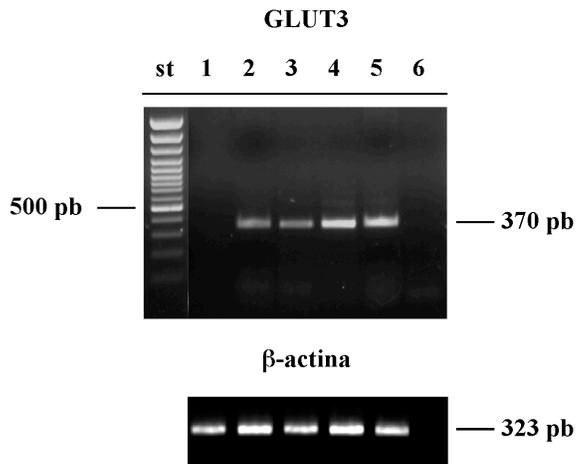
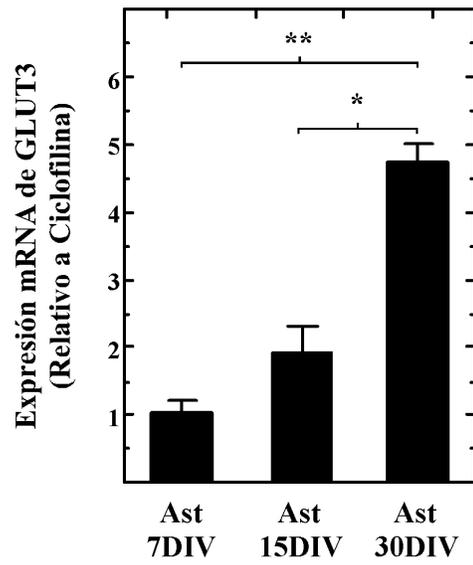
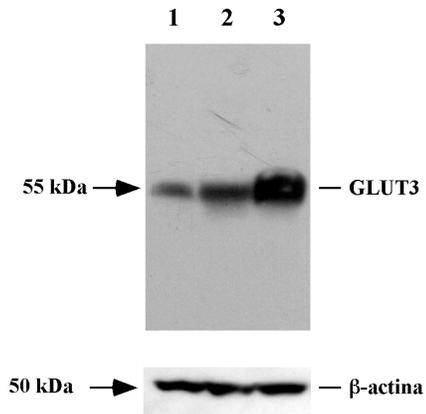
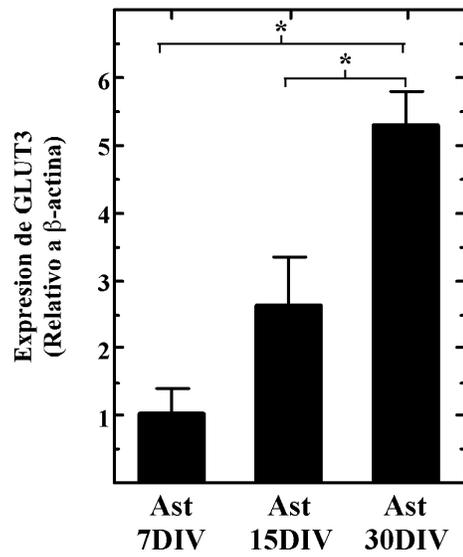
Por otro lado, en los astrocitos de 30 DIV se observó que la presencia de glucosa inhibe de forma significativa la incorporación de DHA, efecto que es dosis dependiente, alcanzando una inhibición del $50 \pm 9\%$ en presencia de 4 mM de glucosa y un nivel máximo de inhibición de un 85.5% en presencia de glucosa 10 mM (Figura 10, C).

Con los resultados anteriores podemos concluir que el periodo de cultivo de los astrocitos no afecta la captación de 2-DOG, pero sí la incorporación de la forma oxidada de la vitamina C, DHA. Una posible explicación para estos resultados es que los astrocitos de 30 DIV induzcan la expresión de otra isoforma de los transportadores GLUTs y que esta nueva isoforma explique el aumento en la captación de DHA. En literatura se describe que los astrocitos sólo expresan el transportador de glucosa GLUT1 en condiciones normales pero que bajo ciertas condiciones podrían inducir la expresión del transportador GLUT3 (Cidad et al., 2001; Iwabuchi and Kawahara, 2011a). Considerando estos antecedentes analizamos la expresión de GLUT3 en astrocitos de 15 y 30 DIV. Mediante RT-PCR (Figura 11, A) determinamos una banda de 370 pb, tamaño esperado para el transportador GLUT3. Esta banda no fue detectada en los astrocitos de 7 DIV (Figura 11, A línea 1). En los astrocitos de 15 DIV se determinó una débil señal y en los astrocitos de 30 DIV una señal de amplificación más intensa (Figura 11 A, línea 2 y 3 respectivamente). Como control interno de la expresión se utilizaron cultivos primarios de neuronas de 5 DIV (Figura 11, A línea 4). Al utilizar PCR cuantitativo (Figura 11, B) determinamos que la expresión de GLUT3 aumenta 5 veces en los astrocitos de 30 DIV, en comparación con los astrocitos de 7 DIV.

Figura 11: Expresión del mRNA y proteína del transportador GLUT3 en astrocitos mantenidos en cultivo.

Los astrocitos fueron extraídos desde el cerebro de ratas de 1 día postnatal y mantenidos en cultivo por diferentes periodos. **A.** Análisis de RT-PCR de GLUT3. Los productos de RT-PCR de GLUT3 se obtuvieron amplificando ADNs de astrocitos de 7, 15 y 30 DIV (líneas 1, 2 y 3, respectivamente), neuronas de 5 DIV (línea 4), cerebro total (línea 5) y el control negativo (línea 6) . **B.** Estudios de RT-PCR cuantitativo de GLUT3 en astrocitos de 15 y 30 DIV y neuronas de 5 DIV. **C.** Western blot para GLUT3 en extracto de proteínas de astrocitos de 7, 15 y 30 DIV. **D.** Cuantificación de la intensidad de banda obtenida en el ensayo de *western blot* de la figura C. Los resultados corresponden al promedio \pm DS de tres experimentos realizados por triplicado. Los asteriscos indican qué valores son significativos, mediante análisis estadístico utilizando el Test de Bonferroni (*p, 0,05; **p, 0.01).



A**B****C****D**

Mediante *Western blot* determinamos la presencia de GLUT3 en los astrocitos de 7, 15 y 30 DIV (Figura 11, C, carriles 1, 2 y 3 respectivamente), siendo la expresión a los 30 DIV cinco veces mayor que a los 7 DIV y dos veces mayor a lo observado a los 15 DIV (Figura 11, D).

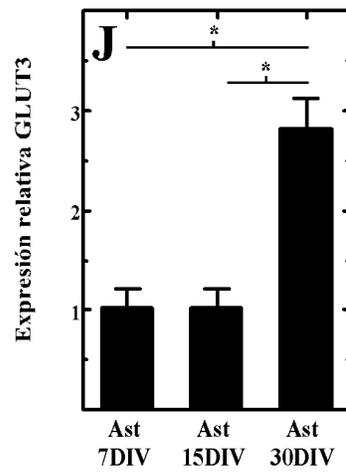
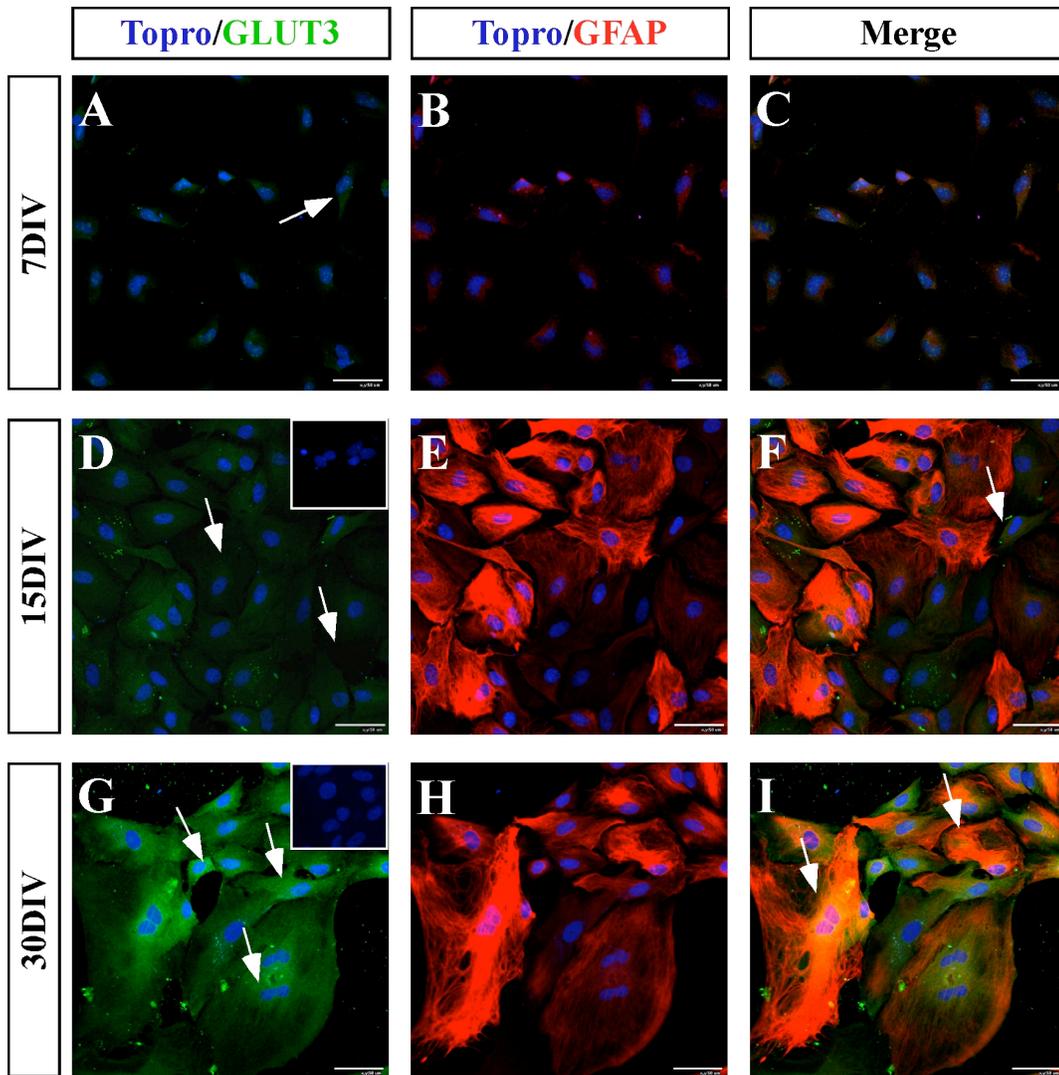
Al realizar el estudio inmunocitoquímico, utilizando un doble marcaje con GFAP, determinamos que la expresión de GLUT3 es baja en astrocitos de 7 DIV (Figura 12, A-C) y 15 DIV (Figura 12, D-F) presentando un aumento en la intensidad de señal en los astrocitos de 30 DIV (Figura 12, G-I). Al realizar la cuantificación de la fluorescencia, determinamos que la expresión del transportador GLUT3 es 2 y 5 veces mayor al comparar la señal de los astrocitos de 7 DIV con la obtenida en astrocitos de 15 ó 30 DIV, respectivamente (Figura 12, J).

Con el objetivo de poder identificar funcionalmente la contribución de cada transportador en la captación de 2-DOG nos propusimos determinar las constantes cinéticas (K_m y $V_{m\acute{a}x}$) para el transporte de 2-DOG. Se realizaron las curvas de saturación para 2-DOG a los 15 segundos, utilizando concentraciones crecientes de 2-DOG (0-14 mM). Las curvas generadas en los astrocitos de 15 y 30 DIV mostraron una hipérbola cuadrilátera (Figura 13, A y C) con un único componente cinético (Figura 13, B-D) y con una K_m aparente de $4,57 \pm 1,3$ mM y una $V_{m\acute{a}x}$ de $10,6 \pm 2$ nmol $\times 10^6$ células/min en astrocitos de 15 DIV (Figura 13, B) y una K_m aparente de $5,88 \pm 1$ mM y una $V_{m\acute{a}x}$ de $12,3 \pm 2$ nmol $\times 10^6$ células/min en astrocitos de 30 DIV (Figura 13, D). En ambos modelos solo se determinó una componente cinética, mostrando que las K_m s de GLUT1 y GLUT3 tienen valores muy cercanos entre si.

Figura 12: Expresión de GLUT3 en astrocitos mantenidos en cultivo por diferentes periodos.

Los astrocitos extraídos desde corteza cerebral de rata de 1 día postnatal fueron mantenidos en cultivo por 7, 15 y 30 DIV. Análisis de inmunofluorescencia y microscopía confocal. En verde se observa la reacción para GLUT3, en rojo la reacción para GFAP y en azul la tinción de contraste nuclear con TOPRO. **J.** Cuantificación de la señal de inmunofluorescencia para la señal de GLUT3 en astrocitos de 7, 15 y 30 DIV. Los resultados corresponden al promedio \pm DS de tres experimentos realizados por triplicado. Los asteriscos indican qué valores son significativos, mediante análisis estadístico utilizando el Test de Bonferroni (*p, 0,01); Aumento x400.





En resumen, los astrocitos expresan funcionalmente transportadores de DHA y glucosa, debido a lo cual tienen la capacidad para incorporar DHA del medio extracelular. El periodo de cultivo afecta la expresión de transportadores de DHA y glucosa en los astrocitos, de esta forma, postulamos que los astrocitos de 30 días *in vitro* tendrían un fenotipo reactivo sobreexpresando GLUT3 y aumentando su capacidad para captar DHA.

1.4- Efecto de glutamato en la captación de 2-DOG y DHA en astrocitos mantenidos por diferentes periodos en cultivo.

Diferentes antecedentes indican que glutamato modifica la captación de glucosa en diferentes tipos celulares. De esta forma, analizamos el efecto de glutamato en la captación de DHA. De esta forma, las células fueron pre - incubadas con diferentes concentraciones de glutamato durante 10 minutos y posteriormente se realizó la incorporación de 2-DOG o DHA.

Con la metodología descrita, determinamos que la presencia de glutamato (0-3 mM) no afecta la incorporación de 2-DOG en astrocitos de 15 DIV (Figura 14, A). Sin embargo, en astrocitos de 30 DIV observamos que bajas dosis de glutamato son capaces de aumentar significativamente la captación de 2-DOG, incrementando un $300\pm 49\%$ en presencia de glutamato $100\ \mu\text{M}$. A concentración de glutamato 3 mM, el aumento en la captación de 2-DOG fue de un $400\pm 89\%$ (Figura 14, A).

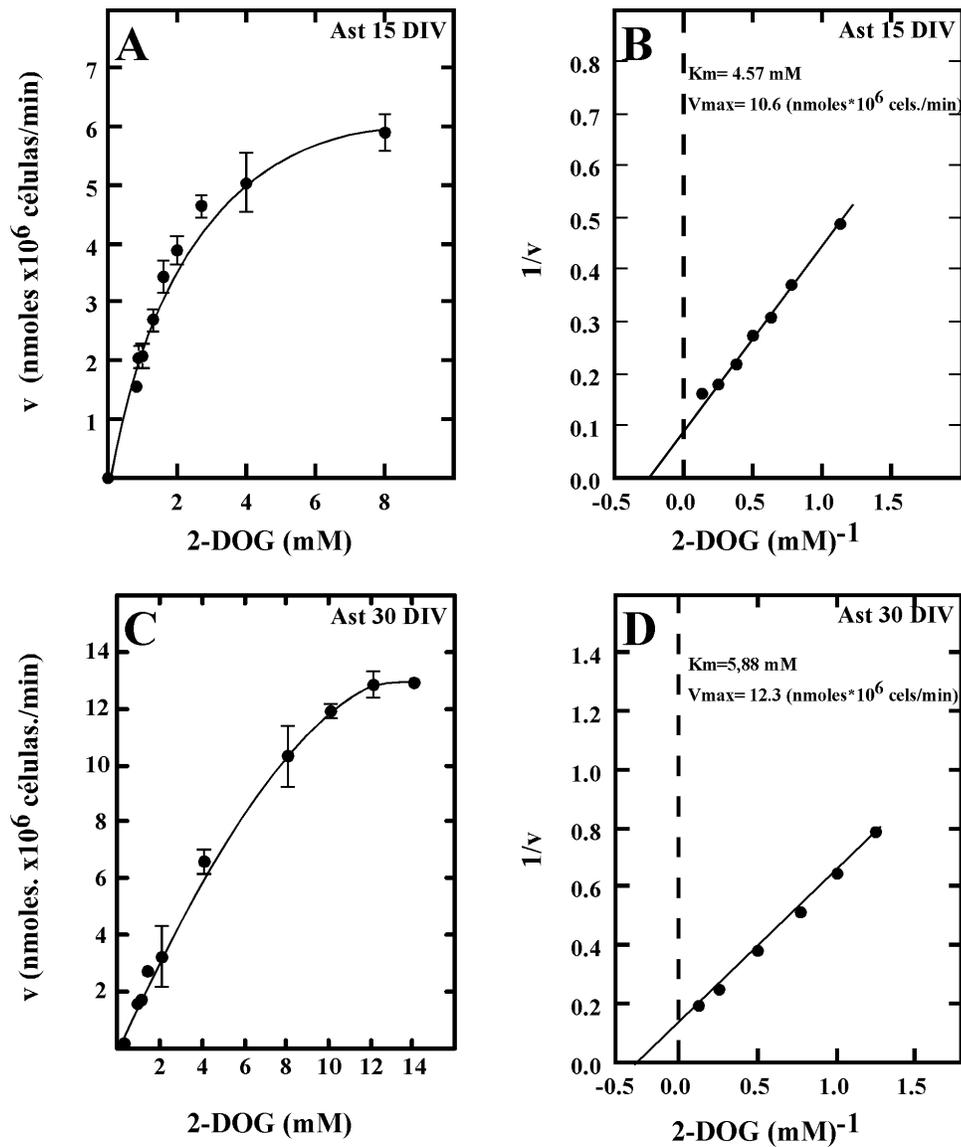


Figura 13. Análisis funcional de la incorporación de 2-DOG en astrocitos de 15 y 30DIV.

A-B. Curva de dosis respuesta realizada incubando los astrocitos de 15DIV (A) y 30DIV (C) con concentraciones crecientes de 2-DOG (0-14 mM) por 15 seg. **C-D.** Datos cinéticos analizados utilizando la gráfica de Lineweaver-Burk, en astrocitos de 15DIV (B) y 30DIV (D). Los resultados corresponden al promedio \pm DS de tres experimentos realizados por triplicado.

Al analizar el efecto de glutamato sobre la captación de DHA, observamos en los astrocitos de 15 DIV (Figura 14, B) que la presencia de bajas concentraciones de glutamato no afecta la incorporación de DHA, sin embargo, al aumentar los niveles de glutamato a 1 mM observamos una inhibición en un $40 \pm 6\%$. Este efecto se mantuvo al utilizar 3 mM glutamato. En los astrocitos de 30 DIV (Figura 14, B) se observó que la presencia de glutamato, en bajas o altas concentraciones, es capaz de inhibir la captación de DHA significativamente.

El efecto diferencial de glutamato sobre la captación de 2-DOG y DHA, podría ser generada por muerte celular (Nedergaard et al., 2002). Para descartar este efecto realizamos estudios de viabilidad mediante tinción nuclear con DAPI, la cual nos permitió determinar el porcentaje de células que están en apoptosis. Los astrocitos de 15 y 30 DIV fueron incubados con glutamato 1 mM por diferentes tiempos (0-60 minutos). Transcurrido el periodo de incubación las células fueron lavadas y fijadas con PFA al 4%, para ser luego incubadas con DAPI. Determinamos que los astrocitos de 15 DIV no generan un aumento significativo en la muerte celular, efecto que sólo fue observado luego de mantener las células 1 hora en presencia de glutamato (Figura 15, A). Los astrocitos de 30 DIV fueron más resistentes al efecto de glutamato, ya que en las condiciones analizadas la muerte celular no superó el $20 \pm 6\%$ (Figura 15, B). Con estos resultados concluimos que el glutamato no induce un efecto tóxico en los astrocitos.

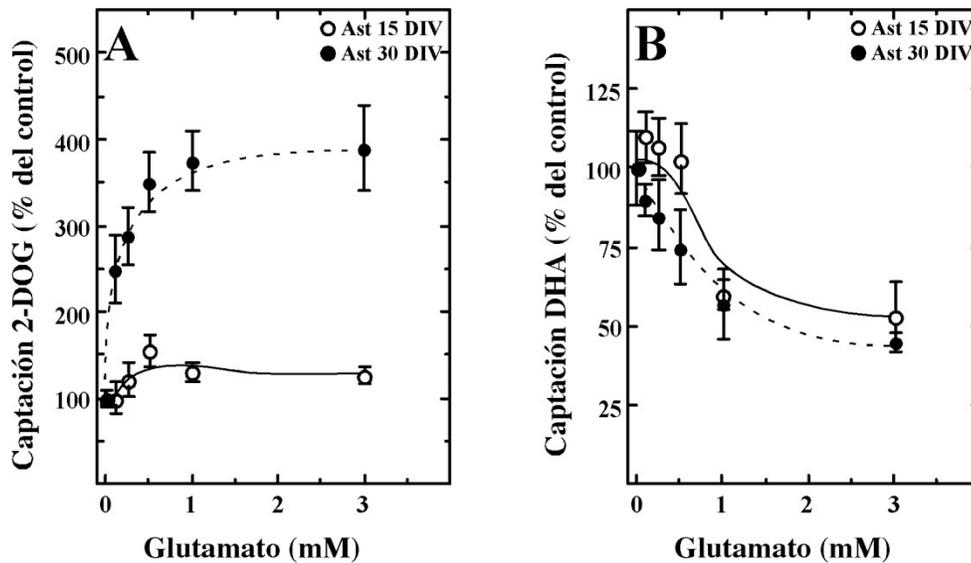


Figura 14: Efecto de glutamato sobre la captación de 2-DOG y DHA en astrocitos mantenidos en cultivo por 15 y 30 días.

A. Los astrocitos fueron pre-incubados con diferentes concentraciones de glutamato (glu) por 10 min. Luego se analizó la captación de 100 μ M 2-DOG por 15 seg en astrocitos de 15 (A) y 30 DIV (B). **B.** Los astrocitos fueron pre-incubados con diferentes concentraciones de glutamato (glu) por 10 min. Luego se analizó la captación de 100 μ M DHA por 15 seg.

Los resultados corresponden al promedio \pm DS de tres experimentos realizados por triplicado.

El efecto diferencial de glutamato sobre la captación de 2-DOG en astrocitos de 15 y 30 DIV puede también ser explicado por una expresión diferencial de transportadores de glutamato. Para ello, analizamos mediante inmunocitoquímica la expresión del transportador de glutamato EAAT1 o GLAST. Determinamos que los astrocitos de 15 DIV expresan bajos niveles del transportador de glutamato, distribuido uniformemente en estas células (Figura 16, A-D, flechas). En astrocitos de 30 DIV se observó un aumento en la intensidad de la señal que se distribuyó uniformemente en el cuerpo celular de los astrocitos (Figura 16, E-H). Al cuantificar la intensidad de fluorescencia determinamos que la señal en astrocitos de 30 DIV es casi 2 veces mayor a la obtenida en los astrocitos de 15 DIV (Figura 16, I). Con los resultados descritos previamente hemos determinado que el periodo de cultivo, modula la expresión de ciertas proteínas, tales como GLUT1, GLUT3 y EAAT1, además el periodo de cultivo afecta la respuesta de los astrocitos a diferentes procesos, tales como la captación de DHA y 2-DOG.

1.5- Análisis inmunocitoquímico de marcadores de astrocitos reactivos en cultivos primarios de astrocitos de 15 y 30DIV.

Considerando los resultados previamente analizados, es posible postular que los astrocitos en cultivo (30 DIV) inducen propiedades presentes en astrocito reactivos. La activación de los astrocitos es un proceso poco estudiado *in vitro* y su análisis se asocia principalmente al estudio de la formación de la cicatriz glial en fenómenos de injuria cerebral *in situ*.

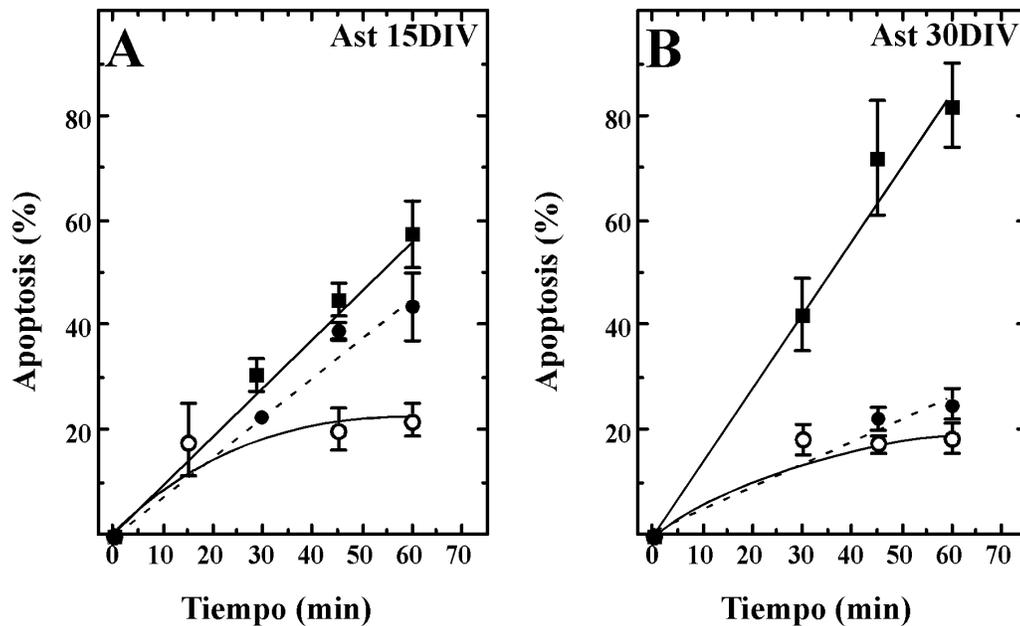


Figura 15: Efecto de glutamato sobre la viabilidad celular en astrocitos de 15 y 30 DIV.

A-B. Los astrocitos de 15DIV (A) y 30DIV (B) fueron pre-incubados por diferentes tiempos en tampón de incubación (○), en presencia de glutamato 1 mM (●) o en presencia de peroxido de hidrogeno 300 μ M (H₂O₂, ■), luego fueron fijados con PFA al 4% y posteriormente incubados con DAPI. En los astrocitos de 15 DIV se observó un aumento significativo de la muerte celular al incubar las células por 1 h en presencia de glutamato. En los astrocitos de 30 DIV la incubación con glutamato no generó cambios significativos en la viabilidad celular. Los resultados corresponden al promedio \pm DS de tres experimentos realizados por triplicado. Los asteriscos indican qué valores son significativos mediante análisis estadístico utilizando el Test de Bonferroni (*p, 0,01).

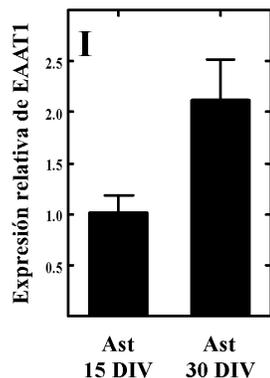
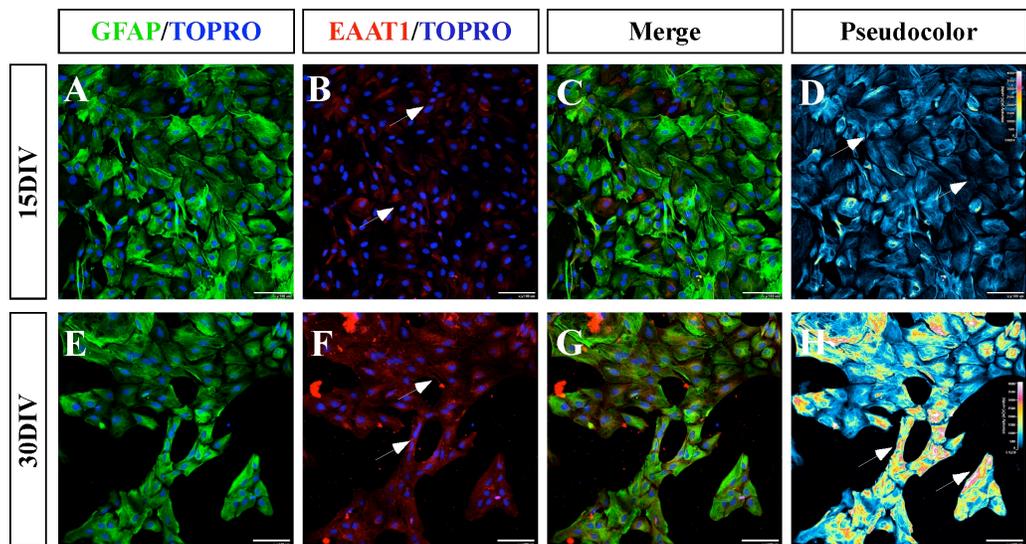


Figura 16: Expresión de EAAT1 en astrocitos mantenidos en cultivo por diferentes periodos.

Análisis de inmunofluorescencia y microscopía confocal para la expresión de EAAT1 en astrocitos de 15 DIV (A-D) y 30 DIV (E-H). En verde se observa la reacción para GFAP, en rojo la reacción para el transportador EAAT1 y en azul la tinción de contraste nuclear con TOPRO. La mayor intensidad de reacción fue encontrada en astrocitos de 30 DIV. Aumento x400. I. Cuantificación de la señal de inmunofluorescencia para la señal de EAT1 en astrocitos de 15 y 30 DIV. Los resultados corresponden al promedio \pm DS de tres experimentos realizados por triplicado. Escala: 50 μ m

Se han descrito una serie de marcadores proteicos que serían propios de astrocitos reactivos (Ridet et al., 1997; Robel et al., 2011), por ejemplo, GFAP, vimentina, la proteína asociada a microtúbulos 2 (MAP-2) y el marcador nestina. Con el objetivo de definir si los cultivos de astrocitos inducen y/o incrementan la expresión de los marcadores de activación, analizamos mediante inmunocitoquímica la expresión de GFAP, Vimentina, MAP-2 y nestina en los astrocitos de 15 y 30 DIV. Como control positivo de astrocitos reactivos, se incluyó en este análisis la línea celular de astrocitoma de rata C6. Esta línea celular se utiliza ampliamente como modelo de astrocitos tumorales, sin embargo, la diferenciación tumoral y la activación glial comparten diferentes propiedades (Robel et al., 2011).

En bibliografía se describe que los astrocitos reactivos aumentan la expresión de la proteína GFAP, marcador característico de células gliales. Al analizar la expresión de esta proteína en nuestro modelo de estudio no observamos cambios significativos en la expresión de GFAP entre los astrocitos de 15 DIV, 30 DIV y las células C6 (Figura 17, A, E, I y M). Luego, analizamos la expresión del filamento intermedio vimentina, el cual se ha descrito como un marcador de astrocitos reactivos. En los astrocitos de 15 DIV no detectamos reacción positiva para el análisis inmunocitoquímico, observando sólo la tinción correspondiente al marcador de astrocitos GFAP y a la tinción nuclear (Figura 17, B). Al repetir el análisis en los astrocitos de 30 DIV observamos que estas células presentan un alto grado de inmunorreactividad para vimentina, señal que se localizó uniformemente en el citoplasma celular (Figura 17, F). Al analizar la expresión de vimentina en las células C6 encontramos una baja expresión de la proteína (Figura 17, J). El análisis

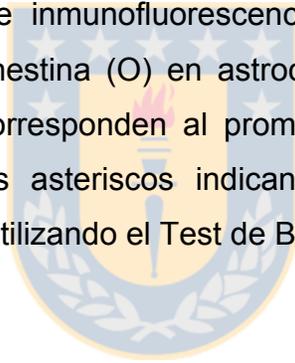
cuantitativo de la intensidad de fluorescencia confirma lo observado anteriormente, determinando que la señal obtenida en las células C6 es similar a la de astrocitos de 15 DIV y que la expresión en los astrocitos de 30 DIV presenta un aumento de 4 veces con respecto a los astrocitos de 15 DIV y células C6 (Figura 17, N).

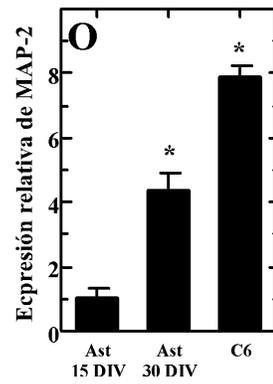
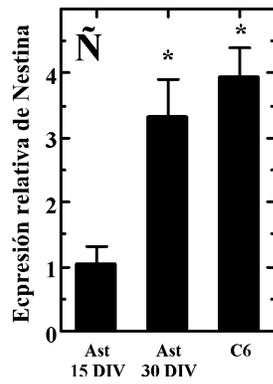
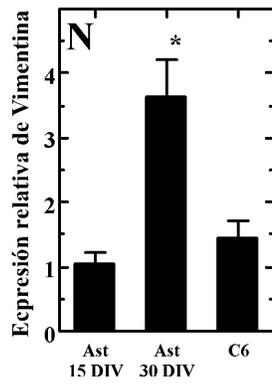
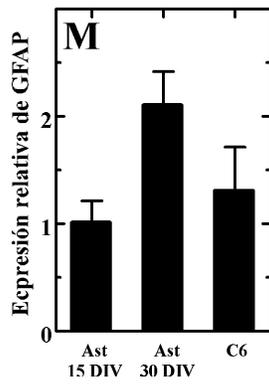
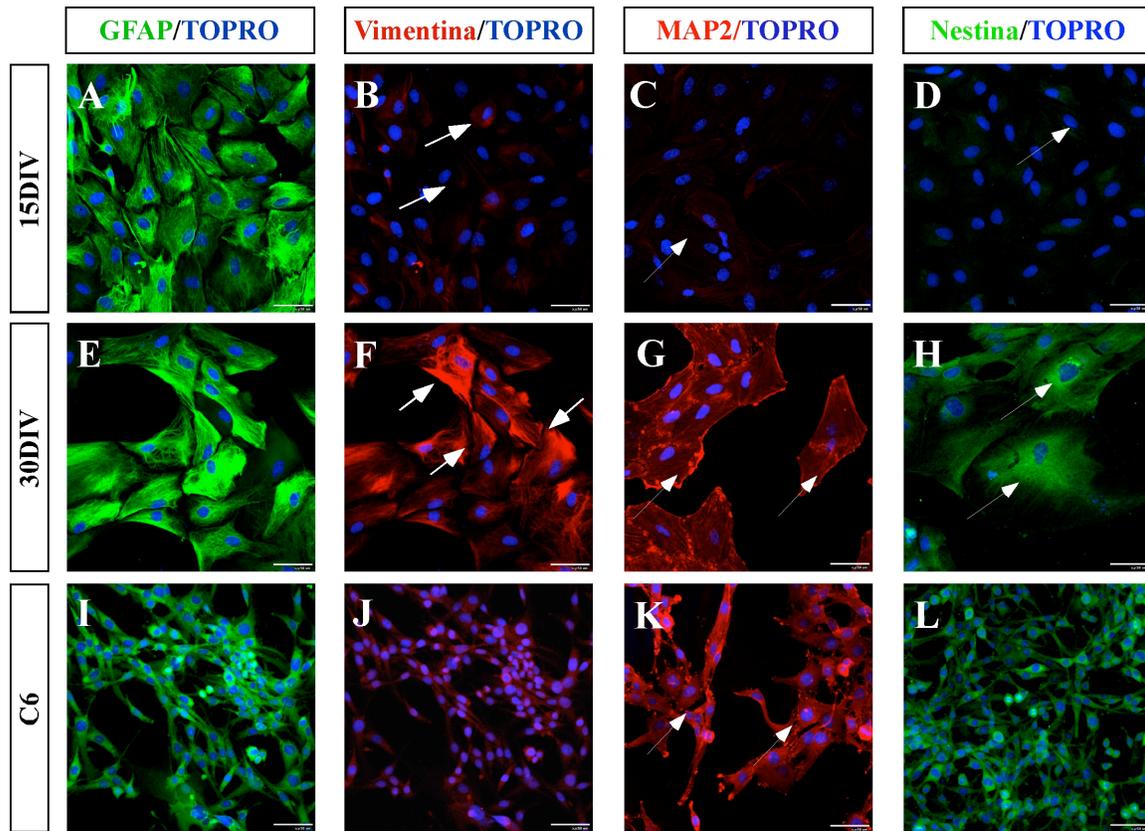
El tercer marcador analizado fue MAP-2, descrito como un marcador de neuronas maduras. Al realizar el análisis inmunocitoquímico observamos que los astrocitos de 15 DIV no presentan reacción positiva para MAP-2 (Figura 17, C). Sin embargo, en los astrocitos de 30 DIV observamos una fuerte reacción positiva que se localizó preferentemente en el citoplasma (Figura 17, G). En las células C6 obtuvimos una intensa reacción positiva distribuida en el citoplasma de las células (Figura 17, K). Al cuantificar la intensidad de fluorescencia, determinamos que en los astrocitos de 30 DIV la expresión relativa de MAP-2 aumenta 5 veces con respecto a las células de 15 DIV (Figura 17, Ñ).

Por último, analizamos la expresión del marcador de células troncales cerebrales nestina, que se expresa sólo en células capaces de generar linajes específicos en el cerebro. En los astrocitos de 15 DIV no obtuvimos reacción positiva para el marcador (Figura 17, D), sin embargo, al analizar la localización de nestina en astrocitos de 30 DIV observamos una intensa inmunoreactividad distribuida en el citoplasma (Figura 17, H).

Figura 17: Análisis de la expresión de GFAP, vimentina, MAP-2 y nestina en astrocitos mantenidos por 15 y 30 DIV y en la línea celular C6.

Los astrocitos extraídos desde corteza cerebral de rata de 1 día postnatal fueron mantenidos en cultivo por 15 y 30 DIV. La línea celular C6 fue cultivada en confluencia y procesada para el análisis inmunocitoquímico. Las muestras fijadas fueron analizadas por inmunofluorescencia asociada a microscopia confocal y en todas se incluyó la tinción de contraste nuclear con TOPRO, azul. **A, E, I.** Análisis para el marcador glial, GFAP en verde. **B, F, J.** Análisis para el marcador vimentina en rojo. **C, G, K.** Análisis para el marcador neuronal, MAP-2 en rojo. **JD, H, L.** Análisis para el marcador de células troncales cerebrales, nestina en verde. **M-O .** Cuantificación de la señal de inmunofluorescencia para la señal de GFAP (M), vimentina (N), MAP-2 (Ñ) y nestina (O) en astrocitos de 15 y 30DIV, y en línea celular C6. Los resultados corresponden al promedio \pm DS de tres experimentos realizados por triplicado. Los asteriscos indican qué valores son significativos, mediante análisis estadístico utilizando el Test de Bonferroni (*p, 0,01); Escala 400x.





Al analizar la distribución de nestina en las células C6, observamos que se localiza en la zona perinuclear (Figura 17, L). Al cuantificar la intensidad de fluorescencia determinamos que los astrocitos de 30 DIV y las células C6 aumentan 3 veces la intensidad de fluorescencia en comparación con los astrocitos de 15 DIV (Figura 17, O).

Los resultados anteriores nos permiten concluir que largos periodos de cultivo inducen la expresión de una serie de proteínas, descritas como marcadores de astrocitos reactivos.

1.6 Resumen de resultados del Capítulo 1.

En la primera parte de esta tesis hemos demostrado un aumento en la expresión de GLUT1 al incrementar el periodo de cultivo. Además definimos que los astrocitos de 30 DIV incorporan 3 veces más DHA que los astrocitos de 15 DIV, condición no observada con 2-DOG. Los astrocitos de 30 DIV inducirían la expresión de GLUT3. Paralelamente, determinamos que los astrocitos de 30 DIV inducen la expresión de vimentina, MAP-2 y nestina, condición que no se detectó en los astrocitos de 15 DIV y que es asociada a astrocitos reactivos. Con estos resultados podemos concluir que los astrocitos de 15 DIV podrían representar astrocitos cerebrales “normales”, con una excelente capacidad para captar DHA. Por otro lado los astrocitos de 30 DIV representarían el primer modelo *in vitro* para estudiar astrocitos en estado reactivo. Estas células aumentarían su capacidad para incorporar DHA, pero esta condición sería fuertemente competida por glucosa.

CAPITULO 2. Efecto de la acumulación de DHA, sobre el metabolismo redox y energético de astrocitos en cultivo.

Considerando estos resultados de esta tesis, analizamos en el presente capítulo qué ocurre con el DHA en el interior de los astrocitos, estudiando en primer lugar el potencial de los astrocitos para reducir el DHA a AA. En una segunda etapa analizamos el efecto de la entrada y acumulación del DHA sobre el metabolismo de la glucosa y el balance redox del astrocito.

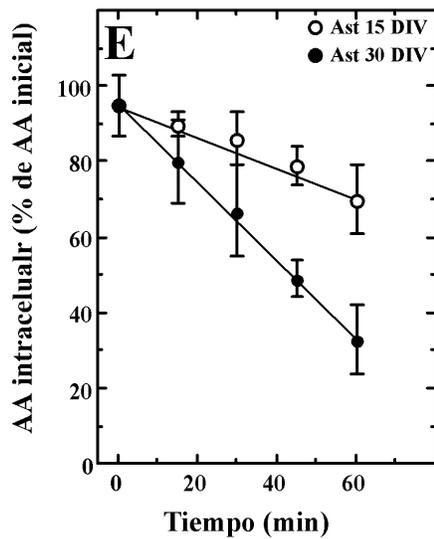
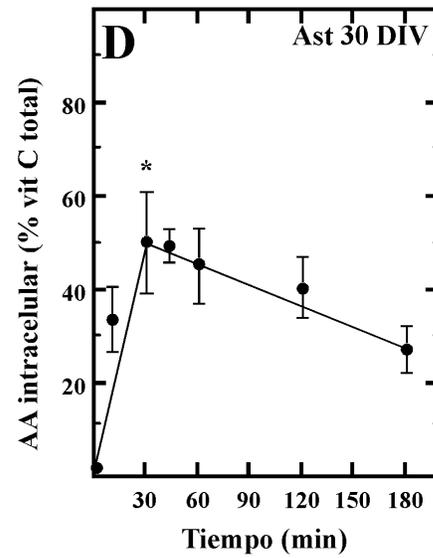
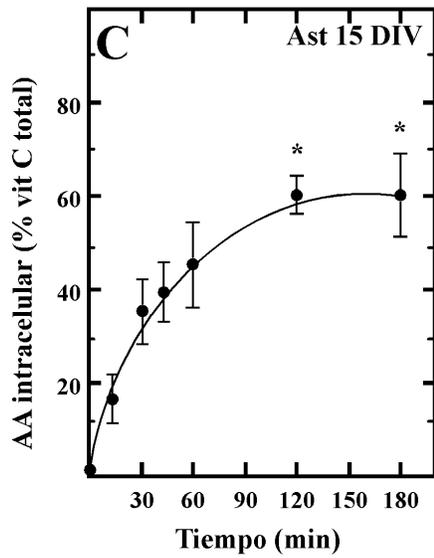
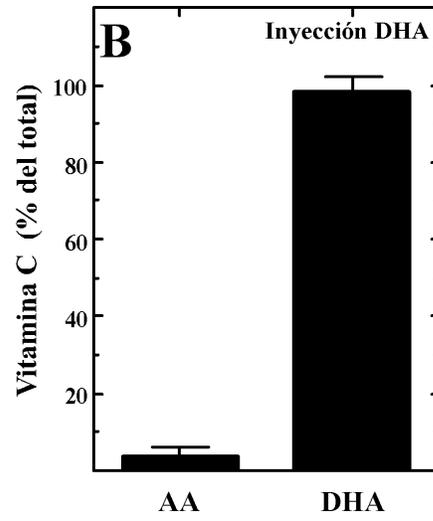
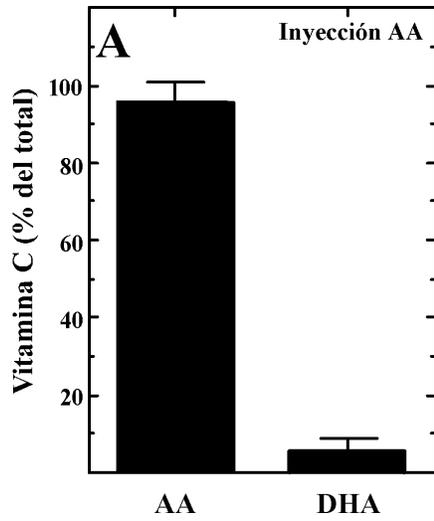
2.1 Análisis del potencial reductor de los astrocitos mantenidos por diferentes periodos *in vitro*.

Para poder separar e identificar eficientemente ambas formas redox de la vitamina C estandarizamos un protocolo de HPLC, para lo cual se inyectaron estándares totales de AA o DHA. Al inyectar el estándar de AA se determinó que un $95\pm 3\%$ del AA inyectado se mantiene como tal, indicando que el paso de la muestra por el sistema de HPLC no genera la oxidación masiva del AA (Figura 18, A). Al inyectar un estándar de DHA, observamos que un $98\pm 2\%$ de la muestra se mantiene como DHA, de esta forma, el método de HPLC no genera reducción del DHA inyectado en la columna (Figura 18, B).

Figura 18: Análisis cinético del potencial reductor de astrocitos de 15 y 30 DIV.

A-B. Inyección de estándares de AA (A) y DHA (B) analizados por HPLC. **C-D.** Los cultivos primarios de astrocitos fueron incubados con DHA 100 μ M por 20 min a 37 °C. Luego se analizó mediante HPLC a diferentes tiempos el porcentaje de vitamina C que se encuentra en el interior de los astrocitos a la forma de AA. Los astrocitos de 15 DIV (C) presentan una mayor capacidad reductora que los astrocitos de 30 DIV (D). **E.** Los astrocitos fueron incubados con AA 0.5 mM por 10 min, luego se analizó a diferentes tiempos los niveles intracelulares de AA. Los resultados corresponden al promedio \pm DS de menos 3 experimentos realizados por triplicado. Los asteriscos indican qué valores son significativos, mediante análisis estadístico utilizando el Test de Bonferroni (*p, 0,01).





El paso siguiente fue analizar la capacidad reductora de los astrocitos. Para realizar este análisis los astrocitos fueron incubados con DHA 100 μ M marcado radiactivamente, por 20 min y luego se analizó a diferentes tiempos el porcentaje de AA en el interior de los astrocitos. En los astrocitos de 15 DIV se observó que los niveles de AA intracelular aumentan de forma tiempo dependiente desde un 17.5% a los 15 min hasta un 60.8% a las 2 horas, nivel que se mantiene hasta las 3 horas posterior a la incubación (Figura 18, C). En los astrocitos de 30 DIV se observó que luego de 30 min un 50.10% del DHA incorporado se encuentra como AA, sin embargo, los niveles de AA bajan al aumentar el tiempo de post-incubación, alcanzando un 26.5% luego de 3 horas (Figura 18, D).

Para analizar la capacidad de los astrocitos de mantener reducido el AA incorporado, analizamos los niveles de AA intracelular, a diferentes tiempos, luego de incubar los astrocitos con AA 0.5 mM. En los astrocitos de 15 DIV observamos que estas células son capaces de mantener el AA incorporado como tal por un mayor periodo de tiempo, ya que luego de 60 min un $70 \pm 9\%$ del AA se mantiene como tal. Por otro lado, en los astrocitos de 30 DIV se observó una rápida oxidación intracelular ya que luego de 45 min un $50 \pm 10\%$ del AA se encuentra como DHA, alcanzando un $50 \pm 10\%$ luego de 60 min de incubación (Figura 18, E).

El AA es preferentemente mantenido como tal en el astrocito de 15 DIV, mostrando que esta célula tiene importantes propiedades para el reciclamiento de vitamina C.

2.2 Efecto de la acumulación de DHA sobre la velocidad glicolítica, actividad de la vía de las pentosas fosfato (PPP) y niveles de glutatión (GSH) en astrocitos mantenidos en cultivo.

Para los estudios de velocidad glicolítica, los astrocitos fueron incubados previamente con AA o DHA por diferentes tiempos y a diferentes concentraciones, luego las células fueron resuspendidas e incubadas con H^3 -glucosa por 1 hora. Luego las células fueron lisadas e incubadas a $37^{\circ}C$ para permitir el intercambio del H^2O , finalmente se cuantificó la marca radioactiva generada.

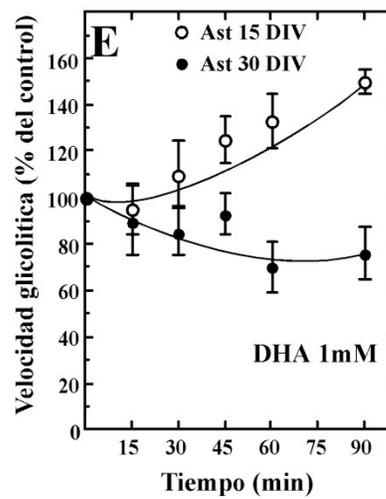
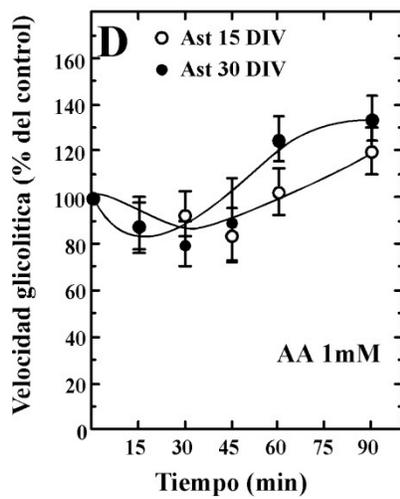
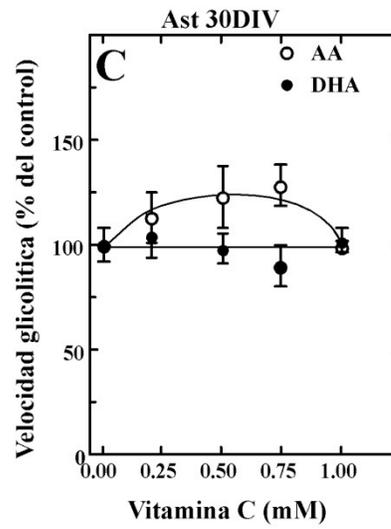
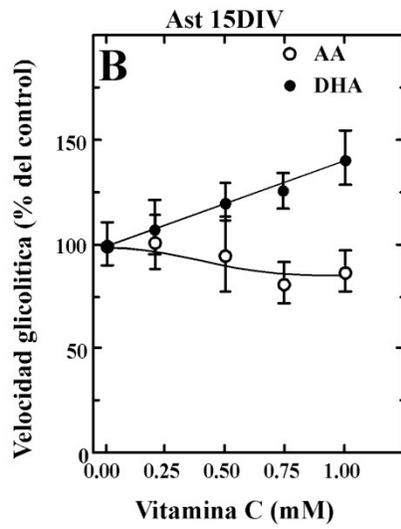
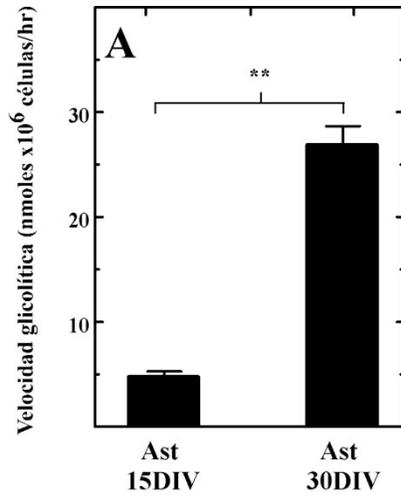
En primer lugar se analizó la velocidad glicolítica basal de astrocitos de 15 y 30 DIV. En los astrocitos de 15 DIV se observó una actividad basal de consumo de glucosa de $5.0.4 \text{ nmoles} \times 10^6 \text{ células/h}$. En los astrocitos de 30 DIV se observó una actividad basal de $26.4 \text{ nmoles} \times 10^6 \text{ células /h}$, valor 5 veces mayor al observado en los astrocitos de 15 DIV (Figura 19, A).

Para analizar el efecto de la dosis de AA o DHA sobre la velocidad glicolítica, las células fueron incubadas con diferentes concentraciones de AA o DHA por 45 min y luego se cuantificó la velocidad glicolítica, según el protocolo descrito previamente. En los astrocitos de 15 DIV se observó que la presencia de AA 1 mM no afecta la velocidad glicolítica basal. Por otro lado, la presencia de DHA es capaz de estimular levemente la velocidad glicolítica de forma dosis dependiente, alcanzando un máximo de un 47.6% al incubar con DHA 1 mM (Figura 19, B). En los astrocitos de

Figura 19: Efecto de la acumulación de vitamina C sobre la actividad glicolítica de astrocitos en cultivo.

A. Análisis de la velocidad glicolítica basal en astrocitos de 15 y 30 DIV. **B-C.** Efecto de diferentes concentraciones de DHA (●) o AA (○) sobre la velocidad glicolítica de astrocitos de 15 DIV (B) y 30 DIV (C). **D-E.** Curso de tiempo del efecto de 1 mM de AA (D) o DHA (E) sobre la velocidad glicolítica en astrocitos de 15 DIV (○) y 30 DIV (●). Los resultados corresponden al promedio \pm DS de tres experimentos realizados por triplicado. Los asteriscos indican qué valores son significativos, mediante análisis estadístico utilizando el Test de Bonferroni (*p, 0,01).





30 DIV se observó que la acumulación de AA o DHA no fueron capaces de modificar la velocidad glicolítica (Figura 19, C). En base a los resultados anteriores, analizamos el efecto de AA o DHA 1 mM a diferentes tiempos de incubación. Observamos que la presencia de AA 1mM no provoca cambios significativos en la velocidad glicolítica en los astrocitos de 15 ó 30 DIV (Figura 19, D). Al analizar el efecto de DHA 1 mM observamos que la presencia de DHA en los astrocitos de 15 DIV estimula la velocidad glicolítica de manera tiempo dependiente alcanzando un máximo de estimulación del 55-9%, luego de 60 min de incubación, nivel que se mantiene luego de 90 min (Figura 19, E). Por otro lado, en los astrocitos de 30 DIV no se observó un efecto significativo en presencia de DHA (Figura 19, E). En resumen DHA estimula la velocidad glicolítica en astrocitos de 15 DIV, solamente.

El efecto del DHA previamente descrito en astrocitos de 15 DIV, podría ser explicado, por un efecto directo sobre la actividad de las enzimas que participan en la glicólisis. Para profundizar en esta idea, determinamos la actividad de HK en los astrocitos en cultivo. A los 15 DIV se observó que AA no provocó cambios en la actividad de HK. Sin embargo, la presencia de DHA 1 mM (30 min) es capaz de estimular 8 veces la actividad de HK (Figura 20, A), efecto que fue directamente proporcional al tiempo de incubación (Figura 20, C). En los astrocitos de 30 DIV, la presencia de AA o DHA no generaron un cambio significativo en la actividad de HK (Figura 20, B).

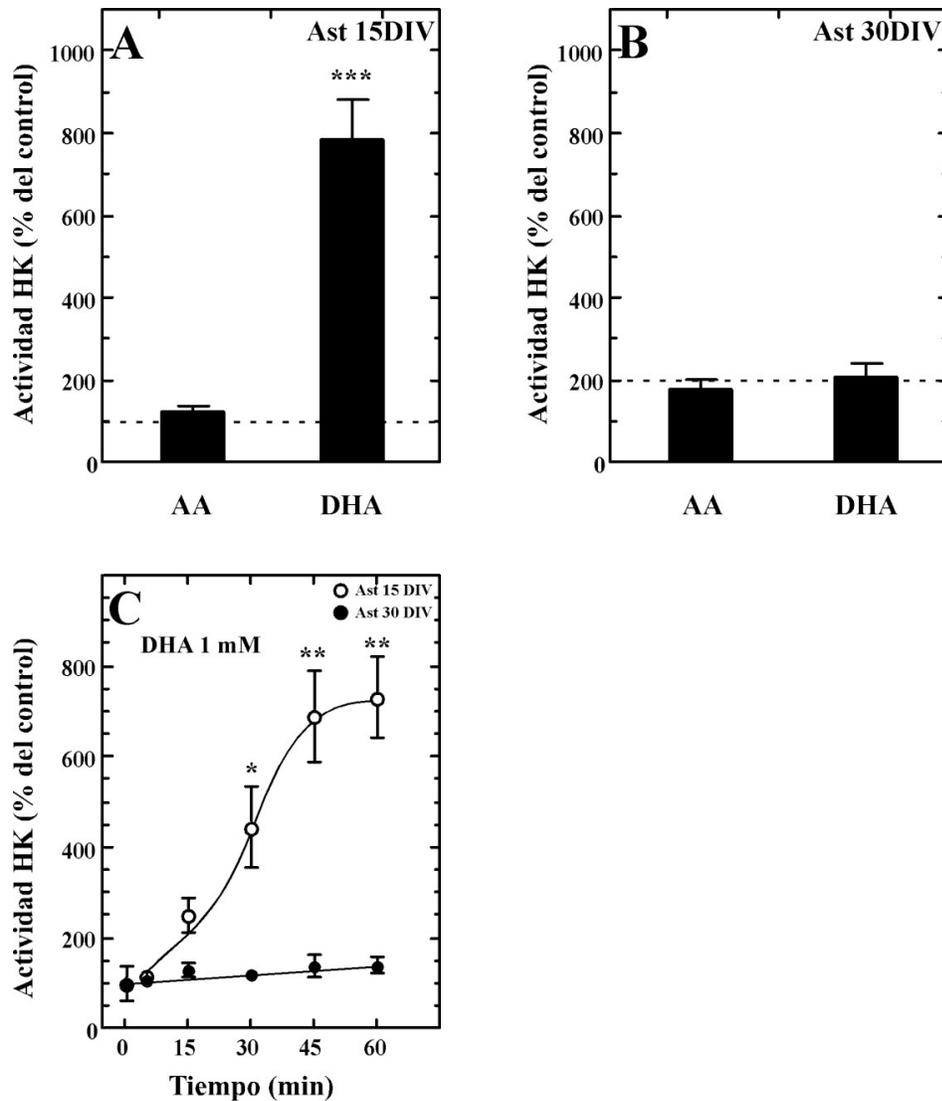


Figura 20: Efecto de la acumulación de AA o DHA sobre la actividad de la enzima *hexoquinasa* (HK) en astrocitos de 15 y 30 DIV.

A-B. Efecto de la acumulación de AA y DHA sobre la actividad *HK* en astrocitos de 15 DIV (A) y 30 DIV (B). **C.** Efecto del tiempo de incubación del DHA sobre la actividad *HK* en astrocitos de 15 DIV (○) y 30 DIV (●). Los resultados corresponden al promedio \pm DS de tres experimentos realizados por triplicado. Los asteriscos indican qué valores son significativos, mediante análisis estadístico utilizando el Test de Bonferroni (*p, 0,01).

En una segunda fase analizamos el efecto de la acumulación de vitamina C sobre la actividad de la vía de las pentosas fosfato (PPP), para lo cual las células fueron tratadas previamente con AA o DHA 1 mM por 45 min, y luego incubadas con 1-C¹⁴ glucosa o 6-C¹⁴ glucosa por 1 hora. Luego se analizó la cantidad de CO₂¹⁴ liberado por la vía de las pentosas y la glicólisis. Al medir la actividad basal, se observó que los astrocitos de 15 DIV presentan una actividad de 480·100 nmoles x10⁶ células /h, lo cual implica una alta actividad de la vía PPP por parte de estas células. En los astrocitos de 30 DIV determinamos una actividad basal de 10·3 nmoles x10⁶ células /h, es decir 300 veces menor que lo observado en los astrocitos de 15 DIV (Figura 21, A).

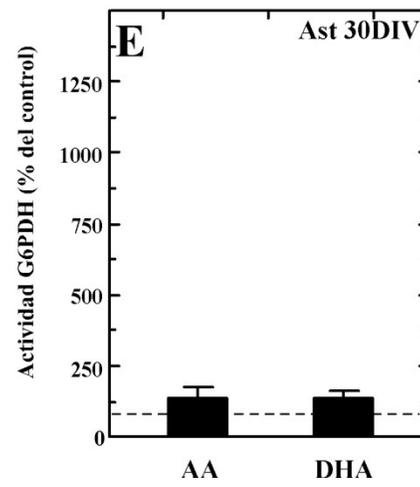
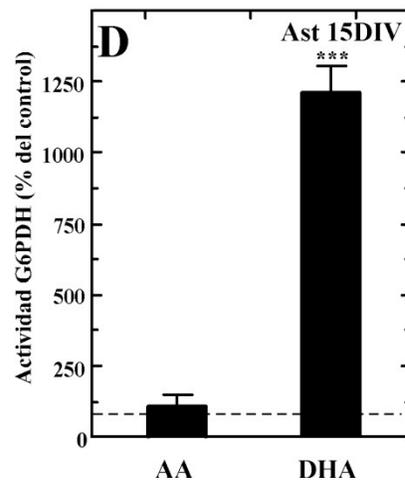
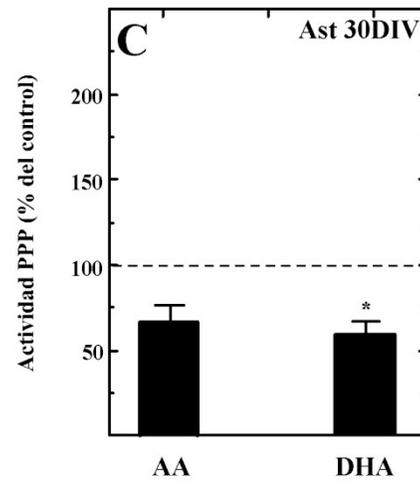
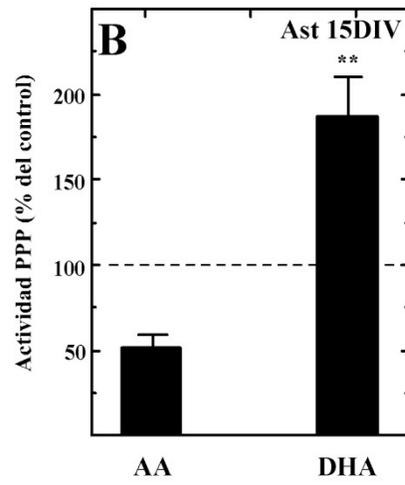
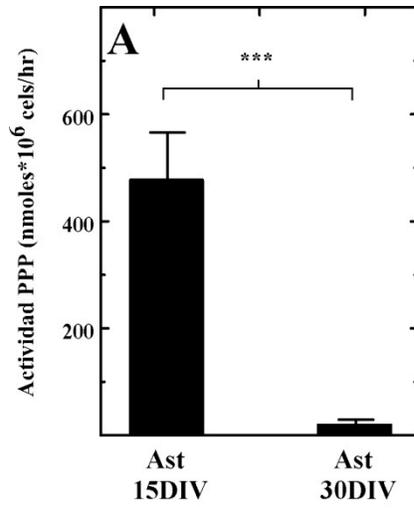
Paralelamente observamos que la incubación con DHA 1 mM es capaz de estimular en un 79·23% la actividad de la vía PPP en los astrocitos de 15 DIV. La incubación con AA 1 mM inhibió la actividad de las vía PPP en un 48·11% (Figura 21, B). En los astrocitos de 30 DIV se observó que la presencia de DHA inhibe en un 35·10% la actividad de las vía PPP, mientras que la presencia de AA no fue capaz de generar una inhibición significativa (Figura 21, C).

Para definir cómo DHA afecta la actividad de la vía PPP, analizamos el efecto de la vitamina C sobre la actividad de la enzima G6PDH la cual es la primera enzima de la vía y el punto de control más importante de ésta. En los astrocitos de 15 DIV DHA fue capaz de estimular la actividad de G6PDH en un 1110±223%, cambio altamente significativo y concordante

Figura 21: Efecto de la acumulación de vitamina C sobre la actividad de la vía de las pentosas fosfato (PPP) y la actividad de la enzima *glucosa-6-fosfato deshidrogenasa* (G6PDH) en astrocitos en cultivo.

A. Determinación de la actividad basal de la vía PPP en astrocitos de 15 y 30 DIV. **B-C.** Efecto de la acumulación de DHA o AA sobre la actividad de la vía PPP en astrocitos de 15 DIV (B) y 30 DIV (C). **D-E.** Efecto de la acumulación de AA o DHA sobre la actividad enzimática G6PDH en astrocitos de 15 DIV (D) y 30 DIV (E). Los resultados corresponden al promedio \pm DS de tres experimentos realizados por triplicado. Los asteriscos indican qué valores son significativos, mediante análisis estadístico utilizando el Test de Bonferroni (*p, 0,01).





con el aumento en la actividad PPP (Figura 21, D). En los astrocitos de 30 DIV la presencia de DHA o AA no afectó la actividad de la enzima (Figura 21, E). En resumen, los datos indican que DHA incrementa significativamente la actividad de la HK y la vía de la PPP, solamente en astrocitos de 15 DIV, células que representan a un astrocito “normal” eventualmente involucrado en un activo reciclamiento de vitamina C.

La vía PPP además de ser una vía alternativa para el consumo de glucosa, es una vía necesaria para mantener el balance redox de la célula, generando el cofactor NADPH el cual es utilizado por diferentes enzimas antioxidantes y para el reciclaje del GSH. Por este motivo nos propusimos analizar si el efecto de DHA sobre la vía PPP, genera de forma directa un cambio en los niveles intracelulares de GSH en astrocitos de 15 y 30 DIV.

Para realizar estos estudios, los astrocitos fueron incubados con DHA o AA por 10 min, luego las células fueron lavadas y mantenidas en tampón de incubación. Luego las células fueron lisadas y el lisado fue mezclado con el buffer de reacción para finalmente cuantificar los niveles de GSH. En primer lugar, determinamos los niveles basales de GSH en astrocitos de 15 y 30 DIV. Con este análisis observamos que los astrocitos de 15 DIV presentan $25.4 \text{ nmoles} \times 10^6 \text{ células}$ de GSH, mientras que los astrocitos de 30 DIV presentan $19.5 \text{ nmoles} \times 10^6 \text{ células}$, debido a lo cual ambos modelos celulares presentan niveles similares de GSH (Figura 22, A). Luego se analizó el efecto del AA y DHA sobre los niveles de GSH. En los astrocitos de 15 DIV se observó que la presencia de DHA genera un aumento dosis dependiente llegando a 47-10% con DHA 1 mM (Figura 22, B). En los astrocitos de 30 DIV se observó que

concentraciones bajas de DHA (0.1-0.5 mM) generan un aumento de un 24-9% en los niveles de GSH, sin embargo, a concentraciones mayores los niveles de GSH disminuyen significativamente, llegando a un 9-4% (Figura 22, B).

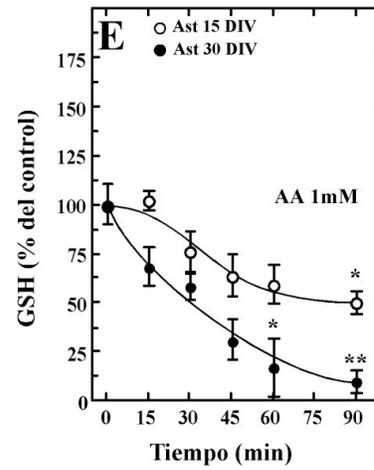
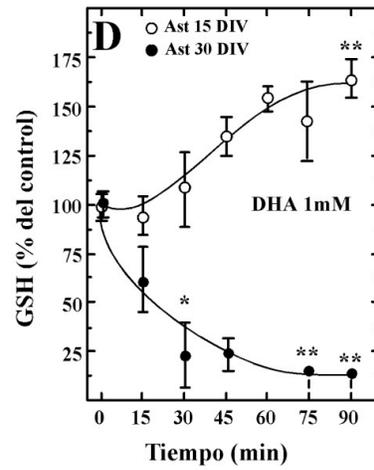
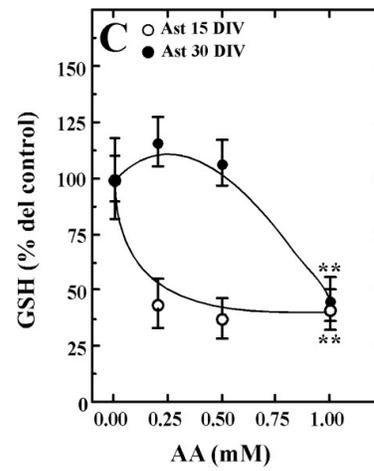
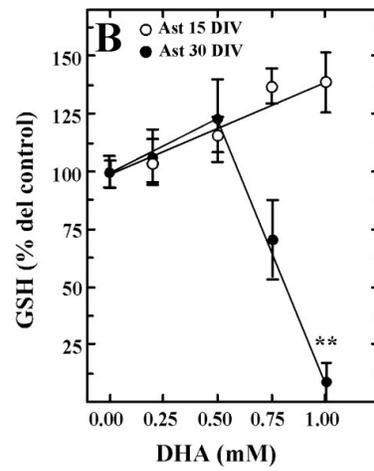
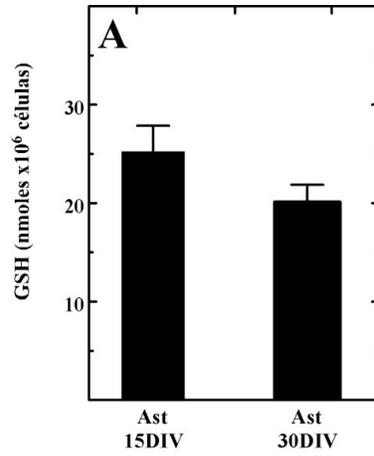
Paralelamente demostramos que AA genera una disminución significativa en los niveles de GSH en astrocitos de 15 DIV, llegando a una disminución máxima del 58-9% con concentraciones iguales o mayores a 0.5 mM de AA (Figura 22, C). En los astrocitos de 30 DIV se observó que bajas concentraciones de AA (0.1-0.5 mM) no generan cambios en los niveles de GSH. Sin embargo, la presencia de AA 1 mM provocó una disminución del 51±8% en los niveles de GSH (Figura 22, C).

Con los resultados anteriores nos propusimos analizar el efecto del tiempo en la acumulación de AA o DHA sobre los niveles de GSH. Al analizar el efecto de DHA 1 mM en astrocitos de 15 DIV, observamos una estimulación de forma tiempo dependiente alcanzando un valor máximo de 54±9% a los 45 min, lo cual se mantiene hasta los 90 min. En los astrocitos de 30 DIV observamos que la presencia de DHA disminuye drásticamente los niveles de GSH alcanzando una baja de un 67±4% luego de 30 min; los bajos niveles de GSH se mantienen hasta los 90 min (Figura 22, D). Por otro lado la presencia de AA 1 mM en astrocitos de 15 DIV provocó una disminución tiempo dependiente en los niveles de GSH alcanzando una inhibición del 53±8% luego de 45 min de incubación, niveles que se mantienen hasta los 90 min. En los astrocitos de 30 DIV se observó que la presencia de AA 1 mM genera una drástica disminución en los niveles de GSH, observando un inhibición del 73±6% luego de 45 min y a un 9±2% luego de 90 min de incubación (Figura 22, E).

Figura 22: Efecto de la acumulación de vitamina C sobre los niveles de GSH en astrocitos de 15 y 30 DIV.

A. Determinación de los niveles basales de GSH en astrocitos de 15 y 30 DIV. **B-C.** Efecto del DHA (B) y AA (C) sobre los niveles de GSH en astrocitos de 15 DIV (○) y 30 DIV (●). En los astrocitos de 15 DIV se observó que a mayor dosis de DHA aumentan los niveles de GSH, aumento que se manifiesta 30 min posterior a la incubación con DHA. **D-E.** Análisis de tiempo de la acumulación de DHA (D) o AA (E) sobre los niveles de GSH en astrocitos de 15 DIV (○) y 30 DIV (●). Los resultados corresponden al promedio \pm DS de tres experimentos realizados por triplicado. Los asteriscos indican qué valores son significativos, mediante análisis estadístico utilizando el Test de Bonferroni (*p, 0,01).





En resumen, integrando los datos presentados en esta sección podemos concluir que la entrada de DHA a los astrocitos de 15 DIV incrementa las concentraciones de GSH, de esta forma, potencia la capacidad reductora de este tipo de astrocitos.

2.3 Efecto de la acumulación de vitamina C intracelular, sobre la utilización de lactato en astrocitos mantenidos en cultivo.

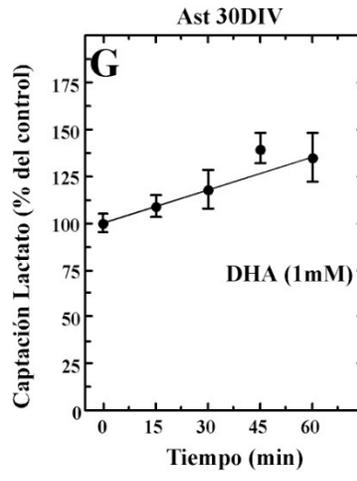
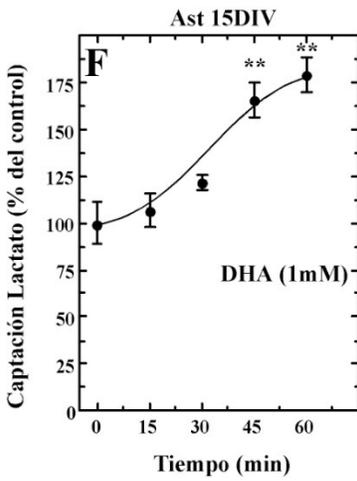
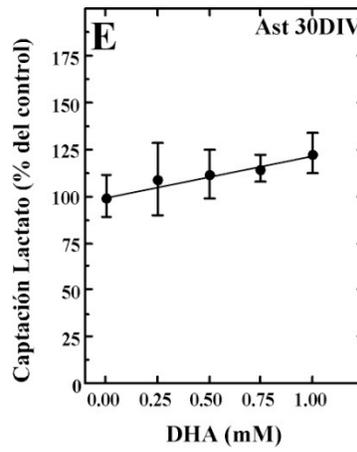
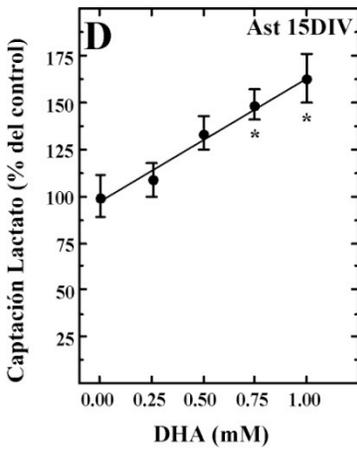
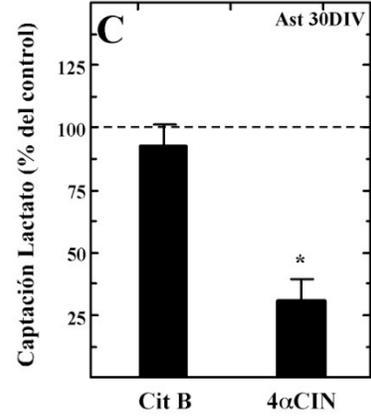
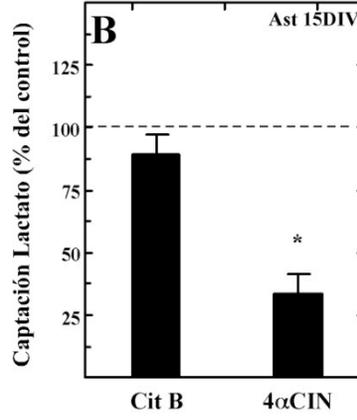
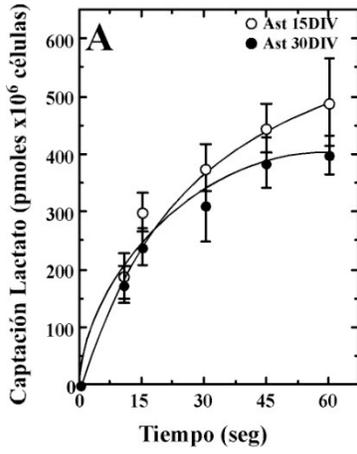
Los resultados sugieren que la acumulación intracelular de DHA en astrocitos afecta la velocidad de consumo de glucosa, lo cual generaría una baja en los niveles de ATP, ya sea por inhibición de la glicólisis o por la estimulación de la vía PPP. Considerando estos resultados nos propusimos analizar si la acumulación de DHA en los astrocitos aumenta la incorporación de otros sustratos metabólicos, como el lactato.

De esta forma analizamos cómo se comporta el transporte de lactato en astrocitos de 15 y 30 DIV, realizando estudios de captación en el tiempo de C¹⁴-lactato 100 μ M. En los astrocitos de 15 DIV se observó que el transporte alcanza 450-50 pmoles $\times 10^6$ células a los 45 seg. En los astrocitos de 30 DIV el transporte se comportó de igual manera, llegando a un máximo de 375-50 pmoles $\times 10^6$ células luego de 45 seg (Figura 23, A).

Figura 23. Curva de progreso y análisis farmacológico de la incorporación de lactato en astrocitos de 15 y 30DIV.

A: Los astrocitos mantenidos en cultivo por 15 DIV (○) y 30 DIV (●) fueron incubados con 100 μM de C^{14} -lactato por diferentes tiempos (0-60 seg) a 22°C. **B-C:** Análisis farmacológico de la captación de lactato, para lo cual los astrocitos de 15 y 30 DIV (C y D, respectivamente) fueron pre-incubadas por 10 min en presencia de citocalasina B (Cit B, 20 μM) o 4 α CIN 100 μM , luego fueron incubadas con C^{14} -lactato 100 μM por 15 seg a temperatura ambiente y se analizó la incorporación de lactato en comparación a la situación control (línea segmentada).

D-E. Efecto de diferentes concentraciones de DHA sobre la incorporación de lactato en astrocitos de 15 (D) y 30 (E) DIV. **F-G.** Efecto del tiempo de incubación de DHA 1 mM sobre la incorporación de lactato en astrocitos de 15 (F) y 30 DIV(G). Los resultados corresponden al promedio \pm DS de tres experimentos realizados por triplicado. Los asteriscos indican qué valores son significativos, mediante análisis estadístico utilizando el Test de Bonferroni (**p, 0,01).



Al realizar análisis de inhibición utilizando 4α CIN (inhibidor de los transportadores de monocarboxilatos), observamos un 55-10% en los astrocitos de 15 DIV y un 70-15% en los astrocitos de 30 DIV (Figura 23, B-C), demostrando la expresión funcional de estos transportadores. Posteriormente, los astrocitos fueron incubados con diferentes concentraciones de DHA por 45 min, luego se realizó transporte de C^{14} -lactato $100 \mu\text{M}$ durante 15 seg, para estar en condición de velocidad inicial. En los astrocitos de 15 DIV se observó que concentraciones crecientes de DHA generan un aumento en la captación de lactato llegando a un máximo del 66-9% a DHA 1 mM (Figura 23, D). En los astrocitos de 30 DIV observamos que la presencia de DHA no afecta el transporte de lactato (Figura 23, E).

Para analizar el efecto del tiempo, las células fueron incubadas a diferentes tiempos con DHA 1 mM y luego se realizó transporte de lactato- C^{14} por 15 seg. En los astrocitos de 15 DIV, se observó un aumento progresivo en la incorporación de lactato, efecto que alcanza un valor máximo de $79\pm 12\%$ a los 60 min (Figura 23, F). En astrocitos de 30 DIV se observó que la presencia de DHA no provoca cambios significativos en la incorporación de lactato (Figura 23, G).

En resumen, DHA estimula la incorporación de lactato en astrocitos de 15DIV, células que presentan una baja glicólisis y un significativo incremento de la vía PPP. En astrocitos de 30DIV no se observa este efecto, siendo concordante con una célula que tiene una activa glicólisis y una baja actividad de la vía PPP.

2.4 Liberación de vitamina C desde astrocitos en cultivo.

Los resultados anteriores sugieren que los astrocitos en cultivo de 15 DIV presentan una gran capacidad para reducir DHA incorporado, generando concentraciones crecientes de AA intracelular. En base al modelo de reciclaje de la vitamina C cerebral es de vital importancia que los astrocitos sean capaces de liberar el AA generado, para poder mantener el balance redox de las neuronas. Como se comentó previamente, existen diversos mecanismos propuestos que explican la liberación de vitamina C (Tabla 1). Sin embargo, hasta la fecha, ningún modelo ha sido completamente demostrado.

Para analizar la liberación de vitamina C desde los astrocitos de 15 y 30 DIV, las células fueron incubadas con DHA 100 μ M, por 10 min. Luego las células fueron lavadas con tampón de incubación e incubadas por 30 min en presencia o ausencia de diferentes agentes farmacológicos. Por último, se determinó la marca radioactiva presente en el medio extracelular. En una primera etapa se analizó el efecto de agentes farmacológicos descritos como inhibidores de la liberación de la vitamina C, tales como DIDS (inhibidor de los canales de aniones orgánicos sensibles a volumen), citocalasina B (inhibidor de los transportadores GLUTs), lantano y octanol (inhibidores de los hemicanales formados por conexina). Luego se analizó el efecto de agentes que se describen como estimuladores de la liberación de vitamina C, tales como glutamato, peróxido de hidrógeno y medio hipotónico (240 mOsm).

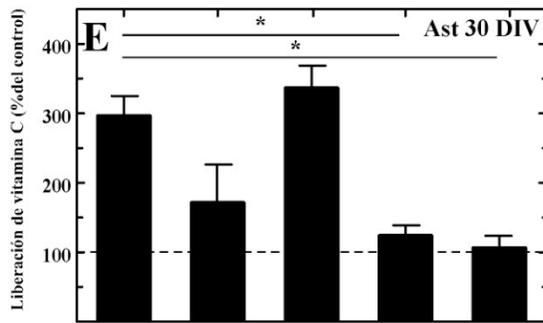
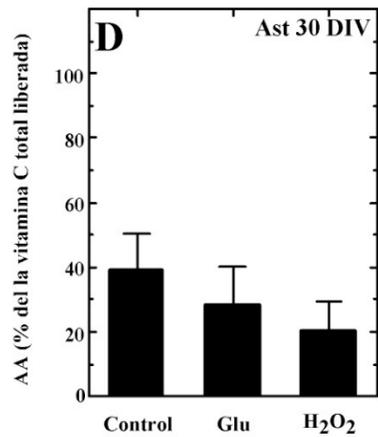
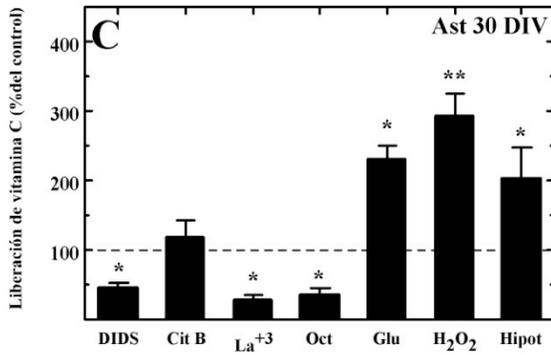
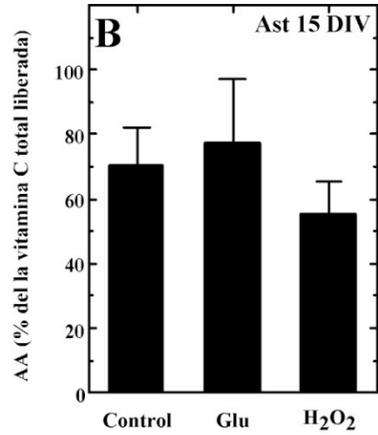
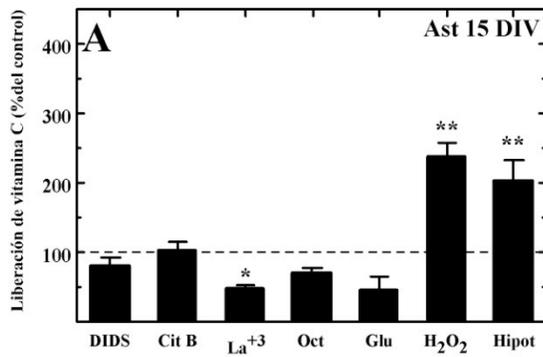
Al analizar la liberación de vitamina C desde astrocitos de 15 DIV se observó que sólo la presencia de La^{+3} 200 μ M fue capaz de inhibir la liberación de vitamina C

en un 54·4%, en comparación a la situación control (línea segmentada, Figura 24, A). Al analizar el efecto de los estimuladores de liberación de vitamina C se observó que la presencia de glutamato 500 μ M no estimula la liberación de vitamina C. Este resultado es opuesto a lo previamente publicado (Wilson et al., 2000; Wilson, 2005). Sin embargo, la presencia de peróxido de hidrógeno 300 μ M genera un fuerte aumento en la liberación de vitamina C alcanzando un aumento de 144·30% en comparación con la condición control. Al incubar los astrocitos en un medio hipotónico (240 mOsm), se observó un aumento en la liberación de vitamina C alcanzando un 90·10% (Figura 24, A). Al analizar la forma redox de la vitamina C liberada mediante HPLC, observamos que en la condición control y en presencia de glutamato o peróxido de hidrogeno, cerca de un 72[±]12% de la vitamina C es liberada como AA (Figura 24, B).

En los astrocitos de 30 DIV se observó que la presencia de DIDS 100 μ M, La⁺³ 100 μ M y octanol 100 μ M fueron capaces de inhibir la liberación de vitamina C en un 53·5%, 74·3% y 61·7%, respectivamente. (Figura 24, C). Al analizar el efecto de los estimuladores, se observó que la presencia de glutamato 500 μ M estimula la liberación de vitamina C alcanzando una estimulación de 130·30%. Similar efecto se observó en presencia de peróxido de hidrógeno y medio hipotónico, donde la estimulación de la liberación alcanzó valores de un 180·10% y

Figura 24: Estudio farmacológico de la liberación de vitamina C desde astrocitos mantenidos en cultivo.

Para analizar la liberación de vitamina C, los astrocitos fueron incubados con DHA 100 μ M marcado radiactivamente, por 10 min. Luego las células fueron lavadas e incubadas por 30 min en tampón de transporte en presencia o ausencia de los diferentes agentes farmacológicos tales como, DIDS 100 μ M, Cit B 20 μ M, La^{+3} 200 μ M, Octanol (Oct) 100 μ M, H_2O_2 300 μ M, medio hipotónico (Hipot) o glutamato (glu) 0.5 mM. **A.** En los astrocitos de 15 DIV solo la presencia de La^{+3} inhibió la liberación de vitamina C. **B.** Análisis de HPLC para la determinar la forma redox de la vitamina C liberada en astrocitos de 15 DIV. **C.** En los astrocitos de 30 DIV se observó que la presencia de Oct, La^{+3} o DIDS fue capaz de inhibir la liberación de vitamina C. Además, se observó que la presencia de H_2O_2 y medio hipotónico estimuló la liberación de vitamina C. **D.** Determinación del estado redox de la vitamina C liberada desde astrocitos de 30 DIV. **E.** Análisis de la liberación de vitamina C inducida por glutamato, para este ensayo las células fueron tratadas en forma simultanea con glutamato y otros agentes farmacológicos tales como Cit B, DIDS, La^{+3} y reemplazando el catión Na^+ por el catión colina. La presencia de La^{+3} y la ausencia de Na^+ fueron las únicas condiciones capaces de inhibir la liberación inducida por glutamato. Los resultados corresponden al promedio \pm DS de tres experimentos realizados por triplicado. Los asteriscos indican qué valores son significativos, mediante análisis estadístico utilizando el Test de Bonferroni (*p, 0,01; **p, 0.005).



Glu	+	+	+	+	+
Cit B	-	+	-	-	-
DIDS	-	-	+	-	-
La ³⁺	-	-	-	+	-
Colina	-	-	-	-	+

107±28% de la vitamina C, respectivamente (Figura 24, C). Al analizar en los astrocitos de 30 DIV la forma redox de la vitamina C liberada observamos que en la condición control cerca de un 38±14% de la vitamina C lo hace como AA, porcentaje que disminuye en presencia de glutamato o H₂O₂ a un 26±13% o un 18±10% respectivamente (Figura 24, D).

Los resultados anteriores sugieren que el efecto de glutamato sobre la liberación de la vitamina C depende del periodo de cultivo de los astrocitos. Con el objetivo de describir cuál es el mecanismo de liberación de vitamina C, estimulado por glutamato, los astrocitos de 30 DIV fueron co-incubados con glutamato y diferentes agentes farmacológicos tales como citocalasina B, DIDS, La⁺³ o colina. Se observó que al co-incubar glutamato con La⁺³ se pierde el efecto estimulador de glutamato alcanzando un nivel de liberación del 108±12%, valor similar a la obtenida en la situación control. Al remplazar el catión Na⁺ por el catión orgánico colina, se observó una pérdida total de la liberación de vitamina C estimulada por glutamato, alcanzando un valor de 104±11%, similar a la condición control (Figura 24, E).

En resumen, podemos concluir que en los astrocitos de 15 DIV, el 80% de la vitamina C liberada se encuentra como AA, siendo este proceso estimulado por condiciones hipotónicas y oxidantes. Sin embargo, este proceso es inhibido por inhibidores de los hemicanales formados por conexina. Los astrocitos de 30 DIV liberan preferentemente DHA (60% del total liberado), proceso estimulado por condiciones hipotónicas y oxidantes. Además, en estas células la liberación de vitamina C fue estimulada por la presencia de glutamato, efecto dependiente de la

presencia de Na^+ e inhibido en presencia de inhibidores de los hemicanales de conexina y por inhibidores de los canales sensibles a volumen.

2.5 Efecto de glutamato sobre el metabolismo redox y energético en astrocitos mantenidos en cultivo.

Considerando los resultados anteriores, podemos concluir que glutamato afecta de manera diferente a los astrocitos de 15 y 30 DIV. Por esta razón analizamos cómo glutamato modula el potencial redox y el metabolismo energético de los astrocitos de 15 y 30 DIV.

Analizamos cómo la presencia de glutamato 1 mM afecta el potencial reductor a los 30 min post incubación con DHA. En los astrocitos de 15 DIV se observó que la presencia de glutamato genera un aumento en los niveles de AA intracelular llegando a un 80-10% del total de DHA incorporado. En los astrocitos de 30 DIV observamos que la presencia de glutamato no provoca cambios en el potencial reductor de los astrocitos a los 30 min (Figura 25, A).

Luego se analizó el efecto de glutamato 1 mM en los niveles de la velocidad glicolítica. En los astrocitos de 15 DIV se observó que la presencia de glutamato genera un aumento del $189 \pm 44\%$ en comparación al control. En los astrocitos de 30 DIV se observó que la presencia de glutamato no afecta la velocidad glicolítica de estas células (Figura 25, B). Posteriormente, se analizó el efecto de glutamato sobre la actividad de la vía PPP, donde se observó que en los astrocitos de 15 DIV esta actividad disminuye en un $54 \pm 8\%$ en comparación a la situación control. Por otro lado, en los astrocitos de 30 DIV la presencia de glutamato no provocó un cambio

significativo en la actividad PPP (Figura 25, C). Por último analizamos el efecto de glutamato 1 mM sobre los niveles de GSH luego de 45 min de incubación. En los astrocitos de 15 DIV se observó que la presencia de glutamato 1 mM disminuye los niveles de GSH en un $72 \pm 12\%$. Por otro lado, en los astrocitos de 30 DIV se observó que glutamato no provoca un cambio significativo en los niveles de GSH (Figura 25, D).

2.6 Resumen del capítulo 2.

En el segundo capítulo de esta tesis hemos observado que los astrocitos de 15 DIV son células con una alta capacidad para reducir el DHA incorporado. Además, son capaces de liberar preferentemente AA al medio extracelular. Los astrocitos de 30 DIV presentan una capacidad inicial para reducir DHA, sin embargo, estas células no pueden mantener en el tiempo esta capacidad reductora, producto de lo cual consumen el GSH y liberan preferentemente DHA al medio extracelular.

En segundo lugar mostramos que la acumulación de DHA en el interior de los astrocitos modula de forma significativa el metabolismo de glucosa y el del GSH. En los astrocitos de 15 DIV observamos que la acumulación de DHA estimula la vía glicolítica y la actividad de la vía de las PPP, lo cual conlleva a un aumento significativo en los niveles de GSH intracelulares. En los astrocitos de 30 DIV, la acumulación de DHA no produce efecto sobre la velocidad glicolítica, pero sí es capaz de inhibir la actividad de la vía PPP, disminuyendo drásticamente los niveles de GSH.

Glutamato potencia la actividad glicolítica y la acumulación de AA en astrocitos de 15 DIV, sin embargo no afecta el eflujo. El eflujo de vitamina C es potenciado por glutamato sólo en astrocitos de 30 DIV, probablemente a través de conexinas y transportadores de glucosa. El medio hipotónico y peróxido de hidrógeno también generan eflujo de vitamina C, que corresponde mayormente a DHA.

En resumen, los astrocitos “normales” de 15 DIV serían recicladores de vitamina C, captando DHA y liberando AA. Sin embargo, los astrocitos de 30DIV, perderían esta capacidad, captando AA y DHA, y liberando preferentemente DHA, estimulados por glutamato.

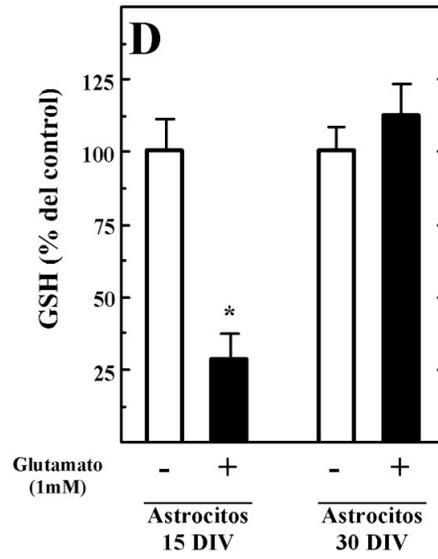
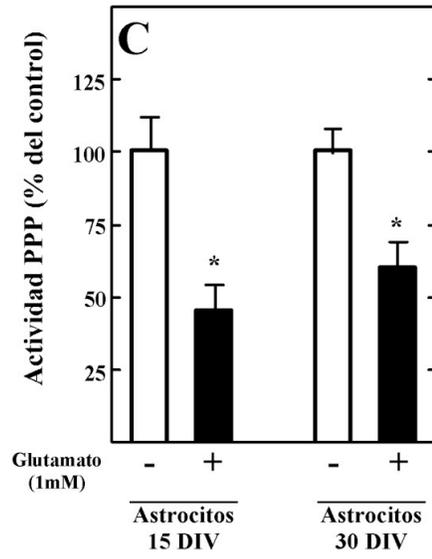
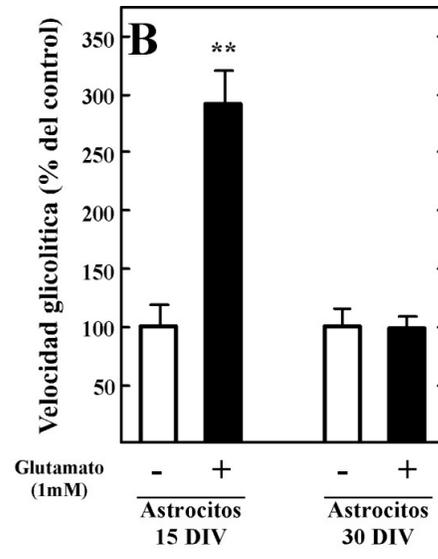
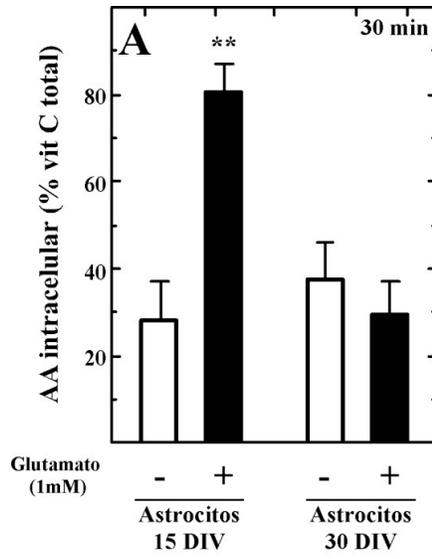


Figura 25: Análisis del efecto de glutamato sobre el potencial reductor y energético de los astrocitos en cultivo.

A. Efecto de glutamato 1 mM sobre la capacidad reductora de astrocitos de 15 y 30 DIV. **B-C.** Análisis del efecto de glutamato sobre la velocidad glicolítica (B) y actividad de la vía PPP (C). Las células fueron incubadas con glutamato 1 mM por 45 min y luego se determinaron los parámetros a analizar. **D.** Efecto de glutamato 1 mM sobre los niveles de GSH intracelular en astrocitos en cultivo.

Los resultados corresponden al promedio \pm DS de 3 experimentos realizados por triplicado. Los asteriscos indican qué valores son significativos, mediante análisis estadístico utilizando el Test de Bonferroni (*p, 0,01).





CAPITULO 3. Estudio de la acumulación de DHA sobre el metabolismo energético y redox de neuronas corticales mantenidas *in vitro*.

La acumulación de DHA impacta de manera significativa el consumo de glucosa y el balance redox de las células. Estos resultados resaltan la importancia que tendría el reciclaje de la vitamina C cerebral en mantener bajos los niveles de DHA y con ello evitar una posible desregulación energética en el cerebro.

En una última etapa nos propusimos analizar el efecto de la acumulación de DHA en neuronas corticales, teniendo en cuenta que las neuronas presentarían un bajo poder reductor debido a su alta tasa metabólica. En estas células se encontrarían favorecidos los procesos de producción y acumulación del DHA.

3.1.- Análisis de la incorporación de 2-DOG, AA y DHA en neuronas corticales mantenidas en cultivo.

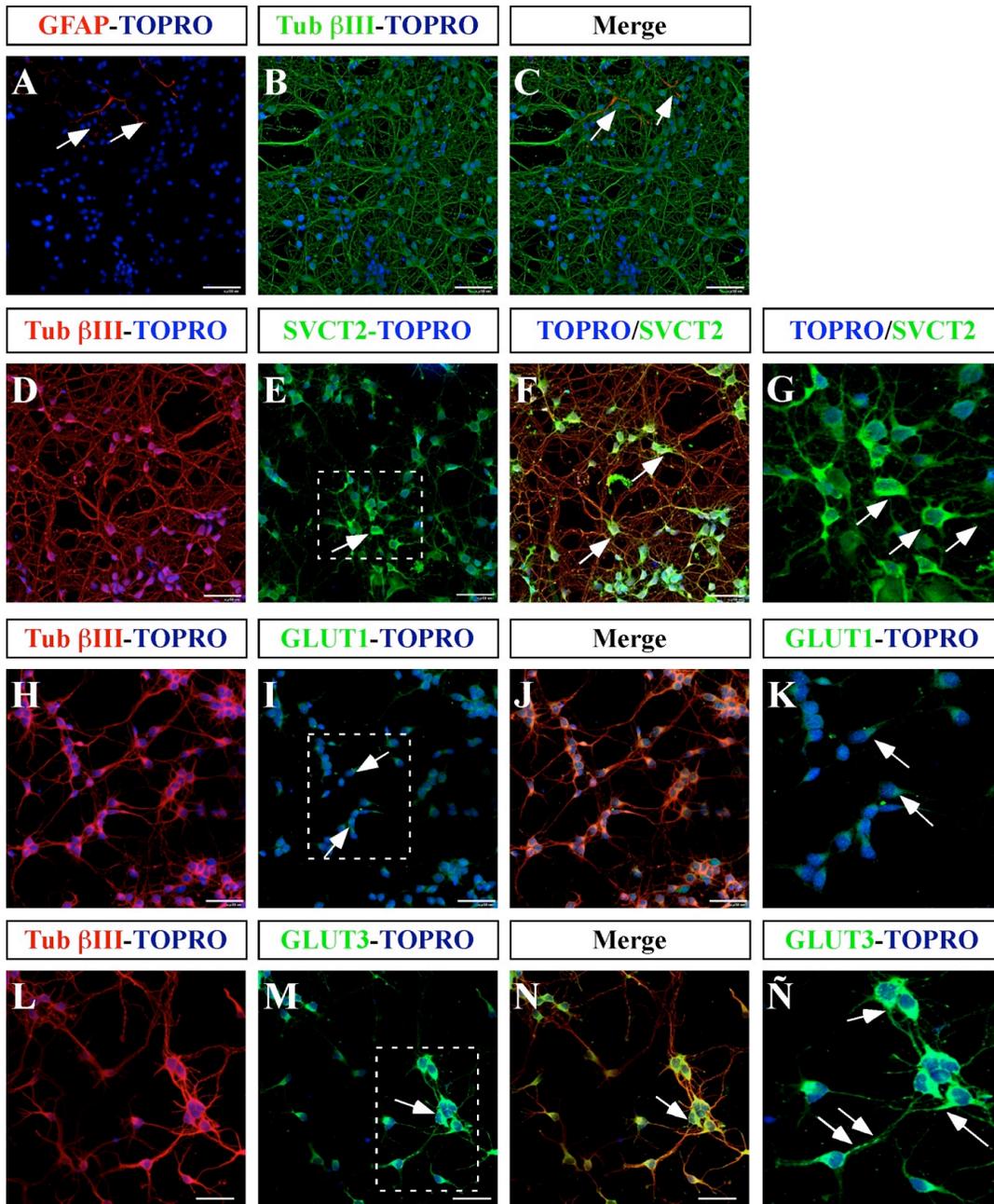
Utilizamos neuronas corticales de rata extraídas de cerebros embrionarios de 17 días de gestación, las cuales fueron mantenidas en cultivo por 5 días. La pureza de los cultivos fue analizada determinando la expresión del marcador neuronal tubulina β III (Tub β III) y del marcador glial, GFAP, el marcador neuronal fue observado en un 99% de las células (Figura 26, B y C), por el contrario al analizar la

Figura 26: Análisis inmunocitoquímico de la expresión de SVCT2, GLUT1 y GLUT3 en cultivos primarios de neuronas de 5 DIV.

Las neuronas extraídas desde la corteza cerebral de ratas de 17 días de gestación fueron cultivadas con Neurobasal/B27 y mantenidas 5 días en cultivo. **A-C.** Caracterización inmunocitoquímica de los cultivos de neuronas de 5 DIV. En verde se muestra la inmunoreacción para el marcador neuronal tubulina β III (B y C) y en azul la tinción de contraste nuclear del marcador TOPRO. **D-G.** Análisis de la expresión del transportador SCVT2. En verde se observa la reacción para SVCT2, en rojo la reacción para tubulina β III y en azul la tinción de contraste nuclear con TOPRO. Se observa una fuerte inmunoreactividad, la cual se concentra en los somas neuronales, (flechas). **H-K.** Análisis de la expresión del transportador GLUT1, en verde. Se observó una débil inmunoreactividad, la cual se concentra en los somas neuronales, flechas. **L-O.** Análisis de la expresión del transportador GLUT3, en verde. Se observó una intensa señal de inmunoreactividad, la cual se concentra en los somas neuronales, (flechas).

Escala 50 μ m.





expresión del marcador glial observamos que sólo el 1% de las células expresa esta proteína (Figura 26, A y C, flechas), estos resultados muestran el alto grado de pureza de los cultivos primarios neuronales.

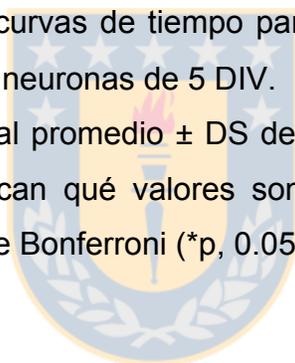
Luego analizamos mediante inmunocitoquímica la expresión de los transportadores GLUT1, GLUT3 y SVCT2. Al analizar la expresión de SVCT2 se observó principalmente en el cuerpo de las neuronas, detectando una débil expresión a nivel de las prolongaciones celulares (Figura 26, D-G, flechas). GLUT1 presentó una señal muy débil, la cual se concentró en el soma de las neuronas (Figura 26, H-K, flechas). Por otro lado, al analizar la expresión del transportador GLUT3, observamos una intensa reacción, la cual se concentró en el soma de la neuronas y en menor grado en las prolongaciones celulares (Figura 26, L-Ñ, flechas). Estos resultados evidencian que las neuronas expresan principalmente el transportador de AA, SVCT2 y el transportador GLUT3.

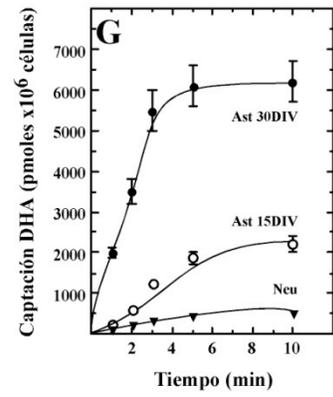
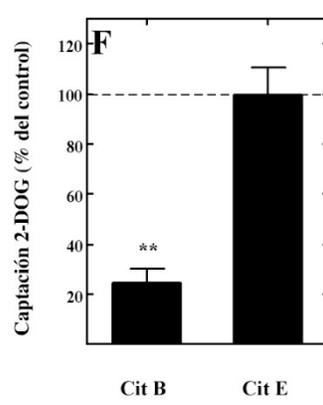
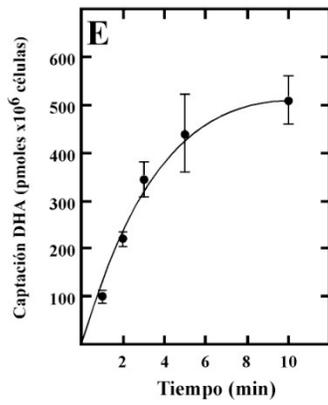
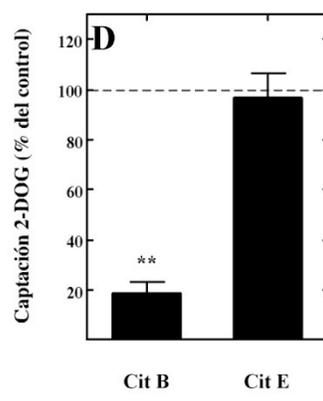
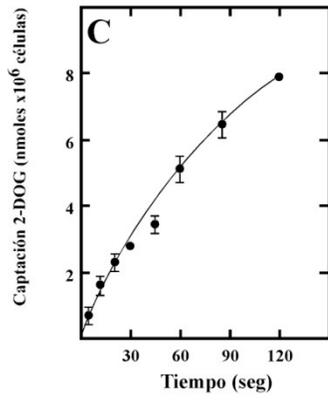
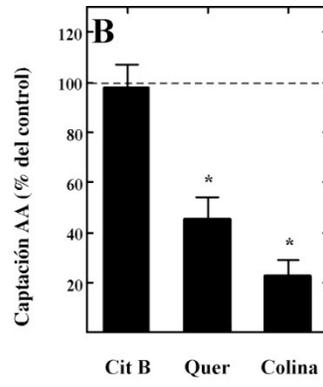
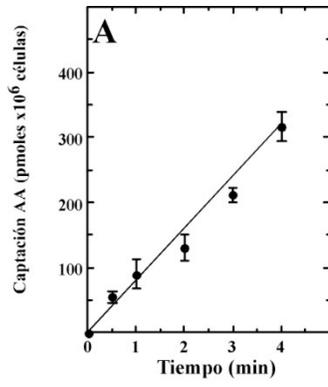
Posteriormente, analizamos la funcionalidad de los transportadores, realizando estudios cinéticos y de inhibición para el transporte de AA, 2-DOG y DHA. Al realizar la curva de progreso para la captación de AA 100 μ M en neuronas de 5 DIV observamos que la captación aumenta de forma tiempo dependiente y de forma lineal hasta los 4 min, observando en este punto una captación de 327 ± 25 pmoles $\times 10^6$ células (Figura 27, A). La captación de AA fue inhibida en un $77 \pm 7\%$ al remplazar el catión Na^+ por colina y en un $57 \pm 11\%$ en presencia del flavonoide

Figura 27. Curva de tiempo y análisis farmacológico de la incorporación de AA, 2-DOG y DHA en neuronas de 5 DIV.

A. Curva de tiempo para la captación de AA 100 μM . **B.** Análisis farmacológico de la captación de AA, para lo cual las neuronas fueron pre-incubadas por 10 min en presencia de citocalasina B (Cit B, 20 μM), quercetina (100 μM) y en ausencia de Na^+ , luego fueron incubadas con AA 100 μM y se analizó la incorporación de 2-DOG en comparación a la situación control (línea segmentada). **C.** Curva de tiempo para la captación de 22-DOG 50 μM . **D.** Análisis farmacológico de la captación de 2-DOG en presencia de citocalasina B (Cit B, 20 μM) y citocalasina E (20 μM). **E.** Curva de tiempo para el transporte de 100 μM DHA. **F.** Análisis farmacológico de la captación de DHA en presencia de citocalasina B (Cit B, 20 μM) y citocalasina E (Cit E, 20 μM). **G:** Comparación de las curvas de tiempo para el transporte de DHA entre los astrocitos de 15 DIV, 30 DIV y neuronas de 5 DIV.

Los resultados corresponden al promedio \pm DS de tres experimentos realizados por triplicado. Los asteriscos indican qué valores son significativos, mediante análisis estadístico utilizando el Test de Bonferroni (*p, 0.05, **p, 0,005).





quercetina 100 μM . Citocalasina B 20 μM no presentó inhibición del transporte, descartando la presencia de DHA (Figura 26, B).

Posteriormente, analizamos la funcionalidad de los transportadores GLUTs. Al realizar la curva de tiempo para la captación de 2-DOG 250 μM observamos que el transporte es lineal hasta los 45 seg alcanzando una captación de 3.88 ± 0.5 nmoles $\times 10^6$ células, transporte que aumenta a 7.93 ± 0.1 nmoles $\times 10^6$ células a los 120 seg (Figura 27, C). Además, observamos que la presencia de citocalasina B 20 μM inhibe en un $83 \pm 5\%$ el transporte de 2-DOG a los 15 seg, no observándose inhibición en presencia de citocalasina E 20 μM (Figura 27, D). Al analizar el transporte de DHA 100 μM definimos que la captación es lineal hasta los 4 min alcanzando una captación de 337 ± 30 pmoles $\times 10^6$ células. El estado de equilibrio se logra luego de los 4 min y se observó un transporte máximo de 489 ± 80 pmoles $\times 10^6$ células (Figura 27, E). El transporte de DHA fue inhibido en un $78 \pm 9\%$ en presencia de citocalasina B 20 μM y la presencia de citocalasina E 20 μM no afectó la incorporación de DHA (Figura 27, F). El transporte de DHA en neuronas es 4 veces menor al observado en los astrocitos de 15 DIV y 12 veces menor al observado en los astrocitos de 30 DIV (Figura 27, G).

3.2 Análisis de la capacidad reductora y de liberación de vitamina C en neuronas corticales de 5 DIV.

Visto que las neuronas presentan una baja capacidad para incorporar DHA, nos propusimos analizar el poder reductor de estas células y el potencial de liberar el

DHA incorporado, ambos fenómenos propuestos en el mecanismo de reciclaje de la vitamina C.

Para determinar el potencial reductor de las neuronas, fueron incubadas en presencia de DHA- C^{14} 100 μ M por 20 min y luego se analizó el AA intracelular por medio de HPLC. Luego de 15 min, observamos que solo un 10% del DHA incorporado se encuentra como AA, porcentaje que alcanza un valor máximo de $34 \pm 6\%$ luego de 45 min, luego la capacidad reductora cae hasta un $18 \pm 5\%$ (Figura 28, A).

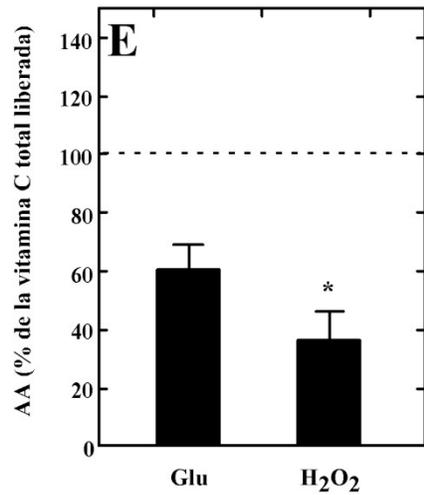
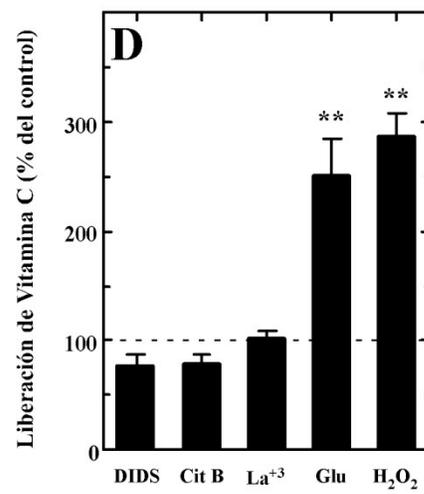
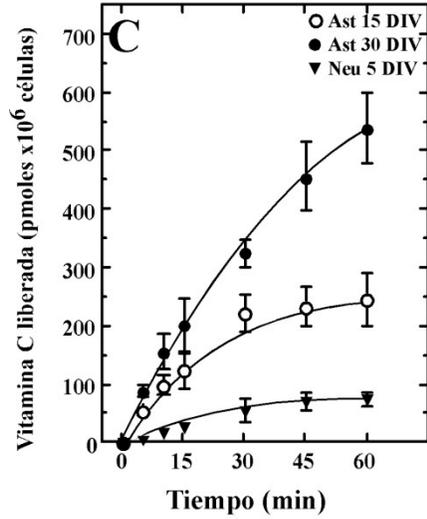
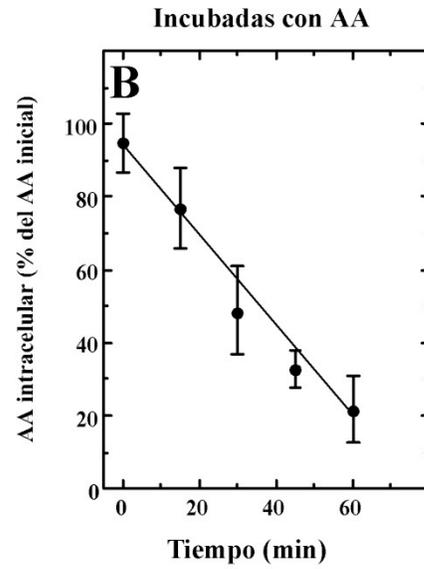
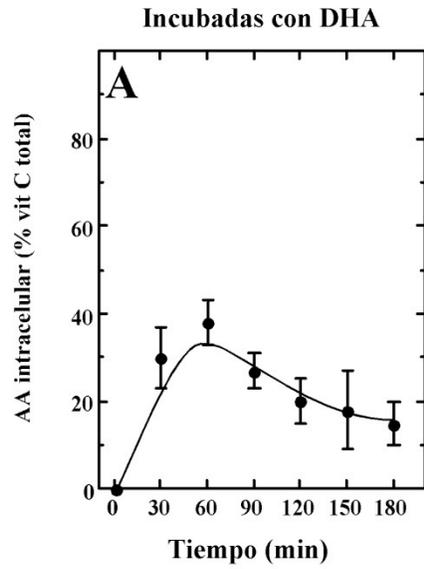
Para analizar la capacidad de las neuronas de mantener el AA incorporado como AA, las células fueron incubadas con 0.5 mM de AA por 10 min y luego se analizó por diferentes tiempos los niveles de AA intracelulares, con la metodología descrita observamos que luego de 30 min un $48 \pm 8\%$ del AA incorporado se encuentra como AA, niveles que disminuyen a los 60 min alcanzando niveles de $22 \pm 6\%$, lo cual indica la rápida oxidación del AA incorporado en neuronas (Figura 28, B). Por lo cual se favorecería la generación de DHA intracelularmente.

Luego analizamos la capacidad de las neuronas para liberar vitamina C, y lo comparamos con astrocitos de 15 y 30 DIV. Observamos que en los 3 modelos celulares la liberación de vitamina C aumenta de forma tiempo dependiente alcanzando un máximo a los 30 min aproximadamente, el cual fue de 325 ± 23 pmoles $\times 10^6$ células en los astrocitos de 30 DIV, 221 ± 33 pmoles $\times 10^6$ células en los astrocitos de 15 DIV y de 53 ± 20 pmoles $\times 10^6$ células en neuronas de 5 DIV (Figura 28, C). Al realizar el análisis farmacológico de la liberación de vitamina C, observamos que ninguno de los agentes utilizados es capaz de inhibir la liberación. Sin embargo, la presencia de glutamato y peróxido de hidrogeno estimulan la liberación de vitamina

Figura 28: Análisis del potencial reductor y de liberación de vitamina C en neuronas corticales.

A. Curva de tiempo de la capacidad reductora de neuronas de 5 DIV, incubadas con DHA 100 μM . **B** Cuantificación de los niveles de AA intracelulares a diferentes tiempos post-incubación con 100 μM AA. **C.** Comparación de la liberación de vitamina C en el tiempo entre astrocitos de 15 DIV, 30 DIV y neuronas de 5 DIV. **D.** Efecto de diferentes moléculas sobre la liberación de vitamina C en neuronas de 5 DIV. Se analizó el efecto de DIDS (100 μM), citocalasina B (20 μM), La^{+3} (100 μM), glutamato (0.5 mM) y H_2O_2 (300 μM). **E.** Utilizando HPLC se analizó la forma redox de la vitamina C liberada por parte de las neuronas de 5 DIV. Los resultados corresponden al promedio \pm DS de 3 experimentos realizados por triplicado. Los asteriscos indican qué valores son significativos, mediante análisis estadístico utilizando el Test de Bonferroni (*p, 0,01; **p, 0.005).





C en un $160 \pm 33\%$ y $180 \pm 13\%$, respectivamente (Figura 28, D). Posteriormente, nos propusimos analizar mediante HPLC la forma redox de la vitamina C liberada por las neuronas. En este análisis observamos que en la situación control el $45 \pm 7\%$ de la vitamina C liberada por las neuronas se encuentra como AA. La presencia de glutamato o peróxido hidrógeno provocan una disminución en el porcentaje de la vitamina C que es liberada como AA, alcanzando niveles de $73 \pm 10\%$ y $82 \pm 6\%$, respectivamente (Figura 28, E). Nuestros resultados permiten concluir que las neuronas liberan fundamentalmente vitamina C a la forma de DHA.

3.3 Efecto de la acumulación de vitamina C sobre la velocidad glicolítica, actividad de la vía PPP y niveles de GSH en neuronas corticales.

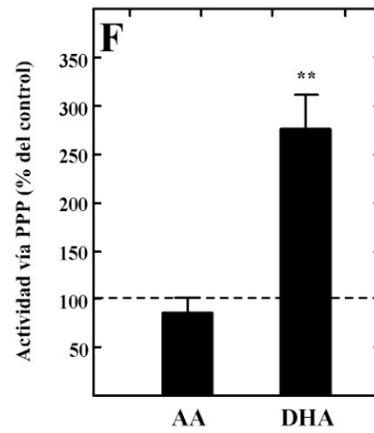
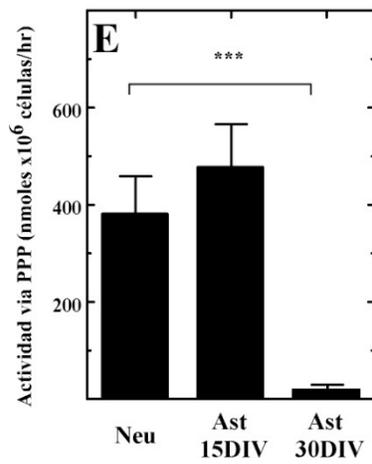
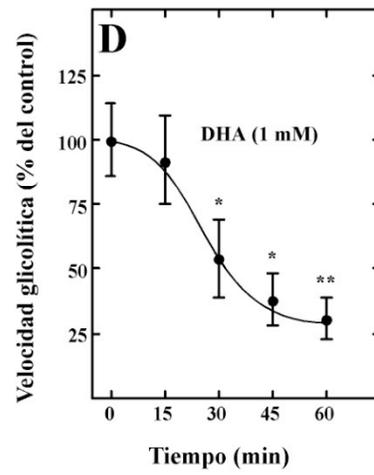
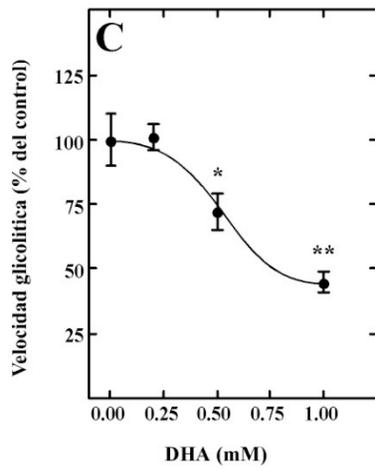
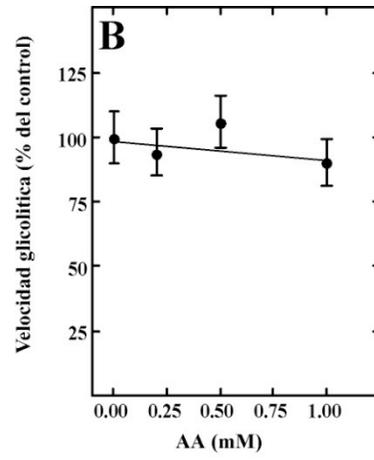
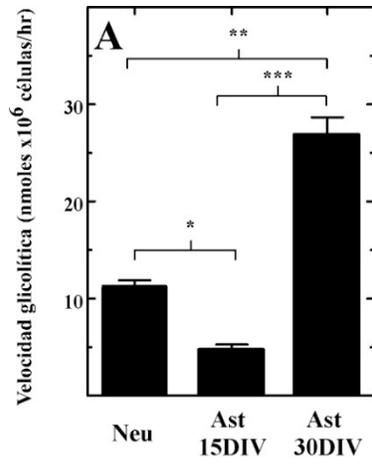
En una primera etapa cuantificamos los niveles basales de la velocidad glicolítica en neuronas, observando que las neuronas presentan una velocidad de 11 ± 1 pmoles $\times 10^6$ células/h, la cual es 2 veces mayor a la observada en astrocitos de 15 DIV y 3 veces menor a la observada en astrocitos de 30 DIV (Figura 29, A).

Luego analizamos el efecto de la acumulación de AA y DHA sobre la velocidad glicolítica, para lo cual las células fueron incubadas por 45 min en presencia de diferentes concentraciones de AA o DHA (0.1-1 mM). Observamos que la presencia de AA no afecta el consumo de glucosa en neuronas (Figura 29, B). Sin embargo, la presencia de DHA provocó una fuerte inhibición de la velocidad glicolítica, la cual fue dosis dependiente. La presencia de 0.5 mM de DHA inhibió en un $25 \pm 4\%$ el consumo de glucosa mientras que la presencia de 1 mM de DHA provocó una inhibición de

Figura 29: Efecto de la acumulación de vitamina C sobre la actividad glicolítica y la actividad de la vía de las pentosas fosfato (PPP) en cultivos neuronales.

A. Análisis de los niveles basales de velocidad glicolítica en neuronas y comparación con lo observado en astrocitos de 15 y 30 DIV. **B-C.** Efecto de diferentes concentraciones de AA (B) o DHA (C) sobre la velocidad glicolítica de neuronas de 5 DIV. **D.** Curso de tiempo del efecto de 1 mM de DHA sobre la velocidad glicolítica de neuronas **E.** Determinación de la actividad basal de la vía PPP en neuronas. **F.** Efecto de la acumulación de DHA o AA sobre la actividad de la vía PPP. Los resultados corresponden al promedio \pm DS de 3 experimentos realizados por triplicado. Los asteriscos indican qué valores son significativos, mediante análisis estadístico utilizando el Test de Bonferroni (*p, 0,01; **p, 0.005; p, 0.001).





56±9% (Figura 29, C). Luego analizamos el efecto del tiempo, utilizando DHA 1mM. Luego de 30 min, la presencia de DHA inhibe en un 46±16% la glicólisis, inhibición que alcanza su valor máximo luego de 60 min con un valor de inhibición de 74±8% (Figura 29, D).

En una segunda etapa analizamos el efecto de la acumulación de vitamina C sobre la actividad de la vía PPP. Al cuantificar la actividad basal observamos que las neuronas presentan una actividad PPP basal de 386±100 nmoles x10⁶ células/h, valor que no se diferencia del observado en los astrocitos de 15 DIV, pero aproximadamente es 20 veces mayor al observado en los astrocitos de 30 DIV (Figura 29, E). Para analizar el efecto de la acumulación de vitamina C, las células fueron incubadas con AA o DHA 1 mM por 45 min, para luego cuantificar la actividad PPP. Con este análisis observamos que la presencia de AA no afecta la actividad de la vía PPP, por el contrario la presencia de DHA 1 mM estimuló en un 156±54% la actividad de la vía PPP en neuronas (Figura 29, F).

Considerando que en astrocitos el DHA es capaz de modular la actividad HK y la actividad G6PDH, nos propusimos analizar si la acumulación de vitamina C afecta la actividad de estas enzimas. La presencia de AA no afecta la actividad enzimática, sin embargo, la presencia de DHA 1 mM inhibió en un 81±9% la actividad HK en neuronas, lo cual explicaría la inhibición de la glicólisis en estas células (Figura 30, A).

Al analizar el efecto de la actividad G6PDH en neuronas observamos que la presencia de DHA incremento la actividad enzimática en un 405±55%, la diferencia del AA que no provoco efecto significativo. Estos resultados concuerdan con el

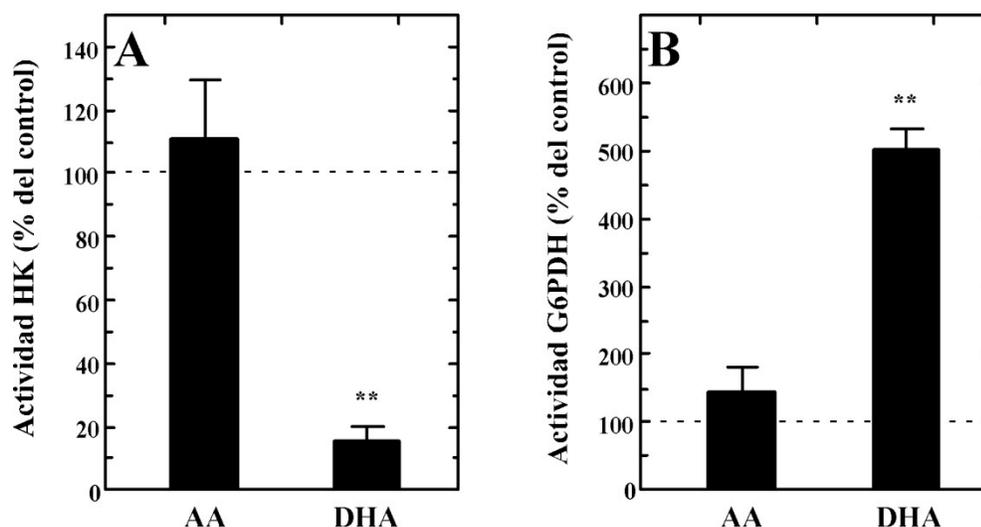


Figura 30: Efecto de la acumulación de AA y DHA sobre la actividad hexoquinasa y G6PDH en neuronas de 5 DIV.

Para determinar la actividad enzimática, las neuronas fueron incubadas previamente con AA o DHA 1 mM por 45 min y luego se extrajo la fracción celular conteniendo la función enzimática. Se analizó la actividad HK (A) y G6PDH (B). Los resultados corresponden al promedio \pm DS de 5 experimentos realizados por triplicado. Los asteriscos indican qué valores son significativos, mediante análisis estadístico utilizando el Test de Bonferroni (*p, 0,01).

incremento observado en la actividad PPP en presencia de DHA 1 mM. (Figura 30, B)

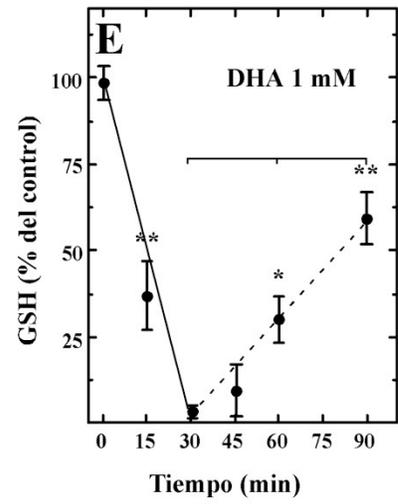
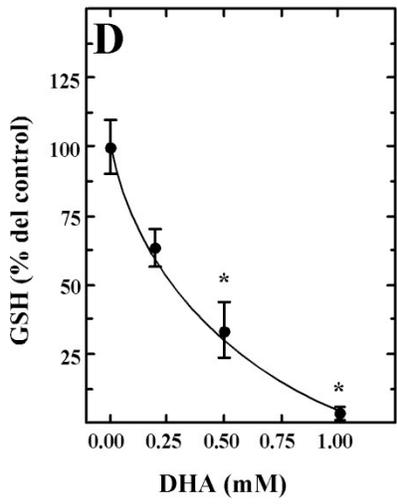
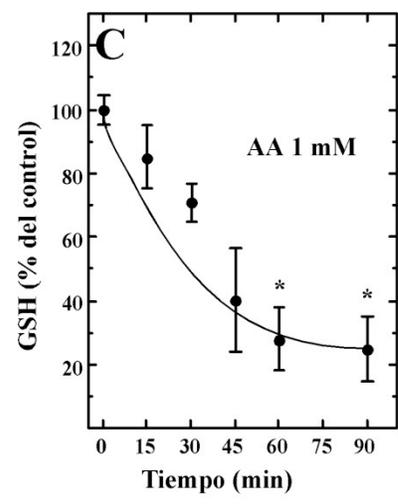
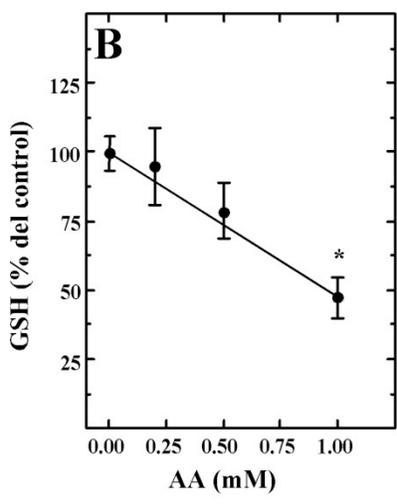
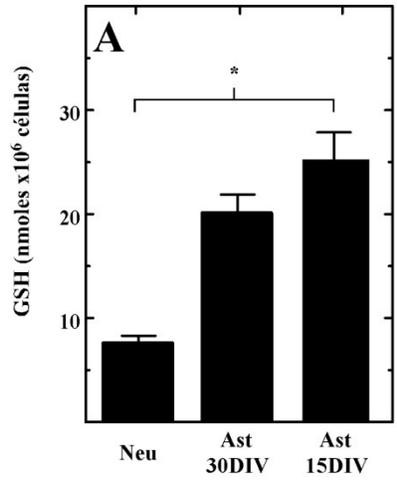
Una vez determinado que la acumulación de la DHA afecta la actividad de la vía PPP, analizamos si este cambio en la actividad afecta de manera directa los niveles de GSH intracelular. Al cuantificar los niveles basales de GSH, observamos que las neuronas presentan 8 ± 1 nmoles $\times 10^6$ células, cantidad 4 veces menor que la encontrada en los astrocitos de 15 DIV y 2 veces menor a la observada en astrocitos de 30 DIV (Figura 31, A). Al analizar el efecto de la acumulación de AA sobre los niveles de GSH, observamos que la presencia de AA provocó una disminución dosis dependiente en los niveles de GSH alcanzando un máximo de inhibición de un $54 \pm 7\%$ en presencia de 1 mM de AA (Figura 31, B). Al analizar el efecto del tiempo de incubación con AA, observamos que la inhibición es tiempo dependiente alcanzando valores máximos luego de 60 min en presencia de AA, donde los niveles de GSH intracelular disminuyen un $80 \pm 9\%$ (Figura 31, C).

Al analizar el efecto de la acumulación de DHA observamos que la presencia de DHA provocó una baja en los niveles de GSH de forma dosis dependiente alcanzando una disminución máxima del 97 ± 1 en presencia de DHA 1 mM por 45 min (Figura 31, D). Al analizar el efecto de la acumulación de DHA 1 mM por diferentes tiempos, observamos que en una etapa inicial la presencia de DHA provoca una baja en los niveles de GSH del $98 \pm 4\%$. Sin embargo, esta tendencia solo es observada hasta los 30 min, ya que luego se observó una recuperación en los niveles de GSH, logrando restablecer un $57 \pm 9\%$ de los niveles a los 90 min (Figura 31, E).

Figura 31: Efecto de la acumulación de vitamina C sobre los niveles de GSH en neuronas de 5 DIV.

Para cuantificar los niveles de GSH los astrocitos de 15 y 30 DIV fueron incubados con diferentes concentraciones de AA o DHA (0-1 mM) por diferentes tiempos, luego se cuantificaron los niveles de GSH. **A.** Determinación de los niveles basales de GSH en neuronas y astrocitos de 15 y 30 DIV. **B-C.** Efecto de la dosis (B) y tiempo de incubación (C) de AA sobre los niveles de GSH en neuronas. **D-E.** Efecto de la dosis (D) y tiempo de incubación (E) de DHA sobre los niveles de GSH en neuronas. Los resultados corresponden al promedio \pm DS de tres experimentos realizados por triplicado. Los asteriscos indican qué valores son significativos, mediante análisis estadístico utilizando el Test de Bonferroni (*p, 0,01).





3.4 Efecto de la acumulación de vitamina C en la incorporación de lactato en neuronas corticales.

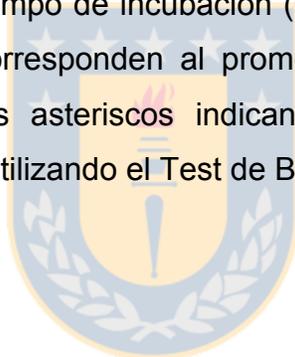
Considerando que la acumulación de DHA inhibe drásticamente la vía glicolítica en neuronas y recordando que las neuronas presentan una alta dependencia energética por la glucosa, nos propusimos analizar, si la acumulación de DHA estimula la captación de lactato.

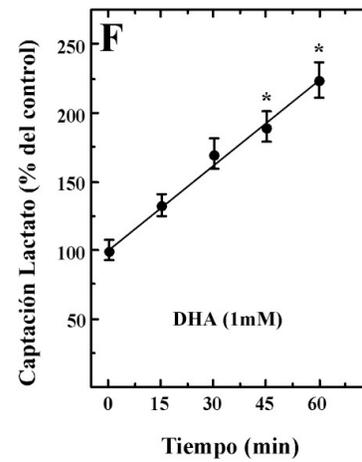
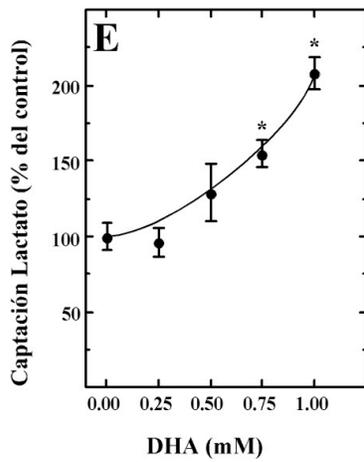
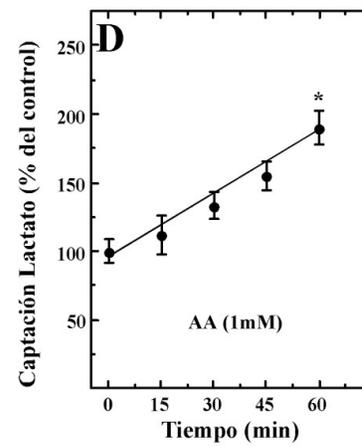
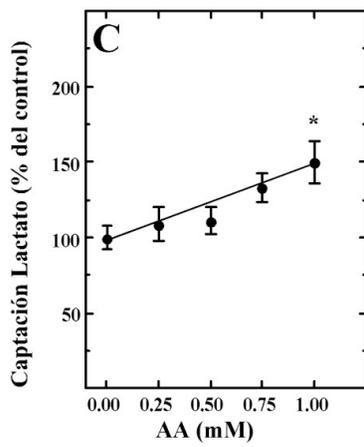
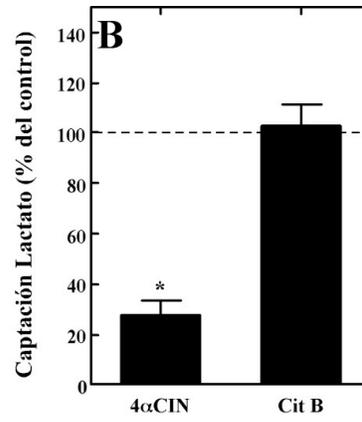
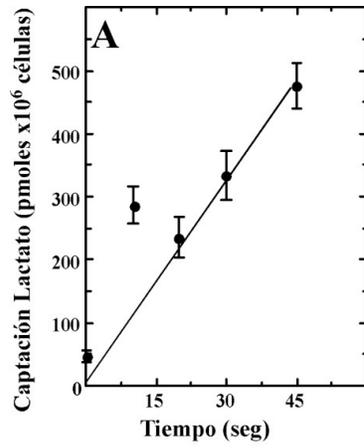
Para analizar el efecto de la acumulación de vitamina C sobre el transporte de lactato en neuronas, en primer lugar realizamos una curva de progreso para determinar la condición de velocidad inicial. Con este análisis observamos que el transporte de lactato es lineal hasta los 45 seg presentando una captación máxima de 492 ± 35 pmoles $\times 10^6$ células. El transporte fue inhibido en un $67 \pm 9\%$ en presencia de 4α CIN y no se observó inhibición en presencia de citocalasina B (Figura 32, A-B). Al analizar el efecto de la dosis de AA, observamos que AA provoca un aumento en el transporte de lactato de manera dosis dependiente alcanzando una estimulación máxima de un $50 \pm 9\%$, luego de 45 min de incubación con AA 1 mM (Figura 32, C). Al analizar el efecto del tiempo de incubación, observamos que el transporte de lactato incrementa al aumentar el tiempo de incubación con AA 1 mM, alcanzando una estimulación máxima de un $98 \pm 19\%$ luego de 60 min (Figura 32, D).

Al incubar las neuronas con DHA a diferentes concentraciones por 45 min, observamos un incremento en el transporte de lactato de manera dosis dependiente alcanzando un aumento del $108 \pm 11\%$ en presencia de DHA 1 mM (Figura 32, E).

Figura 32. Curva de progreso y análisis farmacológico de la incorporación de lactato en astrocitos de 15 y 30DIV.

A: Las neuronas en cultivo fueron incubados con lactato- C^{14} 100 μ M por diferentes tiempos (0-45 seg) a 22°C. **B:** Análisis farmacológico de la captación de lactato, las neuronas fueron pre-incubadas por 10 min en presencia de citocalasina B (Cit B, 20 μ M) y 4 α CIN 100 μ M, luego fueron incubadas con lactato- C^{14} 100 μ M por 15 seg a temperatura ambiente. Para analizar el efecto de la acumulación de vitamina C sobre la incorporación de lactato, las células fueron incubadas con AA o DHA a diferentes concentraciones (0-1 mM) y diferentes tiempos (0-60 min), luego se realizó la incorporación de lactato- C^{14} 100 μ M por 15 seg. **C-D.** Análisis del efecto de la dosis (C) y tiempo de incubación (D) de AA sobre la incorporación de lactato. **E-F.** Análisis del efecto de la dosis (E) y tiempo de incubación (F) de DHA sobre la incorporación de lactato. Los resultados corresponden al promedio \pm DS de tres experimentos realizados por triplicado. Los asteriscos indican qué valores son significativos, mediante análisis estadístico utilizando el Test de Bonferroni (**p, 0,005).





Al analizar el efecto del tiempo de incubación, observamos que la presencia de DHA 1 mM es capaz de estimular la captación de lactato de forma tiempo dependiente alcanzando una estimulación máxima de $118\pm 11\%$ luego de 60 min de incubación con DHA 1 mM (Figura 32, F).

En resumen, DHA inhibe fuertemente la glicólisis en neuronas, pero es capaz de estimular la incorporación de lactato, eventualmente como un metabolito alternativo.

3.5 Efecto de glutamato sobre el metabolismo de la vitamina C y de glucosa en neuronas.

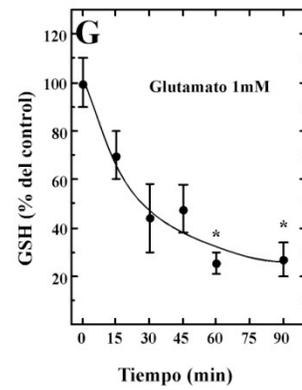
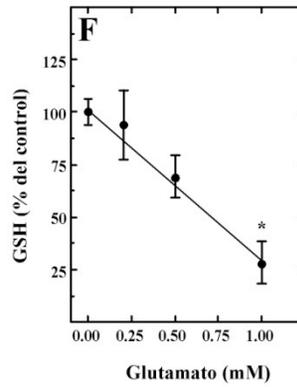
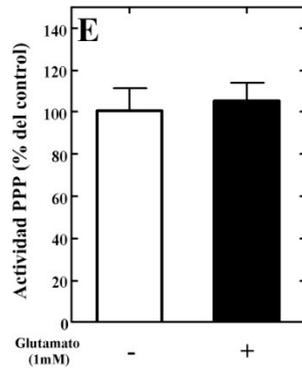
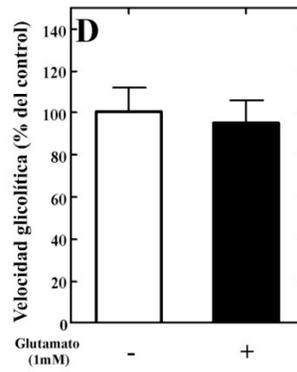
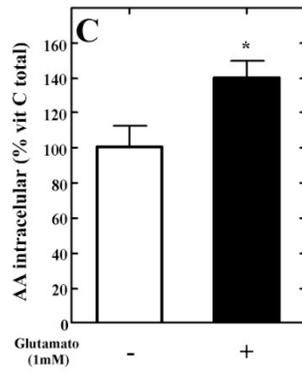
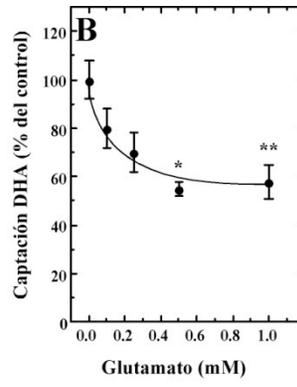
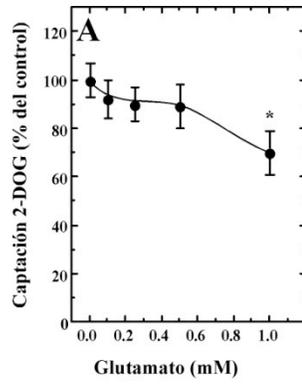
Los resultados anteriores muestran el importante efecto que presenta la vitamina C sobre el metabolismo neuronal, considerando que los niveles de vitamina C extracelular, principalmente DHA, aumentan en la transmisión glutamatérgica, nos propusimos analizar el efecto de glutamato sobre el metabolismo neuronal.

En una primera etapa analizamos cómo la presencia de glutamato afecta el transporte de 2-DOG y DHA. Para estos estudios las células fueron incubadas con diferentes concentraciones de glutamato (0-1 mM) por 10 min y luego se determinó el transporte de 2-DOG o DHA a los 15 seg. La presencia de glutamato a bajas concentraciones (<1 mM) no afecta el transporte de 2-DOG. Sin embargo, en presencia de glutamato 1mM, observamos una disminución del $27\pm 12\%$ en el transporte de 2-DOG (Figura 33, A). Por otro lado la presencia de glutamato provocó una baja en la captación de DHA, de forma dosis dependiente, alcanzando una disminución máxima del $39\pm 8\%$ con 1 mM de glutamato (Figura 33, B).

Figura 33: Análisis del efecto de glutamato sobre la captación de 2-DOG y DHA y sobre el metabolismo redox y energético neuronal.

A-B. Las neuronas fueron pre-incubadas con diferentes concentraciones de glutamato (glu) por 10 min. Luego se analizó la captación de 2-DOG 100 μ M (A) y DHA 100 μ M (B) por 15 seg. **C.** Para analizar el efecto de glutamato sobre el potencial reductor de las neuronas, las células fueron incubadas con DHA 100 μ M y glutamato 0.5 mM por 20 min. Luego las células fueron lavadas y se analizó a los 30 min el porcentaje de AA intracelular. **D-E.** Análisis del efecto de glutamato sobre la velocidad glicolítica (D) y actividad de la vía PPP (E). Las células fueron incubadas con glutamato 1 mM por 45 min y luego se determinaron los parámetros a analizar. **F.** Efecto de glutamato 1 mM sobre los niveles de GSH intracelular en astrocitos en cultivo. Los resultados corresponden al promedio \pm DS de 3 experimentos realizados por triplicado. Los asteriscos indican qué valores son significativos, mediante análisis estadístico utilizando el Test de Bonferroni (*p, 0,01).





Luego analizamos si la presencia de glutamato 1 mM afecta la capacidad de las neuronas para reducir el DHA incorporado, al realizar este análisis observamos que la presencia de glutamato 1 mM estimula en un $37\pm 9\%$ el potencial reductor de las neuronas (Figura 33, C).

Posteriormente, analizamos si la presencia de glutamato 1 mM es capaz de modular la velocidad glicolítica o la actividad de la vía PPP. La presencia de glutamato no provocó cambios en la velocidad glicolítica en comparación al control (Figura 33, D). Similar resultado se observó en la actividad de la vía PPP, donde glutamato no provocó efecto en dicha vía metabólica (Figura 33, E).

Por último analizamos el efecto de glutamato sobre los niveles de GSH intracelulares y pese a que glutamato no afecta la vía PPP, observamos que la presencia de glutamato 1 mM provocó una disminución del $77\pm 11\%$ en los niveles de GSH (Figura 32, F), efecto que fue dependiente del tiempo de incubación de glutamato (Figura 32, G)

3.6 Resumen del capítulo 3.

Los resultados descritos en el presente capítulo apoyan el rol de la vitamina C, principalmente del DHA, como un potente regulador metabólico en neuronas. DHA generó un potente efecto inhibitorio de la glicólisis. Además, se observó que la acumulación de DHA provoca una desregulación en el metabolismo energético y redox de las neuronas, lo cual apoya la importancia del reciclaje de la vitamina C y el vital rol de los astrocitos incorporando DHA, para evitar la acumulación de DHA en neuronas.

VI.- DISCUSIÓN

En el cerebro, la vitamina C cumple importantes funciones como antioxidante, debido a que este órgano presenta bajos niveles de enzimas antioxidantes y un elevado metabolismo oxidativo (May et al., 1996; Dringen, 2000b, a; Dringen et al., 2000; Rice, 2000). La vitamina C es concentrada en el cerebro debido a su constante reciclamiento entre el astrocito y la neurona. La neurona sería una célula productora de DHA, y el astrocito estaría encargado de incorporar y reducir el DHA presente en el espacio extracelular (Siesjo, 1978a; May et al., 1996; Rice, 2000; Hediger, 2002).

La mayoría de los estudios relacionados con la vitamina C estudian su forma redox predominante, el AA; su forma oxidada (DHA) sólo representa un 5% de la vitamina C total presente en el organismo (Wilson, 2002, 2005). Sin embargo, los niveles de DHA aumentan tras la acción antioxidante de la vitamina C, la génesis de DHA sería de manera proporcional al consumo de AA. Aun cuando se considera que la vitamina C es principalmente un agente antioxidante, estudios *in vitro* realizados en hepatocitos, han demostrado que el DHA es capaz de inhibir de forma irreversible a la enzima hexoquinasa (HK), de forma redox independiente (Fiorani et al., 1996; Fiorani et al., 1997; Fiorani et al., 1998; Fiorani et al., 2000). La HK es el primer punto de control del metabolismo de la glucosa, por lo cual la acumulación de DHA podría afectar directamente el metabolismo energético de las células cerebrales, aspecto que fue abordado por primera vez en el presente trabajo de tesis.

6.1.- Modelo propuesto para explicar la expresión y función de los transportadores de vitamina C - glucosa y el efecto de DHA.

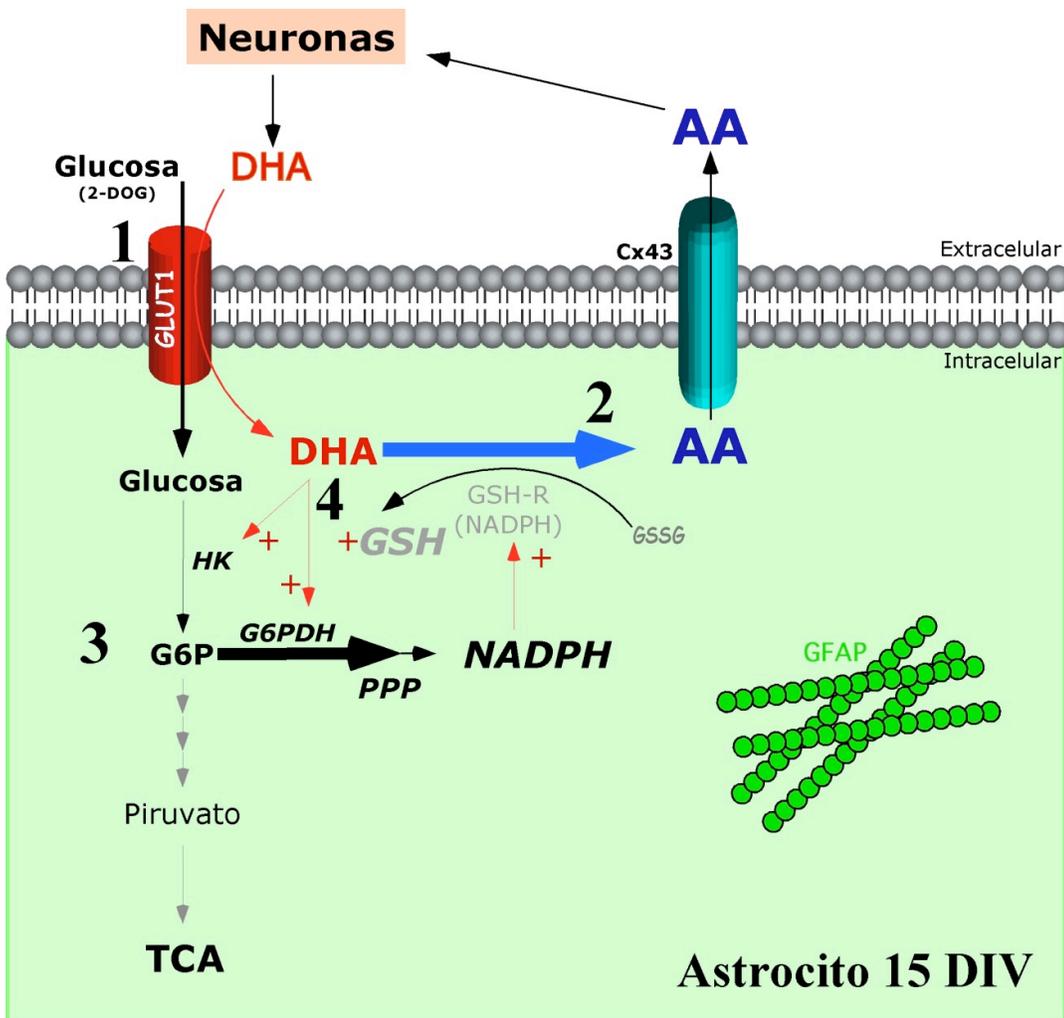
Debido a que esta tesis integra un conjunto complejo de resultados, hemos incorporado directamente una propuesta (Figura 34 y 35) al comienzo de la discusión. Estas figuras pueden ser utilizada como guía, durante el análisis crítico de nuestros resultados y conclusiones.

Los astrocitos de 15 DIV serían células con una elevada capacidad para reducir DHA y liberar AA. Estos procesos estarían favorecidos por el bajo metabolismo oxidativo, producto de la baja actividad de la vía glicolítica y por la elevada actividad de la vía PPP, lo cual entregaría a estas células la capacidad de reciclar eficientemente el GSH. Esta molécula sería la encargada de reducir el DHA intracelular. La presencia de DHA potenciaría la acción reductora de estas células aumentando la actividad de la vía PPP y estimulando la actividad de la enzima *G6PDH*, efectos que en su conjunto potenciarían la capacidad de reciclar el GSH. La acumulación de DHA en astrocitos de 15 DIV también estimularía la obtención de ATP en estas células, incrementando la glicólisis y la incorporación de lactato (Figura 34). Los astrocitos de 30 DIV representarían a astrocitos reactivos, propios de una condición de injuria cerebral. Estos astrocitos se caracterizarían por presentar un elevado flujo glicolítico y una baja actividad de la vía PPP, lo cual aumentaría la sensibilidad de estas células al estrés oxidativo.

Figura 34: Modelo propuesto para el metabolismo energético/redox en astrocitos de 15 DIV.

Los astrocitos de 15 DIV expresan preferentemente el transportador GLUT1 a través del cual incorporan glucosa y DHA (procesos señalados en el punto 1). El DHA incorporado por estas células sería reducido, posiblemente por un mecanismo dependiente de GSH, a AA, el cual puede ser acumulado intracelularmente o liberado al espacio extracelular, para poder mantener el balance redox global del medio extracelular (procesos señalados en el punto 2). Los astrocitos incorporarían glucosa a través de GLUT1, molécula que es metabolizada principalmente por la vía PPP. La baja actividad glicolítica y la alta actividad de la vía PPP, potenciaría la capacidad de estas células para reciclar eficientemente el GSH y posteriormente el DHA (procesos señalados en el punto 3). Por último la acumulación de DHA intracelular potencia el rol reductor de los astrocitos ya que es capaz de estimular la actividad de la vía PPP y producir con ello un aumento en el reciclaje de GSH (procesos señalados en el punto 4).





La acumulación de DHA favorecería aún mas la sensibilidad al estrés oxidativo, inhibiendo la actividad de la vía PPP y la reducción eficientemente de GSH, lo cual disminuiría directamente la capacidad de estas células para reciclar el DHA. Los astrocitos reactivos, en respuesta al estrés oxidativo inducirían la expresión del transportador SVCT2, el cual les permitiría incorporar AA y utilizar esta molécula como agente antioxidante (Figura 35).

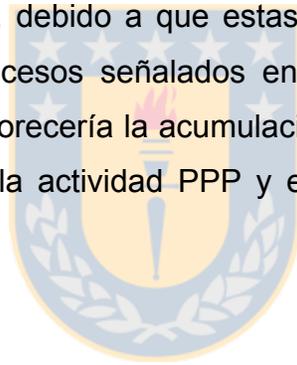
6.2.- El periodo de cultivo de los astrocitos incrementa la captación de DHA y no la captación de 2-DOG.

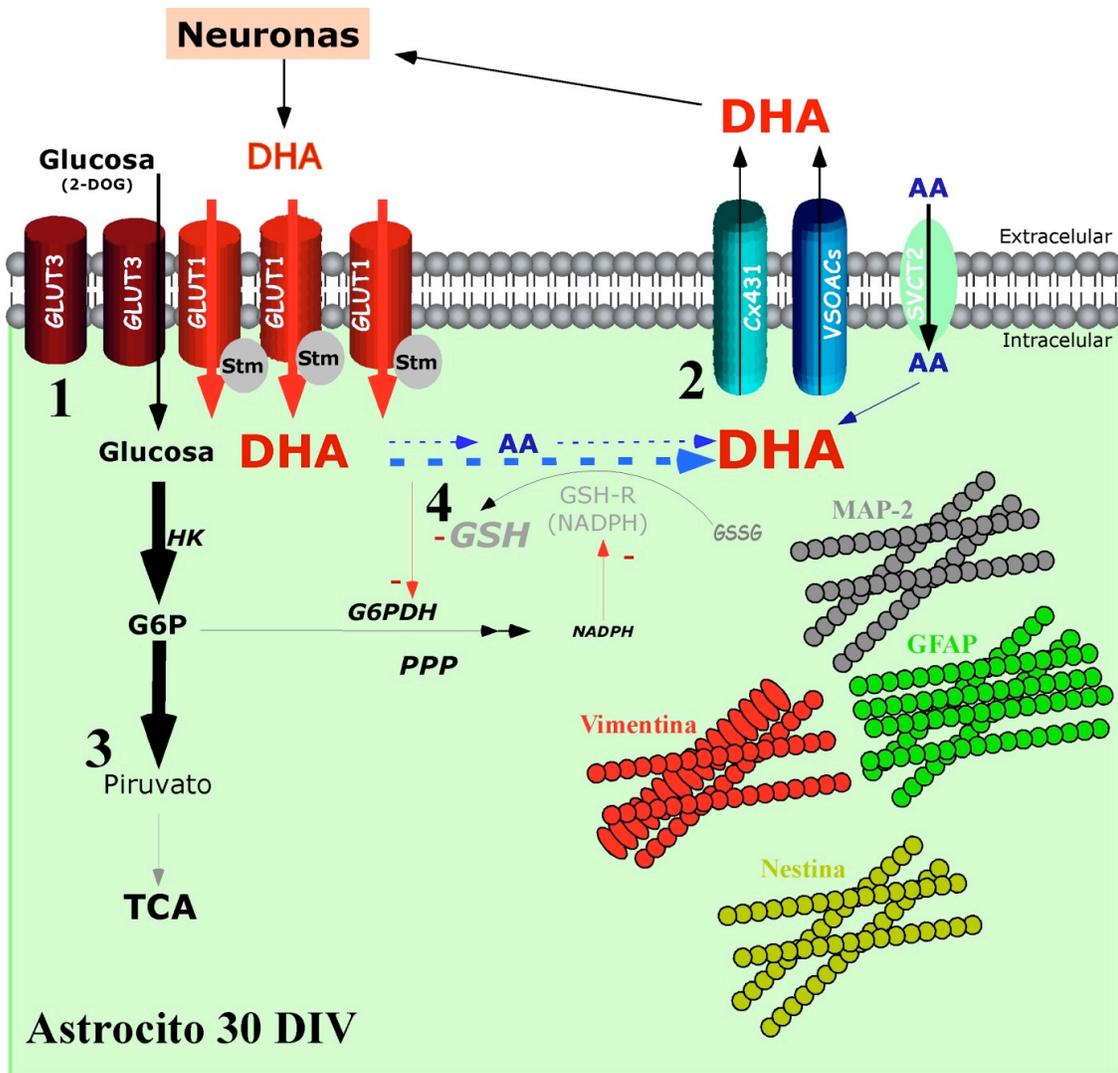
Como se indica en las figuras 34 y 35 (punto 1), los astrocitos modifican sus capacidades de transporte en función del tiempo de cultivo.

Diferentes estudios han demostrado que los astrocitos *in vivo* no expresan el transportador de AA, SVCT2, el cual es inducido en cultivo y en condiciones de reperusión e isquémica (Berger and Hediger, 2000). En base a estos antecedentes es aceptado que los astrocitos *in vivo* solo podrían incorporar la forma oxidada de la vitamina C, DHA (Hediger, 2002). Sin embargo esta afirmación sería valida para los astrocitos de 15 DIV, según lo planteado en el punto 1 de nuestro modelo. Los resultados contradictorios observados en la literatura en relación a la vitamina C y su reciclamiento en astrocitos podría ser explicado considerando la diferencia en los métodos de cultivo primario (Wilson and Dixon, 1989; Daskalopoulos et al., 2002; Korcok et al., 2002; Korcok et al., 2003; Kim et al., 2008).

Figura 35: Modelo propuesto para el metabolismo energético/redox en astrocitos de 30 DIV.

Los astrocitos de 30 DIV inducen la expresión de los marcadores de activación glial: Nestina, Vimentina y MAP-2. También, incrementan la expresión del transportador GLUT1, GLUT3 y SVCT2. Aumentan la captación de DHA y no la captación de 2-DOG (procesos señalados en el punto 1). Estas células tendrían la capacidad inicial para reducir DHA, sin embargo, esta propiedad se perdería con el tiempo debido a los altos niveles de DHA incorporado y a los bajos niveles de GSH (procesos señalados en el punto 2). Los astrocitos de 30 DIV no incrementan la captación de glucosa, molécula que a diferencia de los astrocitos de 15 DIV es metabolizada preferentemente por glicólisis, debido a que estas células presentan una muy baja actividad de la vía PPP (procesos señalados en el punto 3). La baja capacidad reductora de estas células favorecería la acumulación de altas dosis de DHA, lo cual provocaría una inhibición en la actividad PPP y en el reciclaje de GSH (procesos señalados en el punto 4).





Considerando estos antecedentes nos propusimos analizar por primera vez cómo el periodo de cultivo afecta el comportamiento de los astrocitos frente a la vitamina C, para lo cual se utilizaron astrocitos mantenidos en cultivo por 15 DIV y 30 DIV.

El DHA es incorporado a los astrocitos a través del transportador GLUT1 (Siushansian and Wilson, 1995; Siushansian et al., 1997; Korcok et al., 2003; Nualart et al., 2003) y nuestros resultados de PCR convencional y cuantitativo, *Western blot* e Inmunocitoquímica confirman la expresión de este transportador en los astrocitos. Además, los resultados muestran que la expresión de GLUT1 incrementa al aumentar el periodo de cultivo de los astrocitos. En base a estos resultados proponemos que la captación de 2-DOG y DHA serían afectadas por el periodo de cultivo. Al realizar estudios cinéticos para la captación de 2-DOG demostramos que los astrocitos de 15 y 30 DIV se comportan de manera similar en la incorporación de 2-DOG, mostrando valores similares de K_m , V_{max} , respuesta farmacológica a citocalasina B y curva de progreso del transporte. Estos resultados, fueron contrarios a nuestro planteamiento inicial, pues, esperábamos observar un aumento en la captación de 2-DOG en los astrocitos de 30 DIV, producto del aumento de expresión de GLUT1.

Al analizar el transporte de DHA, observamos que los astrocitos de 30 DIV incorporan 3 veces más DHA que los astrocitos de 15 DIV, lo cual fue un resultado inesperado, considerando que no observamos cambios en los niveles de incorporación de 2-DOG. En la literatura sólo existe un trabajo que describe un efecto similar, donde se observó que durante el desarrollo de los eritroblastos humanos

aumenta la expresión del transportador GLUT1, aumentando con ello sólo el transporte de DHA y no el transporte de 2-DOG. Los autores del trabajo atribuyen este efecto a la presencia de una proteína intracelular denominada estomatina, la cual interaccionaría directamente con el GLUT1 provocando un cambio en la afinidad del transportador, aumentando la afinidad por DHA y provocando una disminución en la afinidad por 2-DOG (Mintun et al., 2004; Montel-Hagen et al., 2008). En resultados preliminares (Anexo 1), hemos realizado estudios de RT-PCR para el mensajero de estomatina, detectando la expresión del mensajero sólo en los astrocitos de 30 DIV. Sería posible postular que los astrocitos inducirían la expresión de la proteína estomatina, la cual interaccionaría con el transportador GLUT1 incrementando la afinidad del transportador por DHA. Sin embargo, para definir el mecanismo propuesto es fundamental realizar nuevas aproximaciones experimentales.

Una alternativa complementaria, para explicar el aumento en la captación de DHA, es la inducción de otra isoforma de GLUTs, que tenga mayor afinidad por DHA que por 2-DOG. El transportador GLUT3, se describe en neuronas y no en astrocitos normales. Sin embargo, algunos estudios han demostrado que los astrocitos en cultivo e *in situ*, al ser sometidos a condiciones de estrés (presencia de LPS o condición de isquemia-reperfusión) inducen la expresión del transportador GLUT3 (Cidad et al., 2001; Iwabuchi and Kawahara, 2011b). De esta forma mediante inmunocitoquímica, RT-PCR convencional/cuantitativo y *Western blot* demostramos que los astrocitos de 30 DIV inducen la expresión del transportador GLUT3. Sin embargo, la metodología utilizada no nos permitió determinar la contribución real de GLUT3 en la incorporación de DHA, debido a que ambos transportadores presentan valores de Km muy cercanos entre si (Rumsey et al., 1997; Rumsey et al., 2000).

Con el propósito de analizar la contribución de cada transportador de manera indirecta, y considerando que presentan valores diferentes de Km para el transporte de glucosa, realizamos estudios de captación de DHA en presencia de concentraciones crecientes de glucosa. Observamos que en los astrocitos de 15 DIV la presencia de glucosa, incluso en elevadas concentraciones (10 mM), no afecta el transporte de DHA. Por otro lado, en los astrocitos de 30 DIV la presencia de glucosa en bajas concentraciones (< 3 mM), produjo una disminución significativa en el transporte de DHA. Con estos resultados, podemos concluir, que la presencia de altas concentraciones de glucosa no son capaces de inhibir por completo el transporte de DHA, pese a que ambas moléculas competirían por los mismos transportadores. Además, podemos postular que el DHA es incorporado en los astrocitos de 15 DIV por un mecanismo no inhibible por glucosa, dependiente de GLUT1. Los astrocitos de 30 DIV aumentarían la captación de DHA utilizando un mecanismo de transporte sensible a glucosa, dependiente de GLUT3.

Para finalizar el análisis del transporte de DHA y considerando los resultados previos de inhibición, nos propusimos analizar el efecto de glutamato en la incorporación de DHA. Previamente, ha sido descrito que glutamato es un agente capaz de provocar un aumento en los niveles extracelulares de vitamina C, de esta forma podría tener un rol directo en la capacidad de los astrocitos para incorporar el DHA, considerando que algunos trabajos describen que glutamato estimula la captación y metabolización de glucosa en los astrocitos (Coyle and Puttfarcken, 1993; Pellerin and Magistretti, 1994; Rebec and Pierce, 1994; Rossi et al., 2000; Wilson et al., 2000; Nedergaard et al., 2002). En los astrocitos de 30 DIV la presencia de glutamato estimuló significativamente la incorporación de 2-DOG. Por el contrario,

en los astrocitos de 15 DIV la presencia de glutamato no afectó el transporte de 2-DOG. Previamente, se ha descrito que glutamato provoca un aumento en la concentración intracelular de Na^+ , consecuentemente una activación de la Na^+/K^+ ATPasa, generando una disminución en la razón ATP/ADP (Parpura et al., 1994; Pellerin and Magistretti, 1994). Esta situación provocaría un aumento en la glicólisis y en la incorporación de glucosa por parte de los astrocitos. El modelo anterior solo se cumple en los astrocitos de 30 DIV.

Al analizar el efecto de glutamato sobre el transporte de DHA, observamos que la presencia de glutamato en bajas concentraciones inhibe en un 50% el transporte de DHA, en ambos tipos de astrocitos. Considerando que en los astrocitos de 30 DIV la presencia de glutamato estimula la captación de 2-DOG, podemos postular que glutamato sería una señal para incrementar el metabolismo energético en los astrocitos de 30 DIV, modulando además la captación de DHA.

6.3.- ¿Qué representan los astrocitos de 15 y 30 DIV, astrocitos fisiológicos y reactivos, respectivamente?

En su conjunto los resultados anteriormente descritos indican claramente que el periodo de cultivo de los astrocitos afecta la respuesta de estas células a los diversos parámetros analizados. Nuestra hipótesis propone que los astrocitos de 15 DIV representan a un astrocitos fisiológico y los de 30 DIV representan a un astrocito reactivo. La activación de los astrocitos o gliosis reactiva es considerada una respuesta fisiopatológica de los astrocitos a una condición de estrés cerebral. En esta condición los astrocitos cambian el patrón de expresión de diferentes proteínas, con

el objetivo de modificar la estructura cerebral e impedir la diseminación del daño a través del cerebro (Ridet et al., 1997; Hamby and Sofroniew, 2010; Sofroniew and Vinters, 2010; Robel et al., 2011). Para estudiar la hipótesis previamente planteada, analizamos mediante inmunocitoquímica la expresión de diferentes marcadores asociados a astrocitos reactivos, tales como GFAP, MAP-2, vimentina y nestina (Clarke et al., 1994; Ridet et al., 1997; Pekny et al., 1999). La expresión de estos marcadores fue comparada con una línea tumoral de astrocitos C6, la cual fue utilizada como control positivo de la activación de los astrocitos. Mediante este análisis demostramos que los astrocitos de 30 DIV presentan un alto grado de expresión de los marcadores analizados en comparación con los astrocitos de 15 DIV, expresión que es similar a lo observado en la línea tumoral C6.

Los marcadores descritos previamente se asocian a activación glial en estudios realizados *in vivo* (Clarke et al., 1994; Pekny et al., 1999). Sin embargo, en el desarrollo de esta tesis observamos cambios en la expresión de otras proteínas no relacionadas previamente con la activación glial, es el caso de los transportadores de vitamina C. Mediante inmunocitoquímica observamos que los astrocitos de 30 DIV incrementan la expresión de los transportadores de DHA, GLUT1 y GLUT3. Como se mencionó previamente la inducción de GLUT3 es asociada a astrocitos en condición de estrés (Cidad et al., 2001) y por ende se podría asociar a la activación glial. Además, los astrocitos de 30 DIV inducen significativamente la expresión del transportador SVCT2, el cual no es expresado en astrocitos *in vivo* (Berger and Hediger, 2000). Sin embargo se ha postulado que el estrés oxidativo sería una potente señal para que los astrocitos induzcan el transportador SVCT2 (Korcok et al., 2000). Estos datos nos permiten postular que los transportadores de vitamina C

podrían ser un indicador de activación glial, propuesta que se apoya en estudios preliminares de nuestro laboratorio señalando que en astrocitos sometidos a estrés oxidativo se induce la expresión del transportador SVCT2, *in vivo*. Por último observamos que el transportador de glutamato EEAT1 también incrementa su expresión en los astrocitos de 30 DIV, lo cual podría explicar en parte las diferentes respuestas a glutamato. Estos resultados nos permiten postular que los transportadores de vitamina C y glutamato podrían ser considerados como marcadores de activación glial.

6.4.- ¿Qué ocurre con el DHA una vez en el interior de los astrocitos?.

En la figura 34 y 35 (punto 2) se observa que ambos tipos de astrocitos tienen la capacidad de reducir DHA intracelularmente a AA, molécula que es liberada al medio extracelular. Sin embargo, la cinética en el tiempo de este proceso mostró diferencias significativas en ambos modelos. En los astrocitos de 15 DIV, observamos que las células son capaces de reducir más eficientemente el DHA incorporado. Por otro lado, los astrocitos reactivos son capaces de reducir DHA sólo a tiempos cortos, siendo incapaces de mantener esta capacidad en el tiempo.

A tiempos mayores, un 60% del DHA incorporado se encuentra como AA en los astrocitos de 15 DIV, mientras que a los 30 DIV disminuye significativamente los niveles de AA intracelular. Estos resultados permiten

Tabla 7: Características inmunohitoquímicas y funcionales en los astrocitos de 15 y 30 DIV

Parámetro analizado	Astrocitos 15 DIV	Astrocitos 30 DIV
Proteínas de Citoesqueleto:		
GFAP	++	+++
MAP-2	-	+++
Vimentina	-	+++
Nestina	-	++
Transportadores de Vitamina C y glutamato:		
GLUT1	+	+++
GLUT3	-	++
EAT1	+	++
SVCT2	-	+++
Transporte de Vitamina C y glucosa:		
Captación 2-DOG	++	++
Captación DHA	+	+++

Continuación Tabla 7:

Parámetro analizado	Astrocitos 15 DIV	Astrocitos 30 DIV
Efecto de glutamato en la captación de DHA y 2-DOG		
Efecto glutamato sobre captación de 2-DOG	-	+++
Efecto glutamato sobre captación de DHA	↓	↓
Efecto de glutamato en la viabilidad de astrocitos	-	-

+: Aumento del parámetro analizado, símbolos proporcionales al aumento observado.

↓ : Baja en el parámetro analizado

-: no se observa efecto significativo.

concluir que los astrocitos de 15 DIV serían células predominantemente reductoras y acumuladoras de AA, mientras que los astrocitos de 30 DIV serían reductores en una primera etapa, pero posteriormente perderían esta capacidad.

6.5.- ¿Son los astrocitos células capaces de liberar vitamina C?

Existen diversos autores que han descrito la liberación de vitamina C desde los astrocitos, fenómeno que sería estimulado por el aumento de volumen generado por un medio hipotónico o la presencia de glutamato (Wilson et al., 2000; Wilson, 2005). Estos trabajos sugieren que los astrocitos liberan principalmente la forma reducida de la vitamina C. Sin embargo, no se ha definido el estado redox de la vitamina C liberada, ni el mecanismo de liberación.

Nuestros resultados muestran que la liberación basal de vitamina C desde los astrocitos de 15 DIV no es afectada por inhibidores de los canales de aniones orgánicos sensibles a volumen, ni por inhibidores de los transportadores GLUTs. Al analizar la forma redox de la vitamina C liberada, observamos que los astrocitos de 15 DIV liberan un 70% a la forma de AA.

Por otro lado la presencia de La^{+3} , inhibidor característico de los hemicanales formados por conexina, es capaz de inhibir la liberación basal de vitamina C en un 50%. La conexina predominante en astrocitos es la Cx43 (Thompson and Macvicar, 2008). De esta forma, la liberación basal de vitamina C en los astrocitos de 15 DIV se llevaría a cabo principalmente a través de los hemicanales de conexina 43 y no por los canales de aniones orgánicos, mecanismo propuesto para la liberación de

vitamina C en astrocitos (Wilson et al., 2000). En los astrocitos de 30 DIV la liberación basal fue inhibida por La^{+3} , octanol, ambos inhibidores de hemicanales y además fue inhibida en presencia del inhibidor de los canales aniónicos sensibles a volumen, DIDS. Estos resultados en su conjunto representan la primera evidencia de que los hemicanales de Cx43 participan activamente en la liberación de vitamina C desde los astrocitos, además, reafirman que los canales sensibles a volumen pueden estar implicados en esta función.

Estudios *in vivo* e *in vitro* describen un aumento en los niveles de vitamina C extracelular en episodios de actividad glutamatérgica, y es aceptado que la vitamina C liberada provendría de los astrocitos (Pierce et al., 1994; Rebec and Pierce, 1994; Wilson et al., 2000; Rebec et al., 2005). Sin embargo, al no observar efecto en los astrocitos de 15 DIV podemos postular que el mecanismo activado por glutamato sólo se encuentra presente en astrocitos reactivos. Con el objetivo de caracterizar de mejor manera el efecto de glutamato en los astrocitos de 30 DIV, co-incubamos glutamato con diferentes inhibidores y observamos que el efecto se neutraliza en presencia de La^{+3} y en ausencia de Na^{+} . El efecto de La^{+3} sugiere que glutamato estimula la liberación de vitamina C a través de los hemicanales de Cx43. Por otro lado la dependencia de Na^{+} señalaría que el efecto de glutamato es a nivel intracelular, ya que el transporte de esta molécula a través de los transportadores EAAT1 o EAAT2, ambos presentes en astrocitos, es dependiente de la presencia de Na^{+} (Danbolt, 2001; Nedergaard et al., 2002; Barros and Deitmer, 2009).

La datos presentados nos permiten sugerir que los astrocitos normales del cerebro censan los niveles de DHA extracelulares, y responden incorporando y reduciendo el DHA intracelularmente. Los astrocitos acumulan AA, posiblemente

para ser liberado en condiciones de estrés oxidativo. En condiciones de activación (estrés oxidativo) los astrocitos incrementan la expresión de GLUT1, en resumen se preparan para reciclar el DHA que es generado extracelularmente por una liberación masiva de AA a través de Cx43 o por canales sensibles a volumen. Glutamato potenciaría la liberación de vitamina C. El mecanismo de liberación y captura de AA-DHA respectivamente, en un astrocito activado podría, sin embargo, tener efectos muy importantes en el metabolismo general del astrocito.

6.6.- ¿Cómo afecta la acumulación de DHA el metabolismo de glucosa de los astrocitos?.

En las figuras 34 y 35 (punto 3) se presentan diferentes mecanismos de adaptación metabólica en respuesta al reciclamiento de vitamina C en astrocitos de 15 y 30 DIV.

Al determinar la velocidad glicolítica basal en los astrocitos de 15 y 30 DIV, observamos que los astrocitos de 30 DIV presentan una actividad 6 veces mayor, lo cual sugiere que gran parte de la glucosa incorporada a la célula es utilizada a través de la glicólisis. Al determinar la actividad basal de la vía PPP determinamos que los astrocitos de 15 DIV presentan una actividad 400 veces mayor a la observada en los astrocitos de 30 DIV, lo que apoya una mayor capacidad reductora de estos astrocitos.

En su conjunto, ambos análisis nos permiten concluir que los astrocitos de 15 DIV metabolizarían la glucosa principalmente por la vía PPP y no por glicólisis. Al presentar una baja actividad glicolítica, los astrocitos de 15 DIV tendrían un menor

metabolismo oxidativo y por ende una menor generación de radicales libres. Además, al tener una elevada actividad de la vía PPP acumularían mayores niveles del cofactor NADPH, el cual es necesario para el funcionamiento de la mayoría de los mecanismos antioxidantes enzimáticos. De esta forma, los astrocitos de 15 DIV serían células con un gran poder reductor y con un gran potencial para inhibir el daño oxidativo.

Los astrocitos de 30 DIV serían células principalmente oxidativas debido al elevado consumo de glucosa y la baja actividad de la vía PPP. De esta forma no podrían mantener en el tiempo los niveles de GSH necesarios para reciclar el DHA, liberando esta molécula al medio extracelular.

6.7.- El DHA como regulador del metabolismo energético en astrocitos.

El último punto propuesto en el modelo, señalado como número 4, plantea que el DHA acumulado intracelularmente en los astrocitos sería capaz de afectar directamente la actividad de uno de los metabolismos más importantes para las células, el metabolismo de la glucosa. Así, los datos analizados a continuación representan el primer estudio en células cerebrales y en astrocitos en estado reactivo.

La acumulación de DHA 1 mM en astrocitos de 15 DIV es capaz de estimular de forma tiempo dependiente (50%), la actividad de la vía glicolítica, mientras que en los astrocitos de 30 DIV no se observó un cambio en la actividad de esta ruta metabólica. Es posible que estas células tengan una actividad glicolítica basal muy elevada, representando un nivel máximo de actividad. Una observación muy

interesante es que la presencia de AA no fue capaz de modificar la razón del consumo de glucosa, indicando que este efecto no depende de la capacidad redox de la vitamina C. Como se ha descrito previamente, el DHA inhibe de forma irreversible a la enzima *HK*, resultado obtenido *in vitro* y utilizando elevadas concentraciones de DHA, cercanas a 10 mM (Fiorani et al., 1997; Fiorani et al., 2000). Para analizar este efecto en nuestro modelo, estandarizamos un protocolo de extracción de la actividad *HK* desde los astrocitos, donde determinamos que la presencia de DHA estimula la actividad *HK* sólo en los astrocitos de 15 DIV.

Al analizar el efecto del DHA sobre la actividad de la vía PPP, observamos que la presencia de DHA en los astrocitos de 15 DIV provocó un aumento del 200% en la actividad de la vía PPP, lo cual indicaría un efecto dual del DHA en estas células, estimulando la actividad glicolítica y la vía PPP, cambios que llevarían a las células a elevar su metabolismo de glucosa y a una mayor capacidad redox, producto de la elevación de los niveles de NADPH. Con el objetivo de determinar cómo DHA genera el cambio de actividad de la vía PPP, determinamos la actividad de la enzima *G6PDH*, la cual representa el primer punto de control de la vía PPP. Observamos que el DHA aumenta 12 veces la actividad de la enzima en astrocitos de 15 DIV. En los astrocitos de 30 DIV la presencia de DHA inhibe la actividad de la vía. En literatura un trabajo describe un efecto estimulador del DHA sobre la actividad PPP en células mieloides humanas (Puskas et al., 2000). Sin embargo, este trabajo logra evidenciar el efecto del DHA luego de 48 horas post incubación y asociado a un aumento en la expresión de la enzima *G6PDH*. Nuestros resultados serían el primer indicio del efecto del DHA en condiciones agudas, de manera independiente a cambios en la expresión enzimática y primer trabajo en células cerebrales.

En una siguiente etapa en esta tesis, analizamos si la acumulación de DHA afecta los niveles de GSH en astrocitos. El GSH es el agente antioxidante no enzimático más importante en la mayoría de los órganos a excepción del cerebro, donde este papel lo cumple el AA (Rice, 2000). El estudio del metabolismo del GSH a nivel cerebral ha permitido definir que esta molécula es producida a partir de sus aminoácidos constituyentes solo en los astrocitos, mientras que las neuronas serían incapaces de sintetizarlo de *novo*. (Dringen, 2000b; Dringen and Hirrlinger, 2003).

En los astrocitos de 15 DIV la presencia de DHA provocó un aumento en los niveles de GSH, efecto que fue directamente proporcional al tiempo de incubación y concordante con el tiempo de activación de la vía PPP. Por otro lado, en los astrocitos de 30 DIV la presencia de DHA provocó una drástica caída en los niveles de GSH llegando a disminuir un 98%, la cual fue directamente proporcional al tiempo de incubación. Los resultados anteriores muestran claramente que el efecto del DHA sobre la actividad de la vía PPP afecta directamente a los niveles de GSH intracelular y con ello afecta directamente la capacidad de las células para responder a un periodo de estrés oxidativo, ya sea reciclando el DHA o inhibiendo directamente la acción de los agentes oxidantes.

6.8.- La acumulación de vitamina C en astrocitos modula el metabolismo de lactato.

La elevada actividad basal de la vía PPP en astrocitos de 15 DIV indicaría que la glucosa incorporada sería preferentemente consumida a través de esta vía. Esta condición incrementaría fuertemente (200%) en presencia de DHA. Una pregunta válida es si la glucosa no es metabolizada por la glicólisis, ¿cómo el astrocito obtiene

energía suficiente para su normal funcionamiento?. Nuestro laboratorio ha descrito previamente que la acumulación de AA en neuronas es capaz de estimular la captación de lactato (Castro et al., 2007; Castro et al., 2008a; Castro et al., 2009). Al analizar el efecto de la acumulación de DHA sobre la captación de lactato en astrocitos de 15 y 30 DIV, concluimos que la presencia de DHA estimula la captación de lactato en ambos modelos de astrocitos. Sin embargo, el efecto fue más significativo en los astrocitos de 15 DIV, donde se observó un 80% de aumento en la captación de lactato. Podemos sugerir que la glucosa sería utilizada principalmente por la vía PPP, para mantener el potencial anabólico de las células, de esta forma, los astrocitos incorporarían lactato para ser utilizado como fuente de energía. Adicionalmente, esta propuesta se contradice en parte, con el modelo de acoplamiento metabólico donde los astrocitos serían capaces de convertir el piruvato en lactato por la expresión de la enzima LDH5. De esta forma, los astrocitos serían productores de lactato y no consumidores de este (Pellerin and Magistretti, 1994; Laughton et al., 2000). Sin embargo, el modelo anterior no es el único modelo planteado para explicar el metabolismo energético cerebral. Recientemente, se ha propuesto un modelo donde las neuronas serían dependientes de glucosa para mantener su requerimiento energético, considerando las constantes cinéticas de las enzimas involucradas en el proceso de metabolización de la glucosa y no tendrían la capacidad de utilizar niveles importantes de lactato. De esta forma las neuronas en condición de actividad cerebral, generarían lactato para ser liberado al espacio extracelular, donde sería incorporado y metabolizado por los astrocitos (Vannucci and Vannucci, 2000; Simpson et al., 2007; Mangia et al., 2009; Mangia et al., 2011).

Nuestros resultados concuerdan con el segundo modelo propuesto, situación que sería incrementada en presencia de DHA.

Otro agente importante en la interacción astrocito-neurona, es el glutamato, molécula que actuaría aumentando la incorporación de glucosa y la liberación de vitamina C en los astrocitos. En nuestro análisis demostramos que glutamato provoca efectos dispares en los astrocitos de 15 y 30 DIV. La presencia de glutamato genera cambios metabólicos solo en los astrocitos de 15 DIV aumentando la reducción del DHA, potenciando el rol antioxidante de los astrocitos.

6.9- Transporte de AA y DHA en neuronas.

Como se mencionó previamente, la vitamina C es el agente antioxidante más importante del cerebro, y debido a su función se encuentra en elevadas concentración en las diferentes células cerebrales, siendo las neuronas las células con mayores concentraciones de AA, cercanas a 10 mM, 10 veces mayor a la presente en astrocitos (1 mM) y 50 veces mayor a la presente en el líquido extracelular (250 μ M) (Rice, 2000; Hediger, 2002).

El transporte de vitamina C en neuronas sería preferentemente a través de SVCT2, el cual fue descrito por primera vez en neuronas por nuestro grupo (Castro et al., 2001) y confirmado en esta tesis. Al analizar la expresión de los transportadores GLUT1 y GLUT3, observamos que las neuronas expresan preferentemente el transportador GLUT3. Al realizar los estudios de transporte para la captación de 2-DOG y DHA observamos que el transporte de 2-DOG en neuronas es similar a lo observado en los astrocitos de 15 y 30 DIV. Sin embargo, al analizar el transporte de

DHA observamos que las neuronas son capaces de incorporar bajos niveles de DHA en comparación con los astrocitos de 15 y 30 DIV. Estos resultados soportan la idea de que en condiciones de aumento en los niveles de DHA serían los astrocitos las células encargadas de captar el DHA desde el espacio extracelular.

6.10.- Efecto de la acumulación de vitamina C en neuronas

El modelo de reciclamiento de vitamina C cerebral postula que las neuronas serían células incapaces de reducir eficientemente el DHA intracelular. Al analizar la reducción de DHA en neuronas demostramos una baja capacidad para reducir el DHA incorporado, el potencial reductor fue estimulado levemente en presencia de glutamato. Además observamos que las neuronas tienen una baja capacidad para mantener el AA incorporado en su forma reducida y es rápidamente oxidado. Estos resultados nos permiten afirmar que las neuronas serían células generadoras de DHA.

Al analizar la liberación de vitamina C desde las neuronas, observamos que estas células liberan un bajo porcentaje de vitamina C en comparación con los astrocitos. Además, un 70% de la vitamina C liberada se encuentra como DHA. Sin embargo, este proceso no fue inhibido por los agentes utilizados. Lo cual abre la posibilidad a un nuevo mecanismo de liberación para el DHA desde las neuronas, independiente de los transportadores bidireccionales GLUTs y de los mecanismos de liberación observados en astrocitos de 15 y 30 DIV.

Los resultados anteriores sugieren que en las neuronas estaría favorecido el proceso de acumulación intracelular de DHA, condición que generaría un efecto

tóxico para las neuronas (Song et al., 2001; Song et al., 2002). Sin embargo, no hay publicaciones que analicen el posible efecto del DHA sobre el metabolismo de la glucosa en neuronas, aspecto importante si consideramos que las neuronas son altamente dependientes de la glucosa como fuente energética (Eklof and Siesjo, 1971; Siesjo, 1978b). Al cuantificar el metabolismo basal de la glucosa en neuronas, observamos que estas células presentan una tasa glicolítica moderada en comparación a los astrocitos, y una elevada actividad de la vía PPP, similar a lo observado en los astrocitos de 15 DIV. La elevada actividad PPP se podría relacionar a la mayor producción de agentes oxidantes que ocurre en la neurona (actividad de neurotransmisión). Los resultados anteriores que señalan una moderada actividad glicolítica de las neuronas se contradicen con los estudios clásicos de metabolismo cerebral, indicando un alta flujo glicolítico en estas células (Siesjo, 1980; Siesjo and Rehncrona, 1980). Sin embargo, estudios recientes indicarían que las neuronas podrían regular su tasa glicolítica de acuerdo a las condiciones de actividad neuronal, presencia de glutamato, óxido nítrico o estrés cerebral (Bolaños et al., 2007; Bolaños et al., 2008; Herrero-Mendez et al., 2009).

Al analizar el efecto de DHA sobre el metabolismo energético neuronal observamos que el DHA inhibe significativamente la actividad glicolítica de las neuronas, logrando una inhibición del 75% de la glicólisis luego de 45 min, este efecto, es de gran relevancia ya que inhibidores clásicos de la glicólisis tales como, cianuro o fluoruro, no logran una inhibición tan significativa a los 45 min requiriendo largos periodos de incubación para observar un efecto similar (Proudfoot et al., 2006). Paralelamente demostramos que DHA inhibe la actividad HK, mecanismo que usaría esta molécula para inhibir el flujo glicolítico. Es importante señalar que la HK

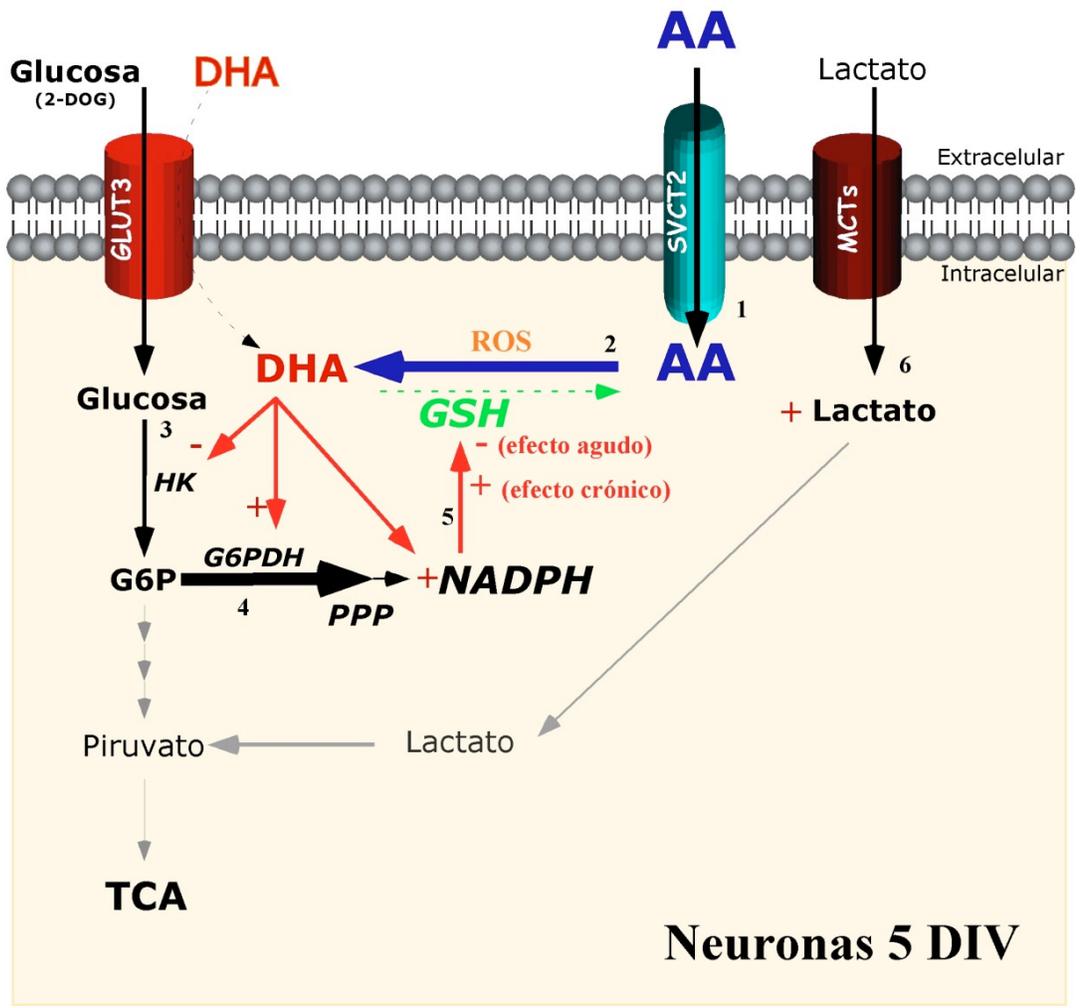
presente en neuronas y astrocitos podría ser diferente, debido al efecto diferencial observado con DHA.

Al analizar el efecto de DHA sobre la actividad de la vía PPP, observamos que esta molécula estimula en un 250% la actividad de esta vía metabólica, lo cual significaría altas dosis de NADPH y posiblemente una mayor capacidad para reducir GSH y finalmente al DHA. Al analizar el efecto del DHA sobre los niveles de GSH neuronales, observamos que a tiempos cortos, el DHA provoca una disminución del 70% en los niveles de GSH, sin embargo, luego de 30 min de incubación con DHA, observamos una recuperación en los niveles de GSH, este aumento coincide con el tiempo en el cual DHA incrementa la actividad de la vía PPP. Previamente, ha sido reportado que la presencia de DHA es capaz de generar la muerte neuronal, posiblemente debido al efecto prooxidante del DHA (Song et al., 2001). Sin embargo, nuestros resultados permiten postular que la muerte neuronal en condiciones de aumento en los niveles de DHA se debería principalmente al potente efecto inhibitorio del DHA sobre la glicólisis, en esta condición, las neuronas serían incapaces de mantener su requerimiento energético y este desequilibrio provocaría la activación de diferentes señales, que llevarían finalmente a la muerte neuronal. Con los resultados obtenidos planteamos un modelo que integra el efecto de la acumulación de DHA en neuronas (Figura 36).

Figura 36: Modelo propuesto para el efecto de DHA sobre el metabolismo energético neuronal.

Las neuronas incorporarían preferentemente AA vía el transportador SVCT2 (1), el AA sería utilizado como agente antioxidante con la generación de moléculas de DHA (2), el DHA generado intracelularmente inhibiría la glicólisis bloqueando la actividad de la enzima HK (3). Por otro lado, DHA estimularía la actividad de la vía PPP (4). Además, tratamientos agudos de DHA provocarían una disminución en los niveles de GSH. En condiciones crónicas la presencia de DHA estimularía el reciclaje de GSH (5). Al no poder obtener energía vía glicólisis, la neurona comenzaría a utilizar lactato como sustrato energético, condición que se ve favorecida por la presencia de DHA molécula que estimula la incorporación de lactato (6).





6.11.- Modelo propuesto para la interacción neurona-astrocito y neurona-astrocito reactivo.

Con el objetivo de integrar los resultados obtenidos en astrocitos y neuronas proponemos dos modelos de interacción astrocito-neurona, uno considerando la interacción entre neuronas y astrocitos normales (15 DIV) y otro considerando la interacción de neuronas con astrocitos reactivos (30 DIV).

En condiciones cerebrales normales, las neuronas captan AA desde el medio extracelular y lo utilizan como el principal agente antioxidante. La actividad neuronal normal, requiere un alto consumo de energía y oxígeno, lo cual provoca un aumento en los agentes oxidantes extracelulares que podrían generar la oxidación extracelular del AA, con la consecuente generación de niveles crecientes de DHA. El DHA sería captado por los astrocitos vía transportador GLUT1. En los astrocitos el DHA sería reducido a AA. Sin embargo, considerando que la reducción es un proceso paulatino, se produciría una acumulación transitoria de DHA intracelular, lo cual sería una señal para que los astrocitos incrementen su capacidad antioxidante, aumentando la actividad de la vía PPP y con ello los niveles intracelulares de NADPH y GSH; en esta condición los astrocitos potenciarían su capacidad para reducir el DHA a AA. Luego los astrocitos liberarían el AA al espacio extracelular, posiblemente vía los hemicanales de conexina 46. El AA liberado por los astrocitos podría ser nuevamente incorporado por las neuronas que expresan el transportador SVCT2, a diferencia de los astrocitos que solo son capaces de incorporar la forma oxidada de la vitamina C. En esta condición la actividad glutamatérgica estimula la capacidad de reducción del

DHA en astrocitos, incrementando los niveles de GSH con lo cual potencia el rol antioxidante de los astrocitos (Figura 37, A).

En una condición de injuria cerebral, los astrocitos responden generando la gliosis reactiva. En nuestro modelo los astrocitos reactivos (30 DIV) incrementan fuertemente la captación de DHA y no la de glucosa, posiblemente por la inducción de la proteína estomatina (Anexo 1), sin embargo, la activación glial provocaría una pérdida de la capacidad reductora de los astrocitos y los niveles de GSH intracelulares no serían suficientes para reducir las altas dosis de DHA incorporado.

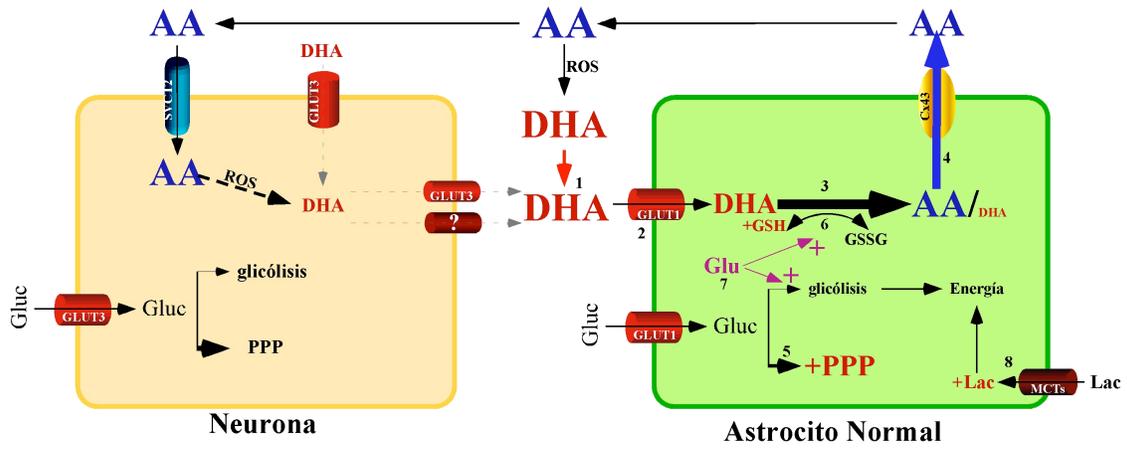
La pérdida de la capacidad reductora se potenciaría por la baja actividad de la vía PPP y por la alta tasa glicolítica en los astrocitos reactivos, por lo tanto, en estas células estarían favorecidos los metabolismos necesarios para la obtención de energía por sobre aquellos encargados de mantener el balance redox. Esta condición provocaría que los astrocitos comiencen a liberar altas dosis de DHA al espacio extracelular. Al aumentar el DHA extracelular, esta molécula podría ser incorporada por las neuronas, células donde la acumulación del DHA inhibiría la glicólisis en neuronas, inhibiendo a la enzima reguladora *HK*, este efecto potenciaría una muerte neuronal masiva (Figura 37, B). En los astrocitos reactivos la presencia de glutamato no afectó significativamente el metabolismo energético, pero sí fue un potente estimulador de la liberación de DHA, potenciando el daño oxidativo neuronal.

Figura 37: Modelo propuesto para la interacción astrocito-neurona y astrocito reactivo-neurona.

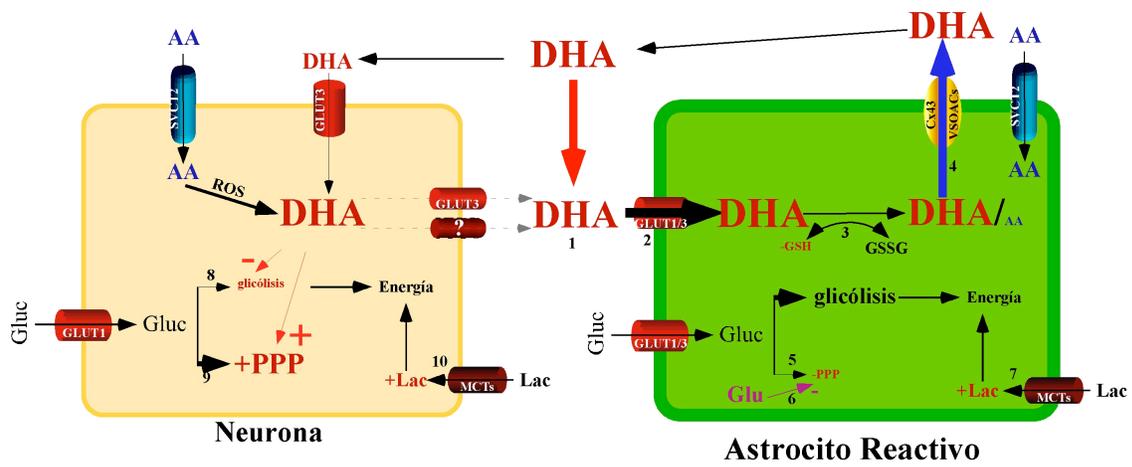
A. En condiciones cerebrales normales, el DHA se encuentra en bajas concentraciones y es generado principalmente por la oxidación de AA extracelular (1). En esta condición los astrocitos incorporan (2) y reducen el DHA a AA (3), el cual es liberado al espacio extracelular (4) por los astrocitos. En los astrocitos, la incorporación de DHA o glutamato incrementan el potencial reductor, aumentando la actividad de la vía PPP (5 y 7) con el posterior aumento en los niveles de GSH (6). Además en esta condición, la acumulación de DHA incrementa la captación de lactato, para utilizarlo como fuente energética (8).

B. En una condición de injuria cerebral, aumentarían los niveles extracelulares de DHA, por un aumento en los niveles de moléculas oxidantes y por una posible liberación de DHA desde la neurona (1). El DHA extracelular sería captado eficientemente por los astrocitos reactivos vía GLUT1 (2). En el interior de los astrocitos reactivos el DHA no sería reducido (3) y sería liberado como DHA al espacio extracelular (4). La acumulación de DHA en estas células induciría una disminución significativa en la actividad de la vía PPP (5), efecto que se potencia en presencia de glutamato (6). La inhibición de la vía PPP conlleva a una baja en los niveles de GSH y a una baja en el poder reductor. Además, los astrocitos reactivos comenzarían a utilizar lactato como fuente de energía (7). Los astrocitos al liberar DHA al espacio extracelular potenciarían la acumulación de esta molécula en las neuronas lo que provocaría una inhibición en la glicólisis (8) y un aumento en la actividad PPP y de GSH para amortiguar el estrés oxidativo, provocado por DHA. Por último, el DHA acumulado incrementaría la captación de lactato por las neuronas para ser utilizado como fuente de energía (9).

A) Reciclamiento de la vitamina C en condiciones cerebrales normales



B) Reciclamiento de la vitamina C en presencia de astrocitos reactivos



VII.- Conclusiones generales

1.- Los astrocitos normales del cerebro detectan los niveles de DHA extracelulares, y responden incorporando y reduciendo el DHA a AA intracelularmente, por un mecanismo dependiente de GSH. Además, los astrocitos acumulan AA, posiblemente para ser liberado en condiciones de estrés oxidativo.

2.- La acumulación de DHA en astrocitos normales potencia la capacidad reductora de estas células, incrementando la actividad de la vía de las pentosas fosfato e incrementando los niveles de GSH, cambios metabólicos que en su conjunto potencian la reducción del DHA incorporado. La capacidad reductora de estas células es también estimulada en presencia de glutamato, que estimula la actividad de la vía de las pentosas fosfato.

3.- El periodo de cultivo de los astrocitos modula significativamente la respuesta metabólica de las células a la vitamina C, aumentando la toma de DHA, induciendo la expresión del transportador GLUT3 y SVCT2 e induciendo la expresión de marcadores propios de astrocitos reactivos tales como MAP-2, vimentina y nestina. Largos periodos de cultivo inducen la activación de los astrocitos *in vitro*.

4.- Los astrocitos reactivos inducen cambios significativos en su metabolismo energético, incrementando la actividad glicolítica y presentando bajos niveles de actividad de la vía de las pentosas fosfato.

5.- La glia reactiva cambia el metabolismo de la vitamina C, disminuyendo la capacidad reductora de las células y favoreciendo la acumulación de DHA. Esta molécula podría ser liberada al medio extracelular.

6.- Una incorporación masiva de DHA a las neuronas induce la inhibición de la glicólisis. Esta condición estimularía a las neuronas a incrementar la captación de lactato.

7.- La forma oxidada de la vitamina C, DHA, en el cerebro sería un potente regulador metabólico favoreciendo el potencial antioxidante de los astrocitos.



VIII.- BIBLIOGRAFÍA

Ahmad S, Evans WH (2002) Post-translational integration and oligomerization of connexin 26 in plasma membranes and evidence of formation of membrane pores: implications for the assembly of gap junctions. *Biochem J* 365:693-699.

Allaman I, Belanger M, Magistretti PJ (2011) Astrocyte-neuron metabolic relationships: for better and for worse. *Trends Neurosci* 34:76-87.

Angulo C, Castro MA, Rivas CI, Segretain D, Maldonado R, Yanez AJ, Slebe JC, Vera JC, Concha, II (2008) Molecular identification and functional characterization of the vitamin C transporters expressed by Sertoli cells. *J Cell Physiol* 217:708-716.

Astuya A, Caprile T, Castro M, Salazar K, Garcia Mde L, Reinicke K, Rodriguez F, Vera JC, Millan C, Ulloa V, Low M, Martinez F, Nualart F (2005) Vitamin C uptake and recycling among normal and tumor cells from the central nervous system. *J Neurosci Res* 79:146-156.

Augustin R (2010) The protein family of glucose transport facilitators: It's not only about glucose after all. *IUBMB Life* 62:315-333.

Banhegyi G, Benedetti A, Csala M, Mandl J (2007) Stress on redox. *FEBS Lett* 581:3634-3640.

Barros LF, Deitmer JW (2009) Glucose and lactate supply to the synapse. *Brain Res Rev.*

Berger UV, Hediger MA (2000) The vitamin C transporter SVCT2 is expressed by astrocytes in culture but not in situ. *Neuroreport* 11:1395-1399.

Bode AM, Cunningham L, Rose RC (1990) Spontaneous decay of oxidized ascorbic acid (dehydro-L-ascorbic acid) evaluated by high-pressure liquid chromatography. Clin Chem 36:1807-1809.

Bolaños JP, Almeida A (2006) Modulation of astroglial energy metabolism by nitric oxide. Antioxid Redox Signal 8:955-965.

Bolaños JP, Herrero-Mendez A, Fernandez-Fernandez S, Almeida A (2007) Linking glycolysis with oxidative stress in neural cells: a regulatory role for nitric oxide. Biochem Soc Trans 35:1224-1227.

Bolaños JP, Delgado-Esteban M, Herrero-Mendez A, Fernandez-Fernandez S, Almeida A (2008) Regulation of glycolysis and pentose-phosphate pathway by nitric oxide: impact on neuronal survival. Biochim Biophys Acta 1777:789-793.

Caprile T, Salazar K, Astuya A, Cisternas P, Silva-Alvarez C, Montecinos H, Millan C, de Los Angeles Garcia M, Nualart F (2009) The Na⁺-dependent L-ascorbic acid transporter SVCT2 expressed in brainstem cells, neurons, and neuroblastoma cells is inhibited by flavonoids. J Neurochem 108:563-577.

Carr A, Frei B (1999a) Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? FASEB J 13:1007-1024.

Carr AC, Frei B (1999b) Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effects in humans. Am J Clin Nutr 69:1086-1107.

Castro M, Caprile T, Astuya A, Millan C, Reinicke K, Vera JC, Vasquez O, Aguayo LG, Nualart F (2001) High-affinity sodium-vitamin C co-transporters (SVCT) expression in embryonic mouse neurons. J Neurochem 78:815-823.

Castro MA, Beltran FA, Brauchi S, Concha, II (2009) A metabolic switch in brain: glucose and lactate metabolism modulation by ascorbic acid. *J Neurochem* 110:423-440.

Castro MA, Angulo C, Brauchi S, Nualart F, Concha, II (2008a) Ascorbic acid participates in a general mechanism for concerted glucose transport inhibition and lactate transport stimulation. *Pflugers Arch* 457:519-528.

Castro MA, Pozo M, Cortes C, Garcia Mde L, Concha, II, Nualart F (2007) Intracellular ascorbic acid inhibits transport of glucose by neurons, but not by astrocytes. *J Neurochem* 102:773-782.

Castro T, Low M, Salazar K, Montecinos H, Cifuentes M, Yanez AJ, Slebe JC, Figueroa CD, Reinicke K, de los Angeles Garcia M, Henriquez JP, Nualart F (2008b) Differential distribution of the Sodium-vitamin C cotransporter-1 along the proximal tubule of the mouse and human kidney. *Kidney Int* 74:1278-1286.

Catani MV, Savini I, Rossi A, Melino G, Avigliano L (2005) Biological role of vitamin C in keratinocytes. *Nutr Rev* 63:81-90.

Cidad P, Garcia-Nogales P, Almeida A, Bolanos JP (2001) Expression of glucose transporter GLUT3 by endotoxin in cultured rat astrocytes: the role of nitric oxide. *J Neurochem* 79:17-24.

Clarke SR, Shetty AK, Bradley JL, Turner DA (1994) Reactive astrocytes express the embryonic intermediate neurofilament nestin. *Neuroreport* 5:1885-1888.

Corti A, Casini AF, Pompella A (2010) Cellular pathways for transport and efflux of ascorbate and dehydroascorbate. *Arch Biochem Biophys* 500:107-115.

Coyle JT, Puttfarcken P (1993) Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 262:689-695.

Danbolt NC (2001) Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 65:1-105.

Daniels AJ, Dean G, Viveros OH, Diliberto EJ, Jr. (1982) Secretion of newly taken-up ascorbic acid by adrenomedullary chromaffin cells. *Science* 216:737-739.

Daruwala R, Song J, Koh WS, Rumsey SC, Levine M (1999) Cloning and functional characterization of the human sodium-dependent vitamin C transporters hSVCT1 and hSVCT2. *FEBS Lett* 460:480-484.

Daskalopoulos R, Korcok J, Tao L, Wilson JX (2002) Accumulation of intracellular ascorbate from dehydroascorbic acid by astrocytes is decreased after oxidative stress and restored by propofol. *Glia* 39:124-132.

Dringen R (2000a) Glutathione metabolism and oxidative stress in neurodegeneration. *Eur J Biochem* 267:4903.

Dringen R (2000b) Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol* 62:649-671.

Dringen R, Hirrlinger J (2003) Glutathione pathways in the brain. *Biol Chem* 384:505-516.

Dringen R, Gutterer JM, Hirrlinger J (2000) Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *Eur J Biochem* 267:4912-4916.

Eklöf B, Siesjö BK (1971) Cerebral blood flow and cerebral energy state. *Acta Physiol Scand* 82:409-411.

Englard S, Seifter S (1986) The biochemical functions of ascorbic acid. *Annu Rev Nutr* 6:365-406.

Esteban MA et al. (2010) Vitamin C enhances the generation of mouse and human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 6:71-79.

Fiorani M, De Sanctis R, Saltarelli R, Stocchi V (1997) Hexokinase inactivation induced by ascorbic acid/Fe(II) in rabbit erythrocytes is independent of glutathione-reductive processes and appears to be mediated by dehydroascorbic acid. *Arch Biochem Biophys* 342:191-196.

Fiorani M, De Sanctis R, Scarlatti F, Stocchi V (1998) Substrates of hexokinase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase prevent the inhibitory response induced by ascorbic acid/iron and dehydroascorbic acid in rabbit erythrocytes. *Arch Biochem Biophys* 356:159-166.

Fiorani M, Saltarelli R, De Sanctis R, Palma F, Ceccaroli P, Stocchi V (1996) Role of dehydroascorbate in rabbit erythrocyte hexokinase inactivation induced by ascorbic acid/Fe(II). *Arch Biochem Biophys* 334:357-361.

Fiorani M, De Sanctis R, Scarlatti F, Vallorani L, De Bellis R, Serafini G, Bianchi M, Stocchi V (2000) Dehydroascorbic acid irreversibly inhibits hexokinase activity. *Mol Cell Biochem* 209:145-153.

Franco R, Cidlowski JA (2009) Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant. *Cell Death Differ* 16:1303-1314.

Furst J, Gschwentner M, Ritter M, Botta G, Jakab M, Mayer M, Garavaglia L, Bazzini C, Rodighiero S, Meyer G, Eichmuller S, Woll E, Paulmichl M (2002) Molecular and functional aspects of anionic channels activated during regulatory volume decrease in mammalian cells. *Pflugers Arch* 444:1-25.

Goldenberg H, Schweinzer E (1994) Transport of vitamin C in animal and human cells. *J Bioenerg Biomembr* 26:359-367.

Gross PM, Kadekaro M, Sokoloff L, Holcomb HH, Saavedra JM (1985) Alterations of local cerebral glucose utilization during chronic dehydration in rats. *Brain Res* 330:329-336.

Grunewald RA (1993) Ascorbic acid in the brain. *Brain Res Brain Res Rev* 18:123-133.

Halliwell B (1996) Vitamin C: antioxidant or pro-oxidant in vivo? *Free Radic Res* 25:439-454.

Hamby ME, Sofroniew MV (2010) Reactive astrocytes as therapeutic targets for CNS disorders. *Neurotherapeutics* 7:494-506.

Hediger MA (2002) New view at C. *Nat Med* 8:445-446.

Herrero-Mendez A, Almeida A, Fernandez E, Maestre C, Moncada S, Bolanos JP (2009) The bioenergetic and antioxidant status of neurons is controlled by continuous degradation of a key glycolytic enzyme by APC/C-Cdh1. *Nat Cell Biol* 11:747-752.

Hertz L (2004) Intercellular metabolic compartmentation in the brain: past, present and future. *Neurochem Int* 45:285-296.

Hertz L (2008) Bioenergetics of cerebral ischemia: a cellular perspective. *Neuropharmacology* 55:289-309.

Hothersall JS, Greenbaum AL, McLean P (1982) The functional significance of the pentose phosphate pathway in synaptosomes: protection against peroxidative damage by catecholamines and oxidants. *J Neurochem* 39:1325-1332.

Hughes RE, Hurley RJ, Jones PR (1971) Retention of ascorbic acid by the guinea pig eye lens. *Exp Eye Res* 12:39-43.

Israelsen WJ, Vander Heiden MG (2010) ATP consumption promotes cancer metabolism. *Cell* 143:669-671.

Iwabuchi S, Kawahara K (2011a) Inducible astrocytic glucose transporter-3 contributes to the enhanced storage of intracellular glycogen during reperfusion after ischemia. *Neurochem Int.*

Iwabuchi S, Kawahara K (2011b) Inducible astrocytic glucose transporter-3 contributes to the enhanced storage of intracellular glycogen during reperfusion after ischemia. *Neurochem Int* 59:319-325.

Jolivet R, Allaman I, Pellerin L, Magistretti PJ, Weber B (2010) Comment on recent modeling studies of astrocyte-neuron metabolic interactions. *J Cereb Blood Flow Metab* 30:1982-1986.

Joost HG, Thorens B (2001) The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members (review). *Mol Membr Biol* 18:247-256.

Joost HG, Bell GI, Best JD, Birnbaum MJ, Charron MJ, Chen YT, Doege H, James DE, Lodish HF, Moley KH, Moley JF, Mueckler M, Rogers S, Schurmann A, Seino S, Thorens B (2002) Nomenclature of the GLUT/SLC2A family of sugar/polyol transport facilitators. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282:E974-976.

Kim EJ, Park YG, Baik EJ, Jung SJ, Won R, Nahm TS, Lee BH (2005) Dehydroascorbic acid prevents oxidative cell death through a glutathione pathway in primary astrocytes. *J Neurosci Res* 79:670-679.

Kim EJ, Won R, Sohn JH, Chung MA, Nam TS, Lee HJ, Lee BH (2008) Anti-oxidant effect of ascorbic and dehydroascorbic acids in hippocampal slice culture. *Biochem Biophys Res Commun* 366:8-14.

Knoth J, Viveros OH, Diliberto EJ, Jr. (1987) Ascorbic acid release from adrenomedullary chromaffin cells: characteristics and subcellular origin. *Ann N Y Acad Sci* 493:480-488.

Korcok J, Dixon SJ, Lo TC, Wilson JX (2003) Differential effects of glucose on dehydroascorbic acid transport and intracellular ascorbate accumulation in astrocytes and skeletal myocytes. *Brain Res* 993:201-207.

Korcok J, Yan R, Siushansian R, Dixon SJ, Wilson JX (2000) Sodium-ascorbate cotransport controls intracellular ascorbate concentration in primary astrocyte cultures expressing the SVCT2 transporter. *Brain Res* 881:144-151.

Korcok J, Wu F, Tyml K, Hammond RR, Wilson JX (2002) Sepsis inhibits reduction of dehydroascorbic acid and accumulation of ascorbate in astroglial cultures: intracellular ascorbate depletion increases nitric oxide synthase induction and glutamate uptake inhibition. *J Neurochem* 81:185-193.

Laughton JD, Charnay Y, Belloir B, Pellerin L, Magistretti PJ, Bouras C (2000) Differential messenger RNA distribution of lactate dehydrogenase LDH-1 and LDH-5 isoforms in the rat brain. *Neuroscience* 96:619-625.

Lee JY, Koh HC, Chang MY, Park CH, Lee YS, Lee SH (2003) Erythropoietin and bone morphogenetic protein 7 mediate ascorbate-induced dopaminergic differentiation from embryonic mesencephalic precursors. *Neuroreport* 14:1401-1404.

Lee YC, Huang HY, Chang CJ, Cheng CH, Chen YT (2010) Mitochondrial GLUT10 facilitates dehydroascorbic acid import and protects cells against oxidative stress: mechanistic insight into arterial tortuosity syndrome. *Hum Mol Genet* 19:3721-3733.

Li X, Qu ZC, May JM (2001) GSH is required to recycle ascorbic acid in cultured liver cell lines. *Antioxid Redox Signal* 3:1089-1097.

Linster CL, Van Schaftingen E (2007) Vitamin C. Biosynthesis, recycling and degradation in mammals. *FEBS J* 274:1-22.

Lutsenko EA, Carcamo JM, Golde DW (2004) A human sodium-dependent vitamin C transporter 2 isoform acts as a dominant-negative inhibitor of ascorbic acid transport. *Mol Cell Biol* 24:3150-3156.

Macheda ML, Rogers S, Best JD (2005) Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer. *J Cell Physiol* 202:654-662.

Magistretti PJ, Sorg O, Naichen Y, Pellerin L, de Rham S, Martin JL (1994) Regulation of astrocyte energy metabolism by neurotransmitters. *Ren Physiol Biochem* 17:168-171.

Maher F (1995) Immunolocalization of GLUT1 and GLUT3 glucose transporters in primary cultured neurons and glia. *J Neurosci Res* 42:459-469.

Mangia S, Simpson IA, Vannucci SJ, Carruthers A (2009) The in vivo neuron-to-astrocyte lactate shuttle in human brain: evidence from modeling of measured lactate levels during visual stimulation. *J Neurochem* 109 Suppl 1:55-62.

Mangia S, DiNuzzo M, Giove F, Carruthers A, Simpson IA, Vannucci SJ (2011) Response to 'comment on recent modeling studies of astrocyte-neuron metabolic interactions': much ado about nothing. *J Cereb Blood Flow Metab* 31:1346-1353.

May JM, Qu Z, Cobb CE (2001) Recycling of the ascorbate free radical by human erythrocyte membranes. *Free Radic Biol Med* 31:117-124.

May JM, Qu ZC, Whitesell RR, Cobb CE (1996) Ascorbate recycling in human erythrocytes: role of GSH in reducing dehydroascorbate. *Free Radic Biol Med* 20:543-551.

May JM, Mendiratta S, Qu ZC, Loggins E (1999) Vitamin C recycling and function in human monocytic U-937 cells. *Free Radic Biol Med* 26:1513-1523.

May JM, Qu ZC, Neel DR, Li X (2003) Recycling of vitamin C from its oxidized forms by human endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1640:153-161.

May JM, Li L, Hayslett K, Qu ZC (2006) Ascorbate transport and recycling by SH-SY5Y neuroblastoma cells: response to glutamate toxicity. *Neurochem Res* 31:785-794.

Meister A (1994) Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. *J Biol Chem* 269:9397-9400.

Milby KH, Mefford IN, Chey W, Adams RN (1981) In vitro and in vivo depolarization coupled efflux of ascorbic acid in rat brain preparations. *Brain Res Bull* 7:237-242.

Mintun MA, Vlassenko AG, Rundle MM, Raichle ME (2004) Increased lactate/pyruvate ratio augments blood flow in physiologically activated human brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:659-664.

Montel-Hagen A, Kinet S, Manel N, Mongellaz C, Prohaska R, Battini JL, Delaunay J, Sitbon M, Taylor N (2008) Erythrocyte Glut1 triggers dehydroascorbic acid uptake in mammals unable to synthesize vitamin C. *Cell* 132:1039-1048.

Mueckler M (1994) Facilitative glucose transporters. *Eur J Biochem* 219:713-725.

Nedergaard M, Takano T, Hansen AJ (2002) Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. *Nat Rev Neurosci* 3:748-755.

Nishikimi M, Yagi K (1991) Molecular basis for the deficiency in humans of gulonolactone oxidase, a key enzyme for ascorbic acid biosynthesis. *Am J Clin Nutr* 54:1203S-1208S.

Nualart F, Los Angeles Garcia M, Medina RA, Owen GI (2009) Glucose transporters in sex steroid hormone related cancer. *Curr Vasc Pharmacol* 7:534-548.

Nualart FJ, Rivas CI, Montecinos VP, Godoy AS, Guaiquil VH, Golde DW, Vera JC (2003) Recycling of vitamin C by a bystander effect. *J Biol Chem* 278:10128-10133.

O'Neill RD, Fillenz M (1985) Circadian changes in extracellular ascorbate in rat cortex, accumbens, striatum and hippocampus: correlations with motor activity. *Neurosci Lett* 60:331-336.

Parpura V, Basarsky TA, Liu F, Jeftinija K, Jeftinija S, Haydon PG (1994) Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature* 369:744-747.

Patel M, McIntosh L, Bliss T, Ho D, Sapolsky R (2001) Interactions among ascorbate, dehydroascorbate and glucose transport in cultured hippocampal neurons and glia. *Brain Res* 916:127-135.

Pekny M, Eliasson C, Siushansian R, Ding M, Dixon SJ, Pekna M, Wilson JX, Hamberger A (1999) The impact of genetic removal of GFAP and/or vimentin on glutamine levels and transport of glucose and ascorbate in astrocytes. *Neurochem Res* 24:1357-1362.

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

Pierce RC, Clemens AJ, Shapiro LA, Rebec GV (1994) Repeated treatment with ascorbate or haloperidol, but not clozapine, elevates extracellular ascorbate in the neostriatum of freely moving rats. *Psychopharmacology (Berl)* 116:103-109.

Portugal CC, Miya VS, Calaza Kda C, Santos RA, Paes-de-Carvalho R (2009) Glutamate receptors modulate sodium-dependent and calcium-independent vitamin C bidirectional transport in cultured avian retinal cells. *J Neurochem* 108:507-520.

Prebil M, Jensen J, Zorec R, Kreft M (2011) Astrocytes and energy metabolism. *Arch Physiol Biochem*.

Proudfoot AT, Bradberry SM, Vale JA (2006) Sodium fluoroacetate poisoning. *Toxicol Rev* 25:213-219.

Puskas F, Gergely P, Jr., Banki K, Perl A (2000) Stimulation of the pentose phosphate pathway and glutathione levels by dehydroascorbate, the oxidized form of vitamin C. *FASEB J* 14:1352-1361.

Qiu S, Li L, Weeber EJ, May JM (2007) Ascorbate transport by primary cultured neurons and its role in neuronal function and protection against excitotoxicity. *J Neurosci Res* 85:1046-1056.

Rebec GV, Pierce RC (1994) A vitamin as neuromodulator: ascorbate release into the extracellular fluid of the brain regulates dopaminergic and glutamatergic transmission. *Prog Neurobiol* 43:537-565.

Rebec GV, Witowski SR, Sandstrom MI, Rostand RD, Kennedy RT (2005) Extracellular ascorbate modulates cortically evoked glutamate dynamics in rat striatum. *Neurosci Lett* 378:166-170.

Reiter RJ (1995) Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *FASEB J* 9:526-533.

Rice ME (1999) Ascorbate compartmentalization in the CNS. *Neurotox Res* 1:81-90.

Rice ME (2000) Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the brain. *Trends Neurosci* 23:209-216.

Rice ME, Russo-Menna I (1998) Differential compartmentalization of brain ascorbate and glutathione between neurons and glia. *Neuroscience* 82:1213-1223.

Ridet JL, Malhotra SK, Privat A, Gage FH (1997) Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci* 20:570-577.

Robel S, Berninger B, Gotz M (2011) The stem cell potential of glia: lessons from reactive gliosis. *Nat Rev Neurosci* 12:88-104.

Robel S, Berninger B, Gotz M (2011) The stem cell potential of glia: lessons from reactive gliosis. *Nat Rev Neurosci* 12:88-104.

Rossi DJ, Oshima T, Attwell D (2000) Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature* 403:316-321.

Rumsey SC, Kwon O, Xu GW, Burant CF, Simpson I, Levine M (1997) Glucose transporter isoforms GLUT1 and GLUT3 transport dehydroascorbic acid. *J Biol Chem* 272:18982-18989.

Rumsey SC, Daruwala R, Al-Hasani H, Zarnowski MJ, Simpson IA, Levine M (2000) Dehydroascorbic acid transport by GLUT4 in *Xenopus* oocytes and isolated rat adipocytes. *J Biol Chem* 275:28246-28253.

Savini I, Rossi A, Pierro C, Avigliano L, Catani MV (2008) SVCT1 and SVCT2: key proteins for vitamin C uptake. *Amino Acids* 34:347-355.

Savini I, Catani MV, Rossi A, Duranti G, Melino G, Avigliano L (2002) Characterization of keratinocyte differentiation induced by ascorbic acid: protein kinase C involvement and vitamin C homeostasis. *J Invest Dermatol* 118:372-379.

Savini I, Catani MV, Duranti G, Ceci R, Sabatini S, Avigliano L (2005) Vitamin C homeostasis in skeletal muscle cells. *Free Radic Biol Med* 38:898-907.

Siesjo BK (1978a) Brain energy metabolism and catecholaminergic activity in hypoxia, hypercapnia and ischemia. *J Neural Transm Suppl*:17-22.

Siesjo BK (1978b) Brain metabolism and anaesthesia. *Acta Anaesthesiol Scand Suppl* 70:56-59.

Siesjo BK (1980) Cerebral metabolic rate in hypercarbia--a controversy. *Anesthesiology* 52:461-465.

Siesjo BK, Rehnström S (1980) [Mechanisms of brain cell damage in hypoxia and ischemia]. *Anesteziol Reanimatol*:16-19.

Simpson IA, Carruthers A, Vannucci SJ (2007) Supply and demand in cerebral energy metabolism: the role of nutrient transporters. *J Cereb Blood Flow Metab* 27:1766-1791.

Siushansian R, Wilson JX (1995) Ascorbate transport and intracellular concentration in cerebral astrocytes. *J Neurochem* 65:41-49.

Siushansian R, Dixon SJ, Wilson JX (1996) Osmotic swelling stimulates ascorbate efflux from cerebral astrocytes. *J Neurochem* 66:1227-1233.

Siushansian R, Tao L, Dixon SJ, Wilson JX (1997) Cerebral astrocytes transport ascorbic acid and dehydroascorbic acid through distinct mechanisms regulated by cyclic AMP. *J Neurochem* 68:2378-2385.

Sofroniew MV, Vinters HV (2010) Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119:7-35.

Song JH, Shin SH, Ross GM (1999) Prooxidant effects of ascorbate in rat brain slices. *J Neurosci Res* 58:328-336.

Song JH, Shin SH, Ross GM (2001) Oxidative stress induced by ascorbate causes neuronal damage in an in vitro system. *Brain Res* 895:66-72.

Song JH, Shin SH, Chung IM (2002) Effects of glutamate on dehydroascorbate uptake and its enhanced vulnerability to the peroxidation in cerebral cortical slices. *Exp Mol Med* 34:419-425.

Sotiriou S, Gispert S, Cheng J, Wang Y, Chen A, Hoogstraten-Miller S, Miller GF, Kwon O, Levine M, Guttentag SH, Nussbaum RL (2002) Ascorbic-acid transporter Slc23a1 is essential for vitamin C transport into the brain and for perinatal survival. *Nat Med* 8:514-517.

Spector R, Lorenzo AV (1973) Ascorbic acid homeostasis in the central nervous system. *Am J Physiol* 225:757-763.

Thompson RJ, Macvicar BA (2008) Connexin and pannexin hemichannels of neurons and astrocytes. *Channels (Austin)* 2:81-86.

Thorens B, Mueckler M Glucose transporters in the 21st Century. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298:E141-145.

Thorens B, Mueckler M (2010) Glucose transporters in the 21st Century. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298:E141-145.

Tsukaguchi H, Tokui T, Mackenzie B, Berger UV, Chen XZ, Wang Y, Brubaker RF, Hediger MA (1999) A family of mammalian Na⁺-dependent L-ascorbic acid transporters. *Nature* 399:70-75.

Upston JM, Karjalainen A, Bygrave FL, Stocker R (1999) Efflux of hepatic ascorbate: a potential contributor to the maintenance of plasma vitamin C. *Biochem J* 342 (Pt 1):49-56.

Vaishnavi SN, Vlassenko AG, Rundle MM, Snyder AZ, Mintun MA, Raichle ME (2010) Regional aerobic glycolysis in the human brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:17757-17762.

Vander Heiden MG, Locasale JW, Swanson KD, Sharfi H, Heffron GJ, Amador-Noguez D, Christofk HR, Wagner G, Rabinowitz JD, Asara JM, Cantley LC (2010)

Evidence for an alternative glycolytic pathway in rapidly proliferating cells. *Science* 329:1492-1499.

Vannucci RC, Vannucci SJ (2000) Glucose metabolism in the developing brain. *Semin Perinatol* 24:107-115.

Vannucci SJ (1994) Developmental expression of GLUT1 and GLUT3 glucose transporters in rat brain. *J Neurochem* 62:240-246.

Vannucci SJ, Gibbs EM, Simpson IA (1997) Glucose utilization and glucose transporter proteins GLUT-1 and GLUT-3 in brains of diabetic (db/db) mice. *Am J Physiol* 272:E267-274.

Vera JC, Rivas CI, Fischbarg J, Golde DW (1993) Mammalian facilitative hexose transporters mediate the transport of dehydroascorbic acid. *Nature* 364:79-82.

Vilchez D, Ros S, Cifuentes D, Pujadas L, Valles J, Garcia-Fojeda B, Criado-Garcia O, Fernandez-Sanchez E, Medrano-Fernandez I, Dominguez J, Garcia-Rocha M, Soriano E, Rodriguez de Cordoba S, Guinovart JJ (2007) Mechanism suppressing glycogen synthesis in neurons and its demise in progressive myoclonus epilepsy. *Nat Neurosci* 10:1407-1413.

von Zastrow M, Tritton TR, Castle JD (1986) Exocrine secretion granules contain peptide amidation activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:3297-3301.

Welch RW, Wang Y, Crossman A, Jr., Park JB, Kirk KL, Levine M (1995) Accumulation of vitamin C (ascorbate) and its oxidized metabolite dehydroascorbic acid occurs by separate mechanisms. *J Biol Chem* 270:12584-12592.

Wilson JX (2002) The physiological role of dehydroascorbic acid. *FEBS Lett* 527:5-9.

Wilson JX (2005) Regulation of vitamin C transport. *Annu Rev Nutr* 25:105-125.

Wilson JX, Dixon SJ (1989) Ascorbic acid transport in mouse and rat astrocytes is reversibly inhibited by furosemide, SITS, and DIDS. *Neurochem Res* 14:1169-1175.

Wilson JX, Peters CE, Sitar SM, Daoust P, Gelb AW (2000) Glutamate stimulates ascorbate transport by astrocytes. *Brain Res* 858:61-66.

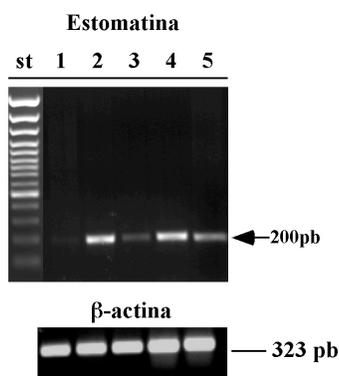
Wolf G (1996) The mechanism of uptake of ascorbic acid into osteoblasts and leukocytes. *Nutr Rev* 54:150-152.

Yarowsky P, Kadekaro M, Sokoloff L (1983) Frequency-dependent activation of glucose utilization in the superior cervical ganglion by electrical stimulation of cervical sympathetic trunk. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:4179-4183.

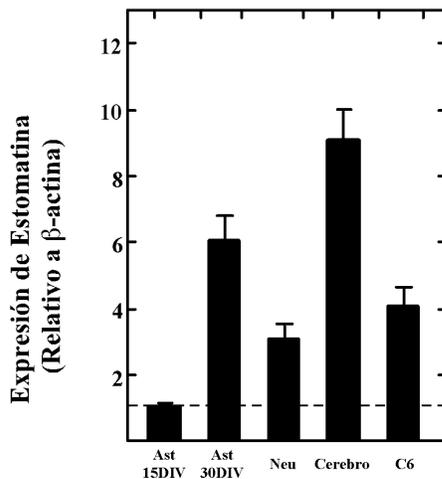


IX.- ANEXO 1

A



B



Anexo 1: Expresión del mRNA de la proteína estomatina en cultivos de astrocitos y neuronas.

Los astrocitos fueron extraídos desde cerebros de 1 día PN y fueron mantenidos en cultivo por 15 y 30 días. Las neuronas fueron extraídas desde cerebros embrionarios y fueron mantenidas en cultivo por 5 días. **A.** Análisis de RT-PCR de estomatina. Los productos de RT-PCR de estomatina se obtuvieron amplificando ADNs de astrocitos de 15 y 30 DIV (líneas 1 y 2, respectivamente), neuronas de 5 DIV (línea 3), cerebro total (línea 4) y la línea tumoral C6 (línea 5). **D.** Cuantificación de la intensidad de la banda obtenida en el ensayo de RT-PCR de la figura A, en relación a la expresión del gen de referencia β -actina.