



**Posible tráfico de ATP mediado por lanzaderas de ATP en
el cilio olfatorio y movimiento de glucosa a través de la
mucosa olfatoria.**

**Tesis Entregada a la Universidad De Chile
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos
Para Optar Al Grado De
Magíster en Ciencias Biológicas**

Facultad De Ciencias

Claudia Macarena Acevedo Rozas

Marzo, 2019

**Directores de Tesis: Dra. Cecilia Vergara Montecinos
Dr. Juan Bacigalupo Vicuña**

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magíster presentada por la candidata.

Claudia Macarena Acevedo Rozas

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias con mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 14/03/2019.

Director de Tesis:

Dra. Cecilia Vergara

.....

Co-Director de Tesis:

Dr. Juan Bacigalupo

.....

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dra. Ana Preller

.....

Dr. Elias Utreras

.....

Dedicatoria

*Dedico esta tesis a mi amado marido Andrés, un
inigualable compañero de vida y padre, a mi adorada
hija Samanta mi luz y mi principal fuerza
motivacional y a mi querida madre,
el apoyo incondicional y soporte de mi vida.*

Biografía



Nací un 1 marzo del año 1985 en un pequeño pueblo llamado Peumo, ubicado en la VI región de Chile, en donde cursé mi enseñanza básica en una escuela municipal con excelentes profesores, rodeada de un ambiente familiar y la tranquilidad propios de la vida rural. Como todos los peuminos tuve que migrar para poder estudiar, primero a San Fernando donde realicé mi enseñanza media y posteriormente a Santiago donde ingresé a la Pontificia Universidad Católica a estudiar Bioquímica. Los motivos que me llevaron a estudiar ciencias van desde una curiosidad por comprender los fenómenos que nos rodean hasta la satisfacción que produce el conocimiento con sentido; y escogí específicamente esa carrera por encontrar en ella una equilibrada combinación de varias ramas científicas. Por otro lado, siempre tuve habilidades para transmitir el conocimiento de las ciencias. En la época escolar, disfrutaba enseñar a mis compañeras de colegio aplicando maneras didácticas de explicar los fenómenos naturales. Dado lo anterior, obtuve la carrera de Pedagogía y posteriormente un Magíster en Educación. Hace tres años decidí nuevamente ingresar al mundo de la ciencia aplicada con la presente tesis de Magíster, debido a que la ciencia experimental y la generación de conocimiento es algo que me genera enormes emociones y satisfacciones que difícilmente se pueden obtener en otras áreas. Este Magíster me ha dejado enormes enseñanzas y reencantado con esa niña curiosa y amante de lo que realiza.

Agradecimientos

- Cecilia Vergara y Juan Bacigalupo, por ser los mejores tutores que puedo haber tenido y excelentes personas.
- Pabla Aguirre, por ser una amiga fuerte y valiosa que me transmitió su conocimiento desinteresadamente.
- Ricardo Delgado, por ser un profesor con mucha paciencia y un apoyo con sus rigurosos conocimientos.
- Lorena Saragoni, por ayudarme a obtener en el microscópio las hermosas imágenes de esta tesis.
- Juan Fernández, por facilitarme un reactivo y ayudarme a planificar un protocolo, siempre con una gran amabilidad.
- Pablo Lazcano, por ayudarme en mis primeros experimentos y guiarme sobre conceptos olvidados.
- Cristina Olmos, por tener mucha paciencia y facilitarme reactivos y materiales.
- Casilda Mura, por transmitirme su pasión por la ciencia y la importancia de la rigurosidad en mis experimentos.
- Gina Sánchez, por ayudarme a realizar los western blot y su amabilidad.
- Claudia Carvalho, por facilitarme materiales necesarios para mis experimentos y su sonrisa motivacional en el laboratorio.
- Julio Alcayaga, por ser una fuente infinita de conocimiento y un excelente docente.
- Alexia Nuñez, por ser un ejemplo de científica y ayudarme a terminar mis experimentos.
- Jannette Bravo, por su agradable sonrisa y sus palabras de apoyo para que esta tesis se llevara a cabo.
- Danny Acevedo, por su incansable trabajo en el laboratorio y las interesantes conversaciones de la hora del café.

ÍNDICE

RESUMEN	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUCCIÓN.....	10
1.1 La importancia del olfato.....	10
1.2 Aspectos anatómicos de la mucosa olfatoria.	11
1.3 Bioquímica de la transducción de la señal olfatoria.	12
1.4 ¿Cómo se supe de ATP el cilio considerando su geometría?.....	13
1.5 La glucosa como sustrato metabólico.....	19
1.6 El lactato y el glicógeno como fuentes de energía.	21
2. HIPÓTESIS.....	23
3. OBJETIVOS.....	24
3.1 OBJETIVO GENERAL.....	24
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
4.1 Animales.....	25
4.2 Obtención de células disociadas para inmunocitoquímica.	25
4.3 Inmunofluorescencia.	25
4.4 Extracción de ARN total de tejidos.....	27
4.5 Extracción de RNA total y síntesis de ADNc desde neuronas olfatorias individuales.....	28
4.6 RT-PCR de tejidos y neuronas disociadas.....	28
4.7 Aislamiento de una fracción de membrana enriquecida en cilios olfatorios.....	30
4.8 Western Blot.	30
5 RESULTADOS	32
5.1 La lanzadera de ATP creatina kinasa B se expresa en el cilio de la neurona olfatoria.....	32
5.2 La lanzadera de ATP Adenilato Kinasa se expresa en el cilio de la neurona olfatoria.	34
5.3. Presencia y distribución de glucosa-6-fosfatasa en la mucosa olfatoria.....	38
6 DISCUSIÓN.....	45
6.1 La Adenilato Kinasa.....	45
6.2 La Creatina Kinasa.....	46
6.3 Relación entre ambas lanzaderas de ATP y las fuentes de energía.....	47

6.4 El suministro de glucosa como sustrato metabólico.....	49
6.5 Lactato como otro posible sustrato metabólico.....	50
7 CONCLUSIÓN	53
8. REFERENCIAS	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de una sección sagital a través de la cabeza humana, con una sección del sistema nervioso olfatorio representada con mayor detalle.....	11
Figura 2. Representación esquemática de la vía de transducción de señales olfativas dentro de los cilios de NSOs	13
Figura 3. La neuronas sensoriales olfatorias expresan creatina kinasa BB (CK-BB) en el cilio.....	36
Figura 4. La neuronas sensoriales olfatorias expresan Adenilato Kinasa (AK) en el cilio	40
Figura 5. Las glándulas de Bowman y las células sustentaculares expresan G6Pasa3.....	43
Figura 6. CK es una enzima de regeneración de ATP rápida y un sensor de bajo umbral para ADP	47
Figura 7. El sistema CK/PCr representado como un “temporal” y “espacial” amortiguador de energía o sistema “lanzadera de energía”.....	48
Figura 8. Esquema explicativo del mecanismo de equilibrio de los niveles de ATP en un cilio y del flujo de glucosa desde la sangre al moco	52

LISTA DE ABREVIATURAS

ACIII: Adenilato ciclasa III

AK4: Adenilato kinasa 4

BSA: albúmina de suero de bovino

CK-BB: creatina kinasa isoenzima cerebral.

Cr: Creatina.

CS: célula sustentaculares

EO: Epitelio olfatorio.

G6Pasa: Glucosa-6-fosfatasa.

GLUT: Lanzadera de glucosa.

NSO: Neurona sensorial olfatoria

NSO: Neurona sensorial olfatoria.

PCr: Fosfocreatina.

ROs: Receptores de odorantes.

RESUMEN

La transducción de olores en los cilios de las neuronas sensoriales olfatorias implica varias enzimas que requieren ATP. Existe evidencia que el ATP se genera por glicólisis en el lumen ciliar, utilizando glucosa incorporada del moco circundante y por fosforilación oxidativa en las mitocondrias del botón dendrítico. Sin embargo, de acuerdo a consideraciones geométricas propias de la estructura de las neuronas y la longitud del cilio, no hay claridad de como se mantienen constantes los niveles de ATP a lo largo de ellos, sobretodo durante la estimulación prolongada. Utilizamos inmunofluorescencia, RT-PCR e inmunotransferencia para explorar posibles mecanismos que explicarían como se mantiene la homeostasis de ATP a lo largo de estas estructuras. Encontramos lanzaderas de ATP o “ATP-shuttles” como la adenilato y creatina kinasas, que son enzimas que dentro de sus funciones poseen la capacidad de equilibrar el ATP en estructuras alargadas y de alta demanda energética como los cilios. También investigamos una enzima, glucosa-6-fosfatasa 3, que estaría involucrada en el suministro de glucosa en la mucosa olfatoria desde los vasos sanguíneos hacia la mucosidad, la detectamos en las células sustentaculares y las glándulas de Bowman. Esta enzima es crucial para el proceso de secreción de la glucosa, lo que implica a ambos tipos celulares en el proceso de transporte de glucosa dentro de la mucosa olfatoria. Con base en nuestros resultados proponemos un modelo que explica como se mantiene el equilibrio del ATP dentro del cilio y como la glucosa se transporta desde los vasos sanguíneos al moco.

ABSTRACT

Odor transduction in the cilia of olfactory sensory neurons involves several ATP-requiring enzymes. There is evidence that ATP is generated by glycolysis in the ciliary lumen, using glucose incorporated from surrounding mucus, and by oxidative phosphorylation in the mitochondria of the dendritic knob, however, according to the geometric characteristics of the structure of the neurons and the length of the cilia, there is no clarity on how ATP levels are maintained throughout them, especially during prolonged stimulation. We use immunofluorescence, RT-PCR and immunoblotting to explore possible mechanisms that would explain how ATP homeostasis is maintained throughout these structures. We found "ATP-shuttles" such as adenylates and creatine kinases, which are enzymes that, within their functions, have the ability to balance ATP in long structures with high energetic demands, such as cilia. We also investigated an enzyme, glucose-6-phosphatase 3, that would be involved in the supply of glucose in the olfactory mucosa from the blood vessels to the mucus and we detected it in the sustentacular cells and Bowman's glands. This enzyme is crucial for the process of glucose secretion, which involves both cell types in the process of glucose transport within the olfactory mucosa. Based on our results, we propose a model that explains how the balance of ATP inside the cilium is maintained and how glucose is transported from the blood vessels to the mucus.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La importancia del olfato.

Es de conocimiento general que la percepción y discriminación de una gran cantidad de compuestos químicos volátiles desempeña un papel importante en la supervivencia de muchas especies que dependen de la señalización química de compuestos volátiles para: localizar alimentos, reconocer territorios, identificar a los miembros de sus propio grupo o depredadores, elección de pareja, reconocimiento entre madre e hijo y evitar compuestos potencialmente dañinos (Silva et al. 2015). Todo comienza con una inspiración que lleva aire al epitelio olfativo (EO) donde las moléculas de odorantes se unen a una o más de los aproximadamente 350 tipos de receptores a odorantes (ROs) diferentes en humanos y aproximadamente 1000 receptores en roedores. Posteriormente, se inicia una cascada de transducción de señales que transforma la información química en una señal neuronal que a través de un procesamiento complejo del sistema nervioso central origina la percepción final del olor (Figura 1).

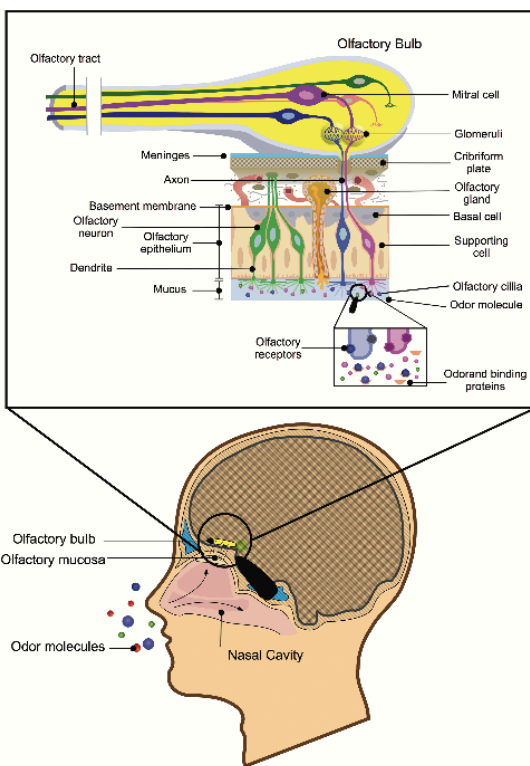


Figura 1. Representación esquemática de una sección sagital a través de la cabeza humana, con una sección del sistema nervioso olfatorio representada con mayor detalle (Silva et al. 2015).

1.2 Aspectos anatómicos de la mucosa olfatoria.

La mucosa que recubre las vías aéreas consta de dos capas: El epitelio de la superficie luminal o epitelio olfatorio y el tejido conectivo subyacente o lámina propia. La mayoría de las superficies lumbinales de la mucosa nasal están cubiertas por un material acuoso y pegajoso llamado moco. Tres tipos de células epiteliales componen el EO, neuronas sensoriales olfatorias (NSOs), células sustentaculares (CSs) y las células basales (Harkema et al. 2006). Las NSOs son neuronas bipolares interpuestas entre las células sustentaculares (Vollrath et al. 1985; Farbman, 1994). Las dendritas de estas neuronas se extienden hasta la superficie epitelial terminando en una protuberancia olfativa bulbosa desde la cual sobresalen en promedio 10-15 cilios inmóviles

(Menco, 1983). Estos cilios, de aproximadamente 50 micras de longitud y 0.1-0.3 micras de diámetro, junto con las microvellosidades de las células sustentaculares se encuentran inmersos en el moco que cubre la superficie, y proporcionan un área superficial extensa para la recepción de odorantes.

1.3 Bioquímica de la transducción de la señal olfatoria.

Las membranas ciliares de las NSOs contienen los receptores a odorantes responsables de la interacción química y la detección inicial de los olores inhalados (Harkema et al. 2006). Las moléculas de odorante se unen y activan las proteínas receptoras localizadas en la membrana de los cilios. Los receptores activados estimulan una proteína G específica de este tejido, G_{olf} , (Pace y Lancet, 1986; Jones and Reed, 1989; Firestein et al. 1991), que a su vez potencia la síntesis de AMPc por la adenilato ciclasa III (ACIII). Este nucleótido abre canales que permean Na^+ y Ca^{2+} (Nakamura y Gold, 1987), despolarizando así la membrana celular. El ingreso de Ca^{2+} permite amplificar la respuesta activando una corriente despolarizante de cloruro (Kleene y Gesteland, 1991b). Las corrientes de despolarización a través de ambos canales generan el potencial del receptor, que se mantiene durante la exposición prolongada a los odorantes y que puede generar potenciales de acción. El Ca^{2+} también está involucrado en el proceso de recuperación y en la adaptación de la respuesta olfatoria al reducir la afinidad aparente de los canales activados por nucleótidos cíclicos para AMPc (Kramer y Siegelbaum, 1992; Chen y Yau, 1994) y estimulando la hidrólisis de AMPc por la fosfodiesterasa (Figura 2) (Borisy et al. 1992).

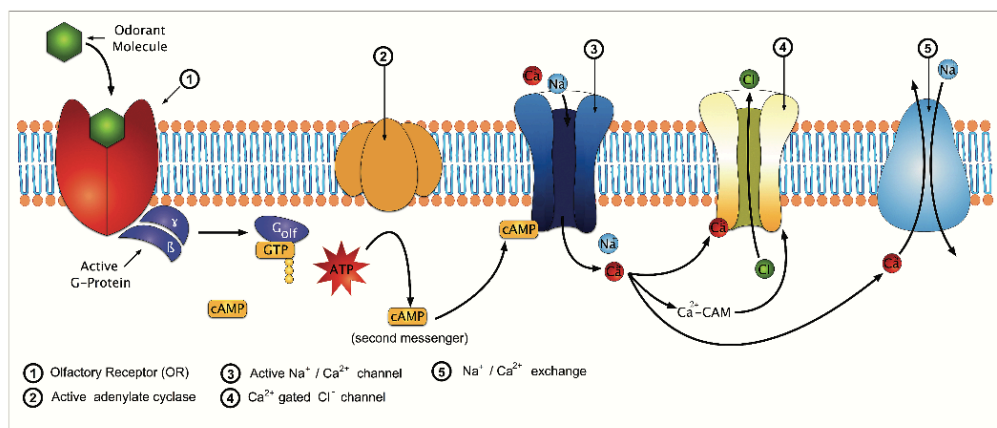


Figura 2. Representación esquemática de la vía de transducción de señales olfativas dentro de los cilios de NSOs (Silva et al. 2015).

Los flujos iónicos en el volumen del cilio (aproximadamente 1 fL), sobre todo en períodos de estimulación prolongada, cambian las concentraciones iónicas ciliares; éstas deben reestablecerse antes de que la célula responda a un segundo estímulo para lo que se requiere de ATP. Aparte de ser requerido por la Na⁺/K⁺ y Ca²⁺ATPasas, el ATP también es ocupado por la ACIII y una variedad de kinasas, como la GPCR-kinasa, Ca²⁺/calmodulina-proteína dependiente de kinaasa tipo II y fosfokinaasa-C (Ronnert y Moon, 2002; Rospars et al. 2010). No se comprende bien cómo los cilios mantienen los niveles de ATP en toda su longitud durante estímulos prolongados con odorantes para satisfacer las demandas de energía de la quimiotransducción.

1.4 ¿Cómo se supe de ATP el cilio considerando su geometría?

El cilio es a menudo considerado como una antena (Berbari et al. 2009; Bloodgood, 2010) que extiende el área de la superficie celular, aumentando la probabilidad de que una molécula de estímulo colisione con un receptor sensorial. Desde este punto de vista, parece óptimo expresar las proteínas de transducción de manera uniforme a lo largo del cilio. El pequeño diámetro de los cilios no permite la presencia de mitocondrias. El ATP difunde hacia el cilio desde las pocas

mitocondrias que se encuentran en el botón dendrítico (~2; Fluegge et al. 2012) Los niveles de ATP luminal en el cilio no se han medido, pero en condiciones de reposo es posiblemente 1 mM, la típica concentración citoplasmática. Por lo tanto, suponiendo que el coeficiente de difusión de ATP dentro de un cilio sea el mismo que en el citoplasma (Aproximadamente $0.9 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 / \text{s}$) (Vendelin et al. 2008), es poco probable que el ATP generado en el botón pueda alcanzar regiones distantes del cilio, especialmente durante la actividad de quimiotransducción prolongada, cuando su disponibilidad efectiva disminuiría drásticamente. Una molécula de ATP probablemente se mueve alrededor de 10 μm en 500 ms cuando los cilios están en reposo (Vendelin et al. 2008). Bajo regímenes de exposiciones a odorantes intensas, como ocurre naturalmente, el consumo de ATP aumenta a lo largo de todo el cilio por lo cual su disponibilidad efectiva se reduce drásticamente. Por lo tanto, el ATP luminal se debe reponer de manera constante y eficiente para prevenir la fatiga metabólica, especialmente en regiones distantes del botón. Una primera aproximación a explicar esta situación fue estudiada por Villar et al 2017. En ese trabajo se muestra evidencia de que aparte de la fosforilación oxidativa, la glicólisis también constituye una fuente de ATP para el proceso de quimiotransducción ya que la inhibición de ambos procesos disminuye notoriamente la respuesta a odorantes.

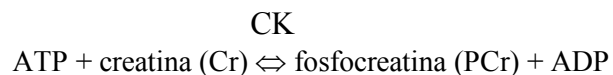
Un estudio teórico de los niveles de ATP en estructuras de tipo ciliar donde el ATP es suministrado por una fuente puntual y es hidrolizado en toda su longitud demostró que para que estos niveles no disminuyan a niveles no funcionales se requiere necesariamente de sistemas de regeneración de ATP tipo lanzaderas (ATP shuttles) cuando las estructuras tienen longitudes mayores que 20 μm (Raff y Bloom, 1968).

Se han encontrado sistemas de lanzadera de fosfocreatina y de fosfoarginina en el erizo de mar y en el flagelo del espermio del cangrejo herradura (Tombes y Shapiro 1985, Strong y Ellington 1993 respectivamente). Noguchi et al. (2001) detectaron actividad arginina kinasa en los cilios de *P. caudatum* y demostraron que un sistema lanzadera de fosfoarginina es funcional en sus cilios.

Culbertson (1966) mostró la presencia de adenilato kinasa en cilios de protozoos, y Villar et al. propusieron que esta kinasa podría estar presentes en los cilios olfatorios cumpliendo un rol de lanzaderas de ATP (Villar et al. 2017). Los fosfágenos se definen como compuestos orgánicos de fosfato (como fosfocreatina o fosfoarginina) que almacenan energía y participan de la homeostasis del ATP. En caso de demandas repentinas de mucha energía, estos compuestos pueden mantener una reserva de fosfatos que pueden usarse según sea necesario, para proporcionar la energía que no podría ser suministrada inmediatamente por la glicólisis o la fosforilación oxidativa. La mayoría de los fosfágenos suministran energía de forma inmediata, pero de forma limitada, en comparación con el ATP (Cosson 2013).

Estas enzimas lanzaderas catalizan reacciones reversibles. Las fosfágeno-kinasas se expresan típicamente en células que presentan tasas elevadas y variables de recambio de ATP. Entre las fosfágeno-kinasas más estudiadas en eucariontes se encuentran:

- Fosfocreatina kinasa: la CK cataliza la conversión de creatina (Cr) en fosfocreatina (PCr) consumiendo adenosintrifosfato (ATP) y generando adenosindifosfato (ADP). Esta reacción de la enzima CK es reversible, de modo que también se puede generar ATP a partir de PCr y ADP.



- Adenilato kinasa: esta enzima permite sintetizar un ATP a partir de 2 moléculas de ADP. Esta reacción enzimática es reversible.



No obstante, el problema del suministro de ATP no se limita a estructuras flagelares o ciliares. Muchas células, especialmente las células musculares y nerviosas, deben transferir el ATP desde la mitocondria al sitio de consumo de energía y devolver los productos ADP y Pi a través de un medio celular altamente estructurado; esto se realiza mediante una cadena de transferencia de flujo o lanzadera (Ford 2006). Si el producto se agrega en un extremo y se elimina en el otro, se establece un sistema de transporte eficiente (Dzeja y Terzic, 2003). Se ha propuesto que las lanzaderas creatina kinasa, adenilato kinasa y fosfoglicerato kinasa transfieren ATP fuera de la mitocondria y devuelven ADP, mientras que la anhidrasa carbónica y las lanzaderas de GAPDH se propone que devuelvan iones de hidrógeno y Pi, respectivamente, a la mitocondria (Cosson 2013).

La actividad de la adenilato kinasa (AK) se ha demostrado no solo en espermatozoides de mamíferos, sino también en cilios y flagelos de una variedad de eucariotas inferiores, incluyendo *C. reinhardtii*; algunas de estas enzimas están ancladas al axolema (Watanabe y Flavin, 1976; Ginger et al. 2005). Los ratones knockout de adenilato kinasa muestran una disminución de la eficiencia energética del rendimiento contráctil. Se encontró un desbalance no solo en la glicólisis sino también en el sistema CK y otras fosfotransferasas (Janssen et al. 2000), lo que sugiere que, al menos en algunos casos, esta enzima es importante no solo como lanzadera sino también permitiendo un balance entre ATP y ADP + AMP para un metabolismo energético eficiente. (Mitchell et al. 2005). Seis AKs, (AK1-AK6), han sido identificadas en vertebrados. Entre los miembros de la familia AK, la principal isoenzima es la AK1 y se encuentra en el citosol de tejidos con altas demandas energéticas (por ejemplo, músculo esquelético). Mientras que la AK2 es expresada de forma más ubicua y se localiza principalmente en la mitocondria (Noma 2005). Debido a que las AK tienen una constante de equilibrio cercana a 1, se mantiene la carga energética del adenilato en un valor relativamente constante, por lo que en lugares donde el ATP se utiliza rápidamente, por ejemplo, en el flagelo del espermatozoide la reacción es en la dirección de la producción de ATP, lo que permite que la célula libere la energía durante períodos de alto consumo

neto (Cao et al. 2006). Las distintas isoenzimas de las AK tienen diferentes patrones de expresión y/o localización. Cao et al. si bien se centraron en el estudio de AK1 y AK2, encontraron ARNm correspondiente a todas las isoenzimas de AK conocidas en células germinales. El *Trypanosoma brucei* expresa 7 genes de adenilato kinasa (Ginger et al. 2005). También se encuentran múltiples AK en el flagelo de *Chlamydomonas reinhardtii* (Zhang et al. 2004).

La isoenzima AK3 está presente en la matriz mitocondrial y prefiere a GTP por sobre ATP como sustrato. La isoenzima AK1 participa en el metabolismo energético cuando los niveles locales de fosfatos de alta energía son bajos, manteniendo los niveles de ATP a expensas del ADP. Las isoenzimas de las AKs mitocondriales funcionan en el rescate del AMP, ya que este nucleótido de adenina se acumula en períodos de alta demanda energética. Al no poder ingresar a la mitocondria y fosforilarse, se perdería por desaminación. Una de estas AKs mitocondriales corresponde a la AK4 que ha sido localizada en el sistema nervioso central durante el periodo embrionario en rata y ratón (Yoneda et al 1998). La expresión del ARNm de AK4 está restringida al hipocampo, el cerebelo, el neuroepitelio olfatorio y el hígado desde la etapa embrionaria hasta el adulto (Tanabe et al. 1993). La AK4 actúa más bien sobre mecanismos del metabolismo energético inusuales más que en el control de la homeostasis del ADP ubicuo, sobre los cuales actúa la AK3. Así, esto sugiere que al menos dos tipos de AKs existentes están involucradas en los diferentes requerimientos de energía en varios tejidos. Además, es posible que la función de AK4 no sea solo en el metabolismo energético, más bien está relacionada con el control del metabolismo de ATP/GTP para la transducción de señales intracelulares, producción de neurotransmisores o los factores neurotróficos y neuroprotectores en caso de isquemia (Yoneda et al 1998).

Por su parte, la enzima creatina fosfoquinasa (CK) está involucrada en el transporte de fosfato desde el sitio de la síntesis de ATP al sitio de su utilización en compartimientos citoplásmicos más distales en tipos de células musculares y no musculares (Wallimann y Hemmer, 1994). Por otra

parte, debemos considerar que PCr posee una tasa de difusión intracelular mayor que el ATP (D_{iATP} $2.48 \pm 0.33 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ y D_{iPCr} $3.49 \pm 0.33 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$) (Hubley et al. 1995). En los mamíferos se han encontrado cuatro subunidades de CK, cada una de las cuales están codificadas por un gen distinto cuya expresión es específica del tipo celular y están controladas en el desarrollo. Dos subunidades, CK-B (cerebro) y CK-M (músculo), están ubicadas en el citosol, donde son enzimáticamente activas como homodímeros CK-BB o CK-MM, o heterodímeros CK-MB (Wallimann et al. 1992). La segunda función importante que tiene esta enzima es ser un “Shuttle” o lanzadera de ATP; en las células donde los sitios de producción de ATP están alejados de los sitios de hidrólisis, la creatina kinasa actúa como un sistema de transporte de energía (Bessman y Carpenter 1985), tal como propuso Bessman y Geiger (1981) para el músculo esquelético. La enzima creatina kinasa BB ya había sido detectada mediante proteómica en el cilio olfatorio (Mayer et al, 2008).

También desempeña un papel en otros tipos celulares, como las células fotorreceptoras de la retina (Wallimann et al. 1986b; Hemmer et al. 1993) y espermatozoides maduros (Tombes y Shapiro 1985; Wallimann et al. 1986a). Por ejemplo, en los espermatozoides de erizo de mar se han encontrado dos isoenzimas de la enzima que median la formación de fosfocreatina en la parte media (mitocondrial CK-Mi) y regeneran el ATP para la hidrólisis en la cola (citoplasmática CK-T) (Tombes y Shapiro, 1985). La capacidad del axonema para generar ATP a partir de fosfato de creatina y ADP también se ha demostrado con modelos de espermatozoides de erizo de mar sin membrana (Tombes y Shapiro, 1985). En la mayoría de los músculos, la capacidad de regeneración de ATP por parte de CK es muy alta, por ejemplo, la máxima tasa de síntesis de ATP por CK en músculo cardíaco de rata por gramo de tejido es de $30 \mu\text{mol}/\text{s}$, por fosforilación oxidativa de $2.5 \mu\text{mol}/\text{s}$ y por vías *de novo* es $0.39 \mu\text{mol}/\text{s}$ (Wallimann et al. 1992). En adición a la regeneración del ATP hidrolizado, el sistema CK, con CK como sensor de ADP de bajo umbral juega una función crucial

previniendo una acumulación de ADP, especialmente durante periodos en que la utilización de energía excede la producción de la misma.

Dado lo anterior, es altamente probable que “lanzaderas de ATP”, como la creatina kinasa y la adenilato kinasa, puedan mantener la homeostasis de ATP en los cilios de las neuronas olfatorias sobre todo durante un proceso de transducción prolongado.

1.5 La glucosa como sustrato metabólico.

Núñez-Parra et al. 2011, usando técnicas de inmunohistoquímica y RT-PCR, encontraron en la mucosa olfatoria de rata una distribución diferencial de los transportadores de glucosa GLUT 1 y 3 y de monocarboxilato/H⁺ MCT 1 y 2. Esto les sugirió la idea de un acoplamiento energético entre las CSs y los cilios de las NSOs, donde las CSs liberarían glucosa al moco, la cual sería recapturada por las NSOs y utilizada para sus procesos metabólicos. La idea de que la glucosa puede ser utilizada directamente por los cilios es apoyada por varias evidencias: la estrecha relación morfológica entre las CSs y las neuronas olfatorias (Nomura et al. 2004), la presencia de GLUT1 en células de la mucosa endotelial y la presencia de enzimas glicolíticas en los cilios (Castro et. al 2007, Mayer et al. 2008). Además, GLUT3 se encuentra solamente en neuronas del SNC, siendo el transportador con mayor afinidad (1,5 mM) para el transporte de glucosa.

Por su parte, Villar et al. 2017 localizaron el transportador de glucosa GLUT3 en el cilio olfatorio y en las microvellosidades de las CSs, determinando que cuando se bloquean dichos transportadores se perjudica la incorporación de glucosa en las NSOs y CSs; sumado a lo anterior, midiendo la incorporación del análogo fluorescente de glucosa 2-NBDG se sugiere que el cilio olfatorio puede incorporar glucosa desde el moco, probablemente liberado desde las CSs e ingresado por los cilios.

Villar et al. 2017 encontraron que la glucosa suministrada por los vasos sanguíneos de la lámina propia está presente a niveles milimolares en el moco, sin embargo, las vías a través de las cuales la glucosa llega al moco no se han establecido. En general, sus niveles dentro de los cuerpos celulares son extremadamente bajos, ya que una vez que entra en una célula, este azúcar se transforma rápidamente en G6P por la enzima glicolítica glucocinasa. Por lo tanto, para que una célula secrete la glucosa a través de los transportadores de glucosa, la G6P debe ser desfosforilada de nuevo a glucosa por la glucosa-6-fosfatasa. Hay tres isoenzimas conocidas de esta enzima (Marcolongo et al. 2013). La más estudiada es la isoenzima 1 presente en hígado que normalmente se menciona como la isoenzima clásica o G6Pasa; la isoenzima dos, (G6Pasa2), que se encuentra casi exclusivamente en las células β pancreáticas (Goh et al. 2006), y la ubicua G6Pasa3. No se ha determinado qué tipos de células de la mucosa olfativa podrían expresar estas enzimas.

La glucosa-6-fosfatasa, que también se expresa en el riñón, la envoltura nuclear y tiene un papel crítico en la homeostasis de esta azúcar en la sangre (Gamberucci et al. 1996, Forsyth et al 1993). A diferencia de la mayoría de las fosfatasas que actúan sobre los compuestos solubles en agua, la G6Pasa es una enzima unida a membrana, que se asocia con el retículo endoplásmico. Las propiedades de la G6Pasa dependen de la integridad de la membrana microsomal (Van Schaftingen y Gerin, 2002). Los niveles de ARNm de la G6Pasa3 son bajos en el hígado y relativamente altos en cerebro, corazón, músculo esquelético, placenta y riñón, lo que sugiere que las actividades de hidrólisis de la G6P en estos tejidos puede ser catalizada por G6Pasa3 en lugar de G6Pasa1 (Guionie et al 2003). De acuerdo a Guionie et al., el papel de la G6Pasa3 en cerebro y otros tejidos aún no está claro, pero una posibilidad lógica es que suministra glucosa para uso local, es decir, para otros tipos de células en el mismo tejido. La G6Pasa3 se denominó inicialmente “proteína relacionada con G6Pasa ubicua” (UGRP), porque, aunque se expresa predominantemente en cerebro, músculo y riñón, se encontró que se expresaba en todos los tejidos

analizados por Martin et al. (cerebro, corazón, músculo esquelético, colon, timo, bazo, riñón, hígado, intestino delgado, placenta, pulmones y páncreas) (Martin et al. 2002).

1.6 El lactato y el glicógeno como fuentes de energía.

El glicógeno del sistema nervioso central (SNC) se localiza predominantemente en los astrocitos en el adulto, donde se ha demostrado que tiene una variedad de funciones. En condiciones fisiológicas, los aumentos en la demanda de energía tisular que no se satisfacen con la glucosa ambiental están respaldados por el metabolismo del glicógeno (Evans et al. 2013). Este depósito de glicógeno se puede movilizar durante periodos de alta demanda de energía o suministro de energía reducido. La movilización del glicógeno glial resulta en la producción de lactato dentro de este compartimento. Luego, el lactato se libera en el espacio intercelular, donde está disponible para que los axones lo tomen y metabolicen oxidativamente (Brown et al. 2003a). En el SNC, los astrocitos y los oligodendrocitos liberan lactato (Brown et al. 2003a; Lee et al. 2012). De forma similar, el glicógeno contenido en células de Schwann mielinizantes puede seguir la misma ruta (Brown et al. 2012).

El lactato, por su parte, es una potencial fuente de combustible para la sustancia blanca del SNC y los nervios periféricos (Vega et al. 1998). La liberación y captación de lactato ocurre a través de transportadores de monocarboxilato (Tekkok et al. 2005). Recientemente se ha demostrado que los oligodendrocitos expresan la proteína MCT1, lo que indica que los oligodendrocitos también son capaces de suministrar un sustrato extra a los elementos neurales (Lee et al. 2012). Kuhlmann et al. 2014 localizaron, mediante proteómica, la enzima lactato deshidrogenasa en los cilios de las neuronas olfatorias de rata, lo que podría implicar que el lactato fuese otro sustrato metabólico para el proceso de transducción en algunas condiciones. Además, Yeung et al. mediante sus experimentos en espermatozoides humanos, demostró que todos los parámetros cinemáticos eran de una magnitud significativamente mayor en presencia de lactato

comparado con la presencia solo de glucosa (Yeung et al. 1996). Sumado a lo anterior en un análisis por espectrometría de masa de la membrana de cilios olfatorios, se identificó la glicógeno fosforilasa, una enzima clave para la movilización del glicógeno. (Mayer et al. 2008) Esto da pie a pensar en la posible existencia de glicógeno en los cilios.

Es importante establecer si aparte de la fosforilación oxidativa y la glicólisis, hay otros procesos que pudieran generar ATP para suplir la demanda de energía, particularmente bajo situaciones de estimulación intensa. Dadas las últimas consideraciones descritas, no podemos descartar al lactato o el glicógeno.

2. HIPÓTESIS

La adenilato kinasa y la creatina kinasa se encuentran presentes en los cilios olfatorios y la G6Pasa se localiza a lo largo de la mucosa olfatoria.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Investigar la presencia de lanzaderas de ATP como AK y CKBB en los cilios de las neuronas olfatorias y la distribución de la G6Pasa en la mucosa olfatoria.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 3.2.1 Determinar la presencia y ubicación de la fosfocreatina kinasa en el los cilios olfatorios.
- 3.2.2 Determinar la presencia y ubicación de la adenilato kinasa en los cilios olfatorios.
- 3.2.3 Determinar la presencia y ubicación de glucosa-6-fosfatasa en la mucosa olfatoria.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Animales.

Ratas macho Sprague-Dawley (de 18 a 20 días postnatal). Estas ratas fueron compradas en el bioterio de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Los animales fueron anestesiados y sacrificados por inhalación con isoflurano seguido por decapitación. El protocolo de manejo de animales fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad.

4.2 Obtención de células disociadas para inmunocitoquímica.

Las cabezas de las ratas fueron seccionadas de manera sagital y el septum fue removido exponiendo los cornetes. Estos últimos fueron removidos de la cavidad nasal y se colocaron en 2 mL/por cabeza de una solución libre de cationes divalentes (en mM): 140 NaCl, 5 KCl, 10 Glucosa, 10 HEPES, pH 7.4 at 37°C. Las NSO y las CS del epitelio olfatorio fueron aisladas primero del hueso y luego entre ellas por disociación mecánica, por medio de una simplificación del método de Maue y Dionne (Maue y Dionne, 1987), sin tratamiento enzimático. La preparación fue inmediatamente usada para inmunocitoquímica.

4.3 Inmunofluorescencia.

Para la inmunocitoquímica, las células disociadas en suspensión se hicieron pasar suavemente por una punta de pipeta de 1 mL para mejorar el proceso de separación de las NSOs y CSs del epitelio. La suspensión fue transferida a un tubo falcon de 15 mL y centrifugada a 300 rpm por 15 min, el sobrenadante fue desechado y el pellet (donde se concentran las células disociadas) fue resuspendido en paraformaldehido 4% y Taxol 2 μ M, seguido de una lenta agitación a temperatura ambiente por 15 min. Las células ya fijadas fueron centrifugadas a 300 rpm por 15 min, se desechó el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en PBS 1X, repitiendo este proceso de lavado 3 veces. Posteriormente, las células fueron permeabilizadas incubándolas en Triton 0.3% en PBS

1X a temperatura ambiente por 10 min. Para el bloqueo de los sitios de unión inespecíficos, las células fueron incubadas en una solución 2% de BSA por 1 hora. Los anticuerpos primarios fueron disueltos en la misma solución de bloqueo en las siguientes concentraciones: ratón anti-CK-BB 1:100 (ab125114, Abcam), ratón anti-AK4 1:100 (sc-271161, Santa Cruz) conejo anti-G6Pase3 1:250 (bs-13253R, Bioss antibodies) e incubados toda la noche a 4°C con agitación suave. El control negativo fue hecho usando el mismo protocolo anterior, pero omitiendo el anticuerpo primario. Luego de la incubación toda la noche, las células fueron centrifugadas a 3000 rpm por 10 min, el sobrenadante fue desechado y las células fueron lavados dos veces con PBS 1X. A continuación las células fueron incubadas con el anticuerpo secundario; cabra anti-ratón Alexa fluor 488 (ab150113Abcam), ratón anti-conejo Alexa 488 (A27034, Invitrogen), Streptavidin Alexa fluor 488 (S32354, Thermo Fisher) preparados en PBS 1X, por 2 h a temperatura ambiente, en oscuridad y con una lenta agitación. Por último, las células fueron centrifugadas a 300 rpm por 5 min, el sobrenadante fue desechado y se lavaron dos veces en PBS 1X, luego de la última centrifugación a 300 rpm por 10 min se incubaron por 30 min en una solución 50% glicerol en PBS. Para observarlas en el microscopio se utilizaron cubre objetos que se adaptaron para el propósito haciendo un borde de silicona, donde se montaron directamente las células en suspensión.

Para la inmunohistoquímica, una rata de 18 días de edad fue anestesiada con isoflurano y sacrificada por decapitación, se extrajeron los cornetes y se fijaron en paraformaldehído 4% en PBS durante toda la noche a 4°C. El tejido se crioprotegió en sacarosa 30% en PBS durante 16 h a 4°C y se embebió en Tissue-Tek OCT (Sakura Finetek). Se obtuvieron criosecciones coronales de 14 µm en portaobjetos micro slides superfrost Plus (VWR) utilizando un criostato (Micom HM 525).

Las rebanadas de tejido se permeabilizaron y bloquearon con 0.3 % de Triton X-100 en PBS que contenía 5% de BSA durante 2 h a temperatura ambiente. Las criosecciones se incubaron con anticuerpos primarios en 0.3% de Triton X-100 en PBS conteniendo 1% de BSA durante toda la

noche a 4°C, posteriormente se lavaron cuatro veces en PBS y se incubaron con los anticuerpos secundarios fluorescentes por 2 h a temperatura ambiente y en oscuridad y por último fueron montados con FluROsave (Calbiochem). Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: ratón anti-CK-BB 1:100 (ab125114, Abcam), ratón anti-AK4 1:100 (sc-271161, Santa Cruz), conejo anti-ACIII 1:200 (Santa Cruz, sc-588). Los anticuerpos secundarios fueron cabra anti-ratón Alexa Fluor 488 (ab150113 Abcam), cabra anti-conejo Alexa 546 (Invitrogen, A-11035).

Las células disociadas y los tejidos fueron observados en el microscopio confocal invertido (Carl Zeiss LSM 710 Meta, Gottingen, Germany), el procesamiento de las imágenes se realizó con Image J.

4.4 Extracción de ARN total de tejidos.

Luego de anestesiar las ratas por inhalación con isoflurano, fueron decapitadas y se procedió a la extracción de los diferentes tejidos a estudiar los cuales fueron cortados en pequeños trozos de aproximadamente 20 mg (Hígado, Músculo, Pulmón, Cerebelo y Mucosa Olfatoria). Los trozos de tejidos fueron homogeneizados con 800 µL de TRIsure (Bioline) en un homogeneizador de vidrio y en hielo. Luego las muestras fueron incubadas por 5 min a temperatura ambiente y se adicionaron 160 µL de cloroformo seguido de agitación vigorosa con la mano por 15 s y posteriormente incubadas por 3 min a temperatura ambiente. La mezcla se centrifugó a 12.000 g por 15 min a 4°C (centrifuga HETTICH MIKRO 200 R) y se extrajo la fase acuosa e incolora superior la cual se colocó en otro tubo. El ARN se precipitó con 400 µL de alcohol isopropílico frío, fue incubado por 10 min a temperatura ambiente y posteriormente centrifugando a 12.000 g por 10 min a 4°C. El precipitado fue lavado con 800 µL de etanol al 75%, agitando y resuspendiendo. Finalmente se centrifugó a 7.500 g por 5 min a 4 °C. El precipitado se secó al aire y se disolvió en agua tratada con DEPC.

4.5 Extracción de RNA total y síntesis de ADNc desde neuronas olfatorias individuales.

La mucosa olfatoria completa fue extraída con microtijeras y transferida a una placa Petri en una solución libre de RNasas, cuya composición es (en mM): 140 NaCl, 5 KCl, 1 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 HEPES, 10 glucosa, 1 piruvato de sodio, pH 7,4. El epitelio olfatorio fue separado de los cornetes y el tejido fue cuidadosamente disociado con pinzas muy finas. 1 mL de la suspensión celular fue puesta en el centro de una placa petri (35 x 10 mm) que se observó mediante un microscopio invertido (Nikon Eclipse TE2000-S) con un objetivo 40x. Se dejó que las células se asentaran durante aproximadamente 30 min antes de la identificación de NSO individuales mediante inspección visual. Las células se colectaron mediante micropipetas de borosilicato estériles (1~3 MΩ) fabricadas en un estirador (micropipette puller PIP-6 (HEKA Elektronik) y rellenas con la solución libre de RNasa. Las NSOs individuales se introdujeron suavemente en la micropipeta mediante presión negativa y se transfirieron a un tubo de PCR rompiendo la punta de la micropipeta contra el fondo. El contenido del tubo es 16 µL de Buffer PCR (in mM; Tris-HCl, 500 KCl, 6 MgCl₂, 1 DTT (Invitrogen)) 8 U de Rnase OUT (Thermo Fisher) y 1 U DNase (Thermo Fisher). Aproximadamente 150 NSOs fueron recolectados en el mismo tubo rompiendo la punta de 4 micropipetas. El procedimiento continuó con un protocolo de retrotranscripción estándar.

4.6 RT-PCR de tejidos y neuronas disociadas.

La muestra de ARN total de cada tejido y de neuronas disociadas fue retrotranscrita a la primera hebra de ADNc con transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen). Primero se realizó un tratamiento con DNasa donde en un tubo de 0,2 mL libre de RNasa se mezcló: 1 µL de Buffer DNase I 10X (Thermo Fisher), 1 µL DNase I (1U/µL) (Thermo Fisher) y 1 µg de ARN más agua DEPC con un volumen final de 10 µL. La mezcla se agitó por 2 s y luego se incubó a 37°C durante 30 min, luego se agregó 1 µL de DNasa Stop Solution (Thermo Fisher) y se incubó a 65°C por 10

min. La transcripción reversa se inicio agregando 0,4 μL de “random primers” (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Thermo Fisher) y 1,1 μL de agua DEPC, se agitó con vortex 2 s y se incubó a 65°C por 5 min para luego incubar en hielo por 5 min. Luego se agregó 4 μL de 5X “first strand buffer” (Invitrogen), 2 μL de DTT (0,1 M) (Invitrogen), 0.5 μL Ribolock RNase (40 U/ μL) (Thermo Fisher), se incubó por 37°C durante 2 min y se agrego 1 μL de la enzima M-MLV RT (Invitrogen) para finalmente incubar a: 25°C durante 10 min, 37°C por 50 min y 70°C durante 15 min (para detener la reacción). Se guardó el ADNc sintetizado a -20°C para su uso posterior.

Para la amplificación de las secuencias de interés, los partidores fueron diseñados con primer-BLAST o encontrados en literatura. Para los obtenidos con la herramienta digital se usaron las secuencias de ADN condificantes de cada gen en *Rattus norvegicus* como templado; Accession number NM_017135.3 para AK4, Accession number NM_012529.3 para CK-BB y Accession number NM_176077.3 para G6Pse3. Los partidores para G6Pase 1 se obtuvieron de Porter (Porter J.et al. 2003). Cada reacción se llevo a cabo con un volumen final de 50 μl , con los siguientes componentes: 25 μl de My Taq Red Mix 2x (Bioline), 22 μl de agua, 1 μl de partidores (20 μM cada uno) y 1 μl de templado. El siguiente protocolo de PCR fue usado: 1) Denaturación inicial (95°C por 1 min), 2) Denaturación (95°C for 15 s), 3) alineamiento (Ta por 15 s), 4) Extensión (72°C por 10 s). Las secuencias de partidores “Forward” y “Reverse” 5’-3’ son: partidores AK1 (CGGCTTCTTGATTGACGGCT), Tm = 60.5°C y (CACAATGCCGCGTTTGTCAT), Tm = 58.4°C (Ta = 61°C, 30 ciclos); CK-BB (ACCTCAACCCAGACAACCTG), Tm = 57.1°C y (CTGGACAGGGCTTCTACTGC), Tm = 57.6°C (Ta = 55°C, 30 ciclos); AK4 (CTCAAGTGCTGGGGTTGAT), Tm = 60.5°C y (CTGCGTCCTTGTACCGTCTT), Tm = 60.5°C (Ta = 60°C, 35 ciclos); G6Pasa1 (ACTGGTTCAACCTCGTCTT), Tm = 53.6°C y (CGAAAGATAGCGAGAGTAGA), Tm = 50.8°C (Ta = 55°C, 30 ciclos); G6Pasa2 (GCTCAGGGTCACAAGCTCAT), Tm = 60.0°C y (CAGAGCACAGAGCAAGTGGA), Tm =

59.6°C (Ta = 60°C, 30 ciclos); G6Pasa3 (GGTGTATCCTTGGCTGGCT), Tm = 60.5°C y (TCCTAGGTGTACTCGCCGAA), Tm = 60.5°C (Ta = 60 °C, 35 ciclos) repetido por 35 ciclos. Los productos se visualizaron a través de una electroforesis en un gel de agarosa al 2%.

4.7 Aislamiento de una fracción de membrana enriquecida en cilios olfatorios.

Este procedimiento fue realizado de acuerdo al protocolo de Kuhlmann (Kuhlmann. et al. 2014). Los cornetes de 8 ratas macho de 18 días fueron removidos quirúrgicamente y lavados en 1 mL de solución A (20 mM HEPES, 140 mM NaCl, 3 mM KCl, 2 mM MgSO₄, 7.5 mM D-glucose, 5 mM EGTA (pH 7.4)) más 1% de mezcla de inhibidores de proteasas (Roche Diagnostic), y se resuspendieron cuidadosamente en solución B (solución A que contiene 20 mM CaCl₂ y 30 mM KCl). Los cilios fueron separados del epitelio olfatorio por una suave agitación por 20 min a 4°C y separados del tejido remanente por centrifugación por 5 min a 5.000 g y 4°C. El sobrenadante fue colectado en otro tubo; la desciliación fue repetida una vez más. Los sobrenadantes fueron combinados y centrifugados por 30 min a 26.000 g y 4°C. El precipitado resultante contiene los cilios, los cuales se resuspendieron en Na₂CO₃ (pH 11.2) frío y se incubaron en esta solución por 20 min sobre hielo. Una fracción de membrana enriquecida en proteínas de membrana ciliar se obtuvo por centrifugación a 100.000 g por 30 min a 4°C, el pellet fue resuspendido en 3 mM MgCl₂, 2 mM de EGTA en 10 mM Tris (pH 7.4). La concentración de proteína fue estimada usando “dot filter binding assay” con una solución de BSA como estándar.

4.8 Western Blot.

Se prepararon muestras a 2 µg/µL de cada tejido (cerebelo, membrana de cilios y tejidos desciliados), conteniendo 100 mM de DTT y se hirvieron por 10 min. El gel utilizado fue Mini-Protean TGX 4 - 15 % cargado con 20 µL de cada muestra preparada (20 µg). Se corrió los

primeros 20 - 25 min a 90 V y posteriormente a 120 V. La transferencia se hizo en semiseco (Bio rad trans-blot SD) con una membrana de PDVF y se bloqueó con BSA 5% (diluido en TBS-Tween 0,2%) por 1 hora a temperatura ambiente en agitador. El anticuerpo primario se diluyó en la misma solución de bloqueo y se incubó por 1 hora a 35°C. Las diluciones de los anticuerpo primarios fueron: mouse anti-CK-BB 1:50 (ab125114, Abcam), mouse anti-AK4 1:100 (sc-271161, Santa Cruz), mouse anti-Actina 1:5000 (A3853, Sigma), Conejo anti-ACIII 1:200 (Sc-365350). Posteriormente se hicieron 3 lavados con TBS-T 0,2% de 10 min cada uno. Se incubó con el anticuerpo secundario preparado en la misma disolución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavó la membrana 3 veces con TBS-T 0,2% por 10 min cada vez. Se reveló con Supersignal West Pico Plus (Thermo Fisher Scientific). Se analizaron las bandas con ImageJ.

5 RESULTADOS

Para investigar los posibles mecanismos que mantendrían estables los niveles de ATP en el cilio olfatorio, se exploró la expresión de las lanzaderas de ATP Creatina Kinasa y Adenilato Kinasa en el epitelio olfatorio, específicamente en las neuronas olfatorias y sus cilios. Paralelo a lo anterior, se investigó la localización dentro de la mucosa olfatoria de la enzima glucosa-6-fosfatasa que participa en la homeostasis de la glucosa. Por su localización dicha enzima podría dar indicios de una posible vía de transporte de la glucosa desde la lámina propia a través del epitelio, para terminar en el moco. Se abordó esta problemática utilizando herramientas de biología molecular como RT-PCR y western blot, y de biología celular como inmunocitoquímica e inmunohistoquímica.

5.1 La lanzadera de ATP creatina kinasa B se expresa en el cilio de la neurona olfatoria.

Como primera aproximación se evaluó el ARNm de la subunidad CK-BB en neuronas disociadas, que al ser esta la isoenzima cerebral de la CK era la más probable de encontrar en este tejido. La figura 3A (columna 2) muestra la presencia de ARNm de CK-BB en las NSOs; como control positivo se utilizó cerebelo y pulmón como control negativo (columnas 3 y 4, respectivamente). Además se observó la expresión de la proteína en el cilio olfatorio; mediante western blot, la figura 3B muestra una preparación de membrana enriquecida en cilio, en donde se observa claramente la presencia de CK-BB en la fracción de membranas ciliares (columna 1), así como en una preparación de membranas de cerebelo, utilizado como control positivo (columna 2). También se utilizó β -actina como control de carga y ACIII como marcador específico ciliar; la columna 3 corresponde a membranas de mucosa olfatoria con el epitelio olfatorio desciliado. La imagen verifica que en la muestra enriquecida en membrana ciliar se encuentra efectivamente la

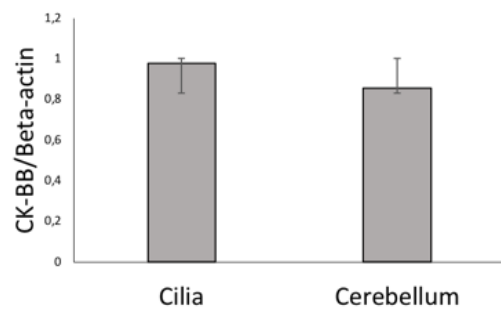
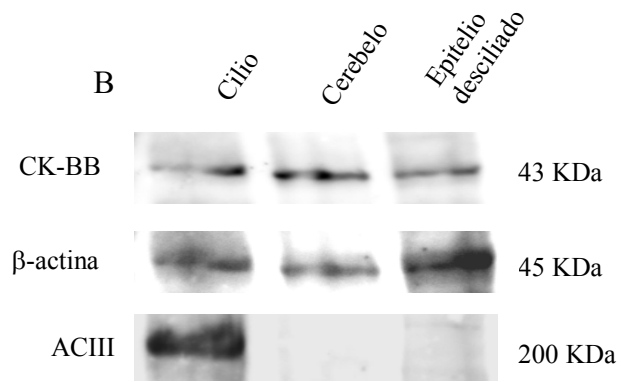
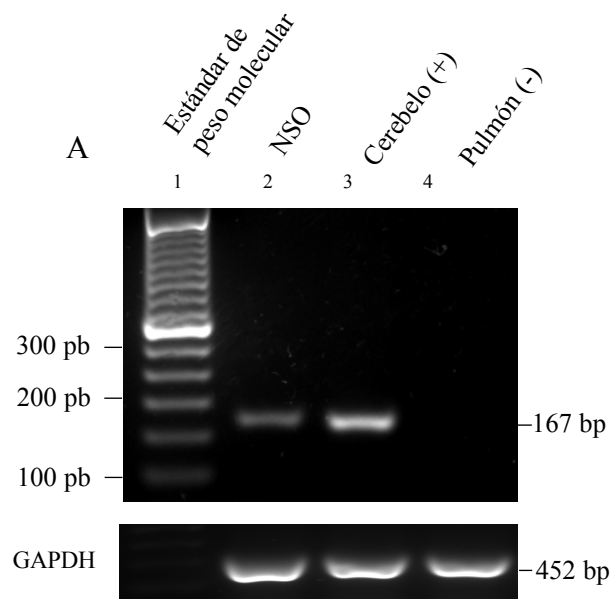
CK-BB. También se muestra un gráfico con una cuantificación de la marca detectada en la preparación de membrana de cilios y de membrana microsomal cerebelar, como control positivo, para los western blot realizados ($n = 4$). Para obtener una evidencia adicional de la localización de la enzima en los cilios olfatorios, se realizó una inmunohistoquímica del epitelio olfatorio. En la figura 3 C-K se observa la localización de la creatina kinasa-BB en toda la neurona, pero especialmente en la capa ciliar (Figura 3 C); esta señal colocaliza con el marcador de cilios ACIII (Figura 3 D y E). Esto se corrobora utilizando como control una inmunohistoquímica del epitelio desciliado (Figura 3 F-H), donde se observa la pérdida de la marca para nuestra proteína de interés junto con la pérdida del marcador ciliar. La figura 3I muestra la imagen de contraste de fase del epitelio ciliado, la figura 3J es el control negativo para CK-BB; la figura 3K el control negativo para ACIII. Los controles corresponden al tejido sin anticuerpo primario. Adicionalmente, hicimos inmunocitoquímica de neuronas sensoriales olfatorias disociadas marcadas con el anticuerpo contra CK-BB (Figuras 3L-P), donde se observa claramente la localización de esta enzima en los cilios de una neurona olfatoria representativa (Figura 3M, inmunofluorescencia para CK-BB, la figura N muestra la superposición de la imagen de contraste de fase y la inmunofluorescencia, más un recuadro aumentado del botón de la dendrita y los cilios). El control negativo es sin anticuerpo primario (Figura 3O-P).

Estos últimos resultados apoyan fuertemente lo observado en el western blot e inmunofluorescencias, indicando la localización de esta enzima lanzadera de ATP en los cilios de las neuronas olfatorias, lo cual sugiere su participación en la homeostasis del ATP en el cilio.

5.2 La lanzadera de ATP Adenilato Kinasa se expresa en el cilio de la neurona olfatoria.

Mediante RT-PCR de mucosa olfatoria completa de rata se evaluaron todas las isoenzimas conocidas para AK y se encontró la AK4. Con esta información, se hizo un RT-PCR de neuronas disociadas, para asegurarse que el ARNm provenía específicamente de las dichas células, detectándose ARNm de AK4 (Figura 4A, columna 6); cerebelo como control positivo (Figura 4A, columna 7) y pulmón como control negativo (Figura 4A, columna 8). No obstante, de acuerdo a la literatura la AK1 debería encontrarse en los cilios de las neuronas olfatorias, por lo que también se realizó RT-PCR de neuronas disociadas para esta isoenzima, encontrándose el transcrito en las neuronas disociadas (Figura 4A, columna 2); músculo como control positivo (Figura 4A, columna 3) e hígado como control negativo (Figura 4A, columna 4). Un western blot de una preparación enriquecida de membranas ciliares y cerebelares (control positivo) sugiere que la protefán AK se expresa efectivamente en el cilio (Figura 4B). También se muestra un gráfico con una cuantificación de la marca detectada en la preparación de membrana de cilios y de membrana microsomal cerebelar, como control positivo para los western blot realizados (n = 4). Esto último fue confirmado con una inmunohistoquímica; la figura 4 C-K muestra la enzima AK localizada en toda la neurona, especialmente en la capa ciliar (Figura 4C), donde colocaliza con el marcador de cilios ACIII (Figuras 4D y E). En el epitelio desciliado desaparece la marca para AK4 y ACIII, como es esperable, pero permanece la marca para AK4 en la región de los somas (Figuras 4 F-H). Como control negativo se incubó sin el anticuerpo primario (Fig 4I, contraste de fase), no observándose marca para ACIII ni para AK4 (Figura 4J-K). Luego, con inmunocitoquímica de neuronas disociadas (Figura 4 L-P) se localiza la proteína en los cilios. Figura 4L, contraste de fase de una neurona disociada; figura 4M, inmunofluorescencia con un anticuerpo anti-AK4; figura 4N, superposición de las imágenes F y G, con un recuadro del botón de la dendrita y los cilios aumentados. El control negativo es sin anticuerpo primario (Figura 4 O-P). Estos resultados

muestran que la lanzadera de ATP AK, se localiza en los cilios y podría estar implicada en la homeostasis de ATP dentro del cilio olfatorio.



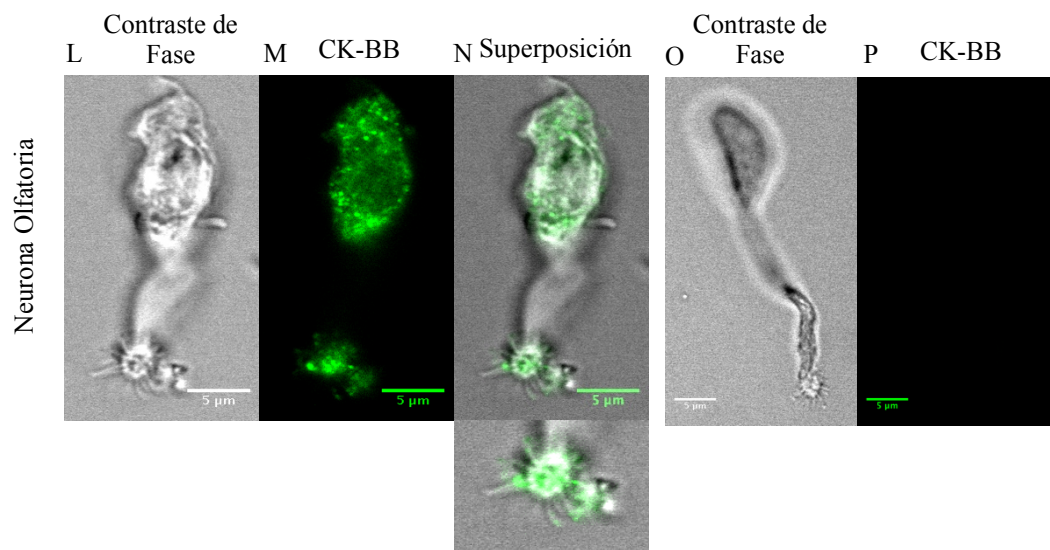
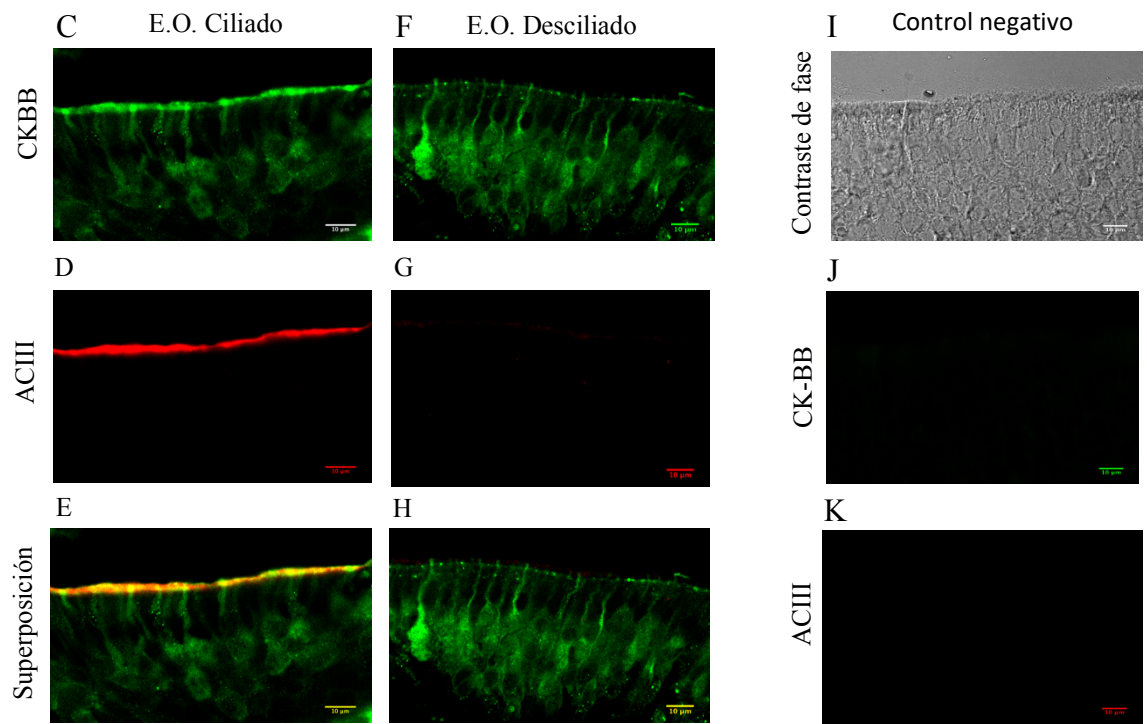
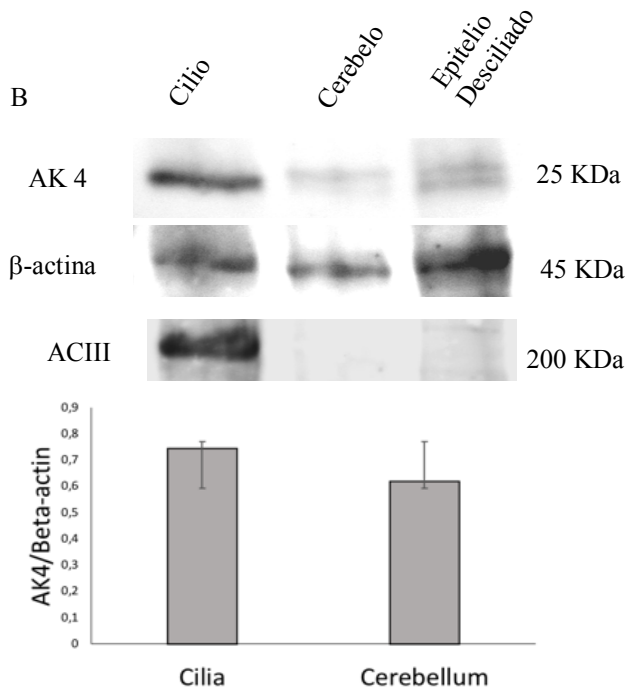
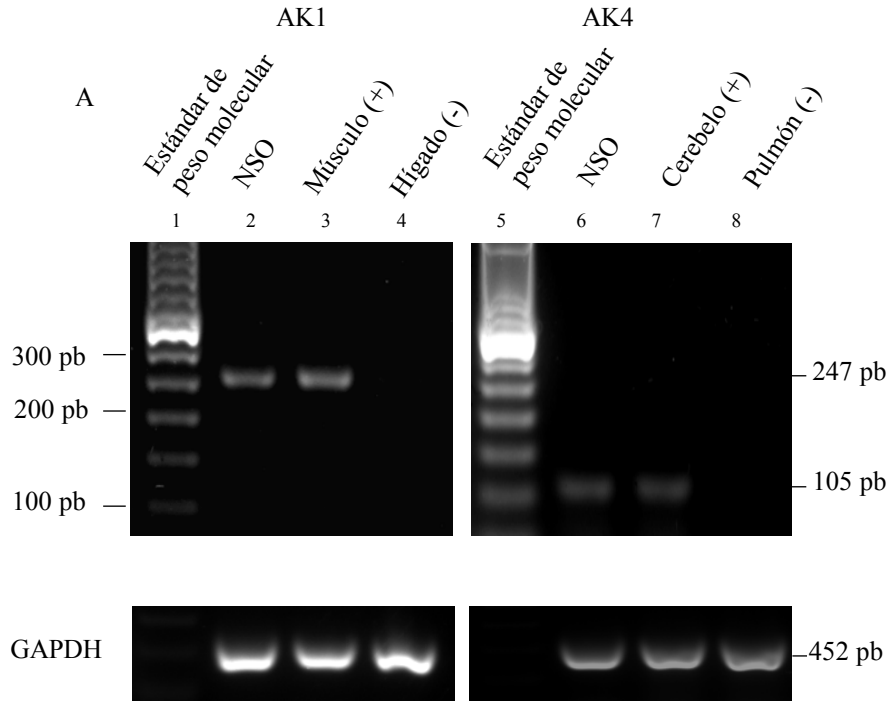


FIGURA 3: Las neuronas sensoriales olfatorias expresan creatina kinasa BB en el cilio. (A) RT-PCR de ADNc para CK-BB (167 pb) de neuronas olfatorias disociadas de rata; cerebelo como control positivo y pulmón como control negativo. (B) Western-blot de una fracción de membrana enriquecida en cilios para indentificar la presencia de CK-BB (43 kDa); cerebelo, como control positivo; β -actina, como control de carga (45 kDa), ACIII como control de muestra de cilios (200 kDa) y epitelio desciliado como control de desciliación/pureza. El gráfico bajo el gel muestra la cuantificación de 4 western blots. (C-K) Inmunohistoquímica de CK-BB en epitelio olfatorio ciliado y desciliado, (C) inmunofluorescencia para CK-BB en epitelio olfatorio ciliado, (D) inmunofluorescencia para ACIII en epitelio olfatorio ciliado y (E) superposición de figuras C y D, (F) inmunofluorescencia para CK-BB en epitelio olfatorio desciliado, (G) inmunofluorescencia para ACIII en epitelio desciliado, (H) superposición entre F y G, (I-K) controles negativos sin anticuerpo primario. Escala: 10 μ m. (L-P) inmunocitoquímica de CK-BB, (L) contraste de fase neurona sensorial olfatoria disociada, (M) inmunofluorescencia para CK-BB en neurona disociada, (N) superposición de L y M, (O) contraste de fase para control negativo, (P) control negativo sin anticuerpo primario. Escala: 5 μ m.

5.3. Presencia y distribución de glucosa-6-fosfatasa en la mucosa olfatoria.

Mediante RT-PCR se comprobó la presencia de G6Pasa en la mucosa olfatoria. Primero se realizó un RT-PCR para las tres isoenzimas de G6Pasa conocidas en mucosa olfatoria completa, identificándose solo la isoenzima 3. Como la isoenzima 1 de G6Pasa es la que se expresa predominantemente en tejidos gluconeogénicos y glucogenolíticos catalizando la hidrólisis de la glucosa-6-fosfato, se realizó un RT-PCR de ambas isoenzimas, utilizando hígado como control positivo para G6Pasa y G6Pasa 3 (Figura 5A). G6Pasa 2 estaba ausente en la mucosa olfatoria (resultado no mostrado). Mediante inmunocitoquímica de células disociadas, se buscó la G6Pasa3 en las células sustentaculares (Figura 5B-F). La figura 5B representa la imagen del contraste de fase de un pequeño grupo de células sustentaculares. La figura 5C representa la inmunofluorescencia para G6Pasa3 donde se destaca la marca de la proteína en las microvellosidades; la figura 5D es la superposición de 5B y 5C. La figura 5E corresponde al contraste de fase del control negativo (Figura 5F). También se realizó una inmunocitoquímica para G6Pasa3 de neuronas olfatorias disociadas (Figura 5G-J). La figura 5G representa la imagen del contraste de fase para una NSO. La figura 5H representa la inmunofluorescencia para G6Pasa3

donde no se observa la marca de la proteína en estas células, la figura 5I muestra la inmunofluorescencia para OMP un marcador de neuronas sensoriales olfatorias. La figura 5J es la superposición de 5G, 5H y 5I. Posteriormente se investigó la presencia de G6Pasa3 en las glándulas de Bowman (Figuras 5 G-M) mediante una inmunohistoquímica, identificándolas con un marcador nuclear específico, SOX9. La figura 5G representa el contraste de fase de la glándula de Bowman; la figura 5H es la inmunofluorescencia anti-G6Pasa3, donde se observa la distribución de la enzima en toda la extensión de la glándula, incluyendo el ducto; la figura 5I muestra la inmunofluorescencia anti-SOX9, donde se observan los núcleos de las células glandulares; la figura 5J es la superposición de H e I. La figura 5K muestra el contraste de fase del control negativo. Las figuras L y M muestran la inmunofluorescencia sin anticuerpo primario para G6Pasa3 y SOX9. Ambos resultados sugieren que las células sustentaculares y las glándulas de Bowman participarían en la homeostasis de la glucosa en la mucosa olfatoria a través de la G6Pasa3.



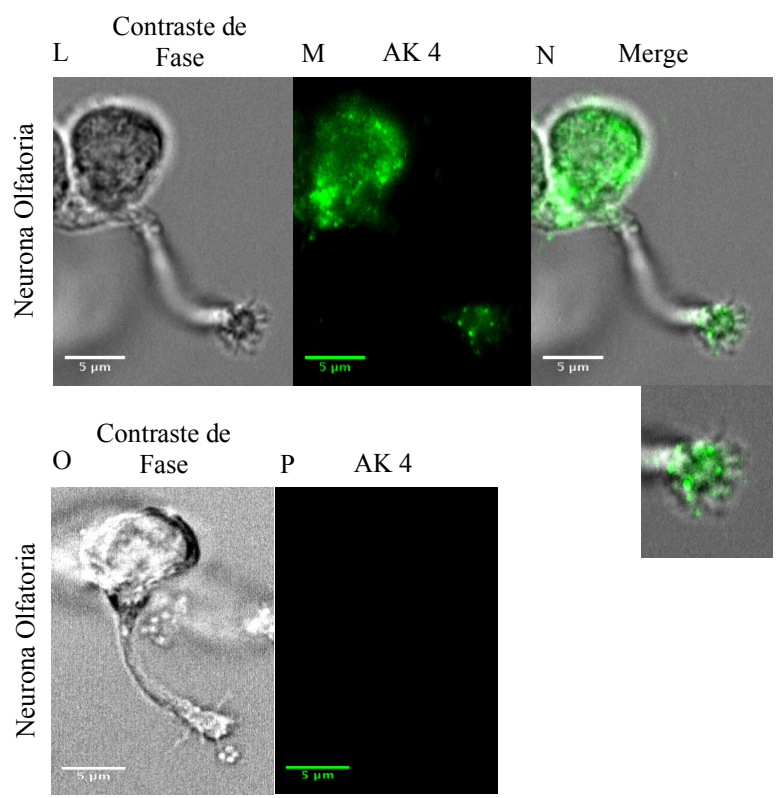
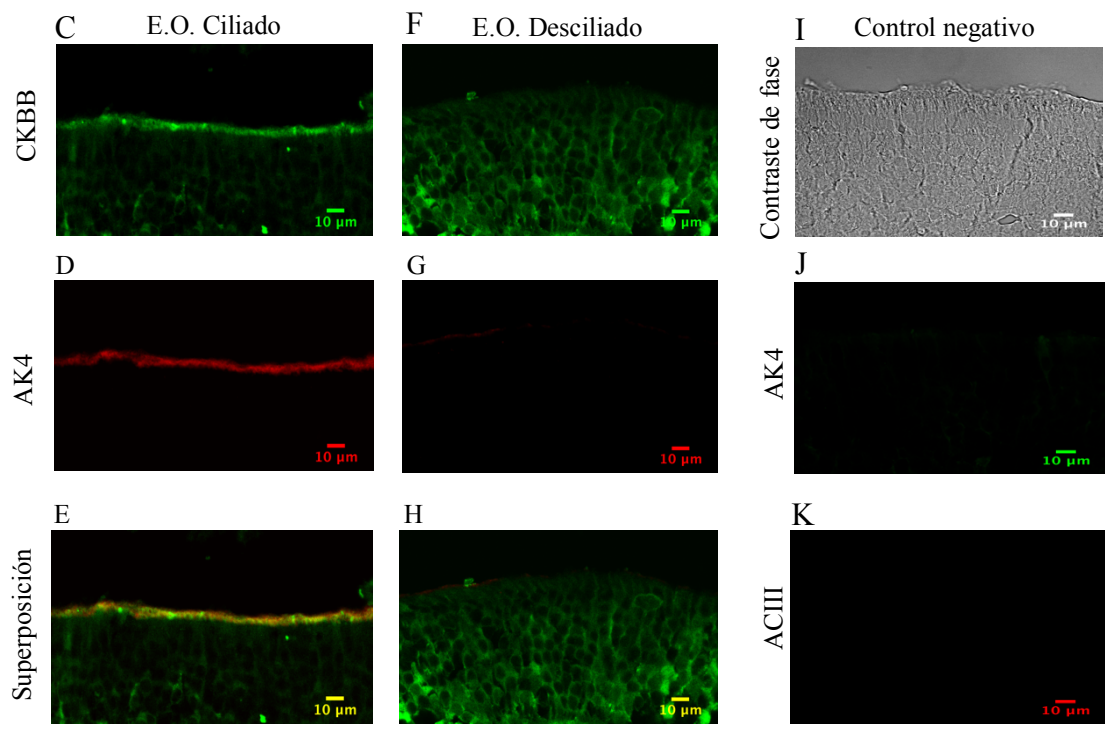
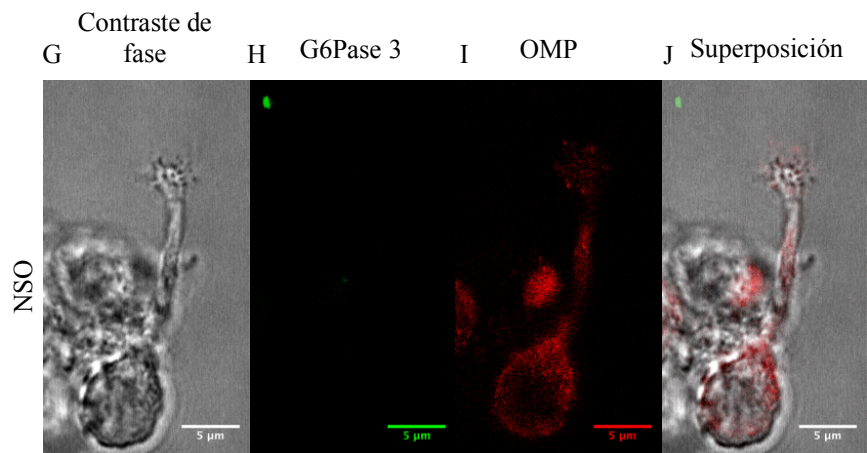
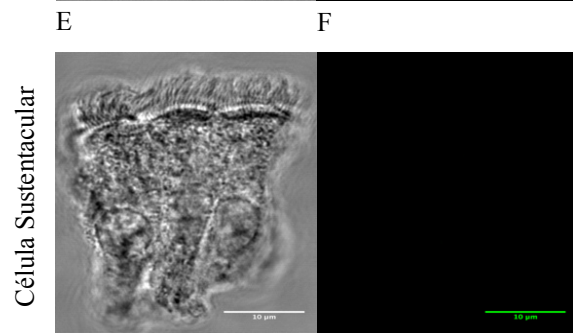
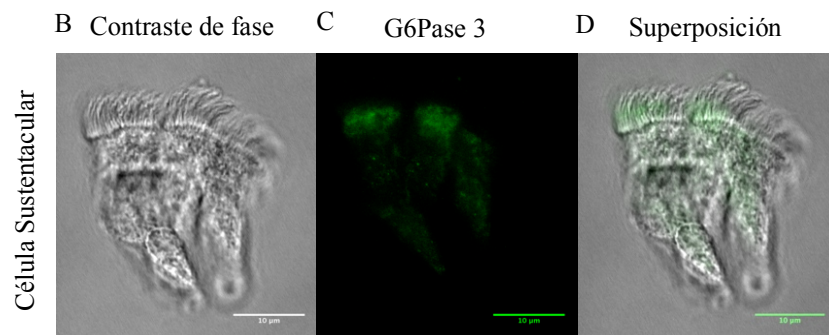
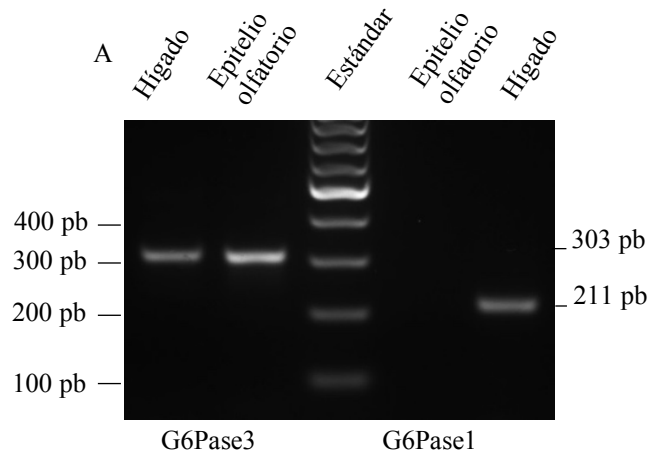


FIGURA 4: Las neuronas sensoriales olfatorias expresan Adenilato Kinasa en el cilio. (A) RT-PCR de ADNc para AK1 (247 pb) y AK4 (105 pb) de neurona olfatoria disociada de rata, músculo y cerebelo como control positivo e hígado y pulmón como control negativo, respectivamente. (B) Western-blot de una fracción de membrana enriquecida en cilios para indentificar la presencia de AK4 (25 kDa); cerebelo, como control positivo; β -actina como control de carga (45 kDa); ACIII como control de muestra de cilios (200 kDa) y epitelio desciliado como control de desciliación/pureza y un gráfico de la cuantificación de los western blot (n = 4). (C-K) Inmunohistoquímica de AK4 en epitelio olfatorio ciliado y desciliado; (C) inmunofluorescencia para AK4 en epitelio olfatorio ciliado; (D) inmunofluorescencia para ACIII en epitelio olfatorio ciliado y (E) Superposición de figuras C y D. (F) inmunofluorescencia para AK4 en epitelio olfatorio desciliado; (G) inmunofluorescencia para ACIII en epitelio desciliado; (H) superposición entre F y G; (I-K) controles negativos sin anticuerpo primario. Escala: 10 μ m. (L-P) inmunocitoquímica de AK4; (L) contraste de fase neurona sensorial olfatoria disociada; (M); inmunofluorescencia para AK4 en neurona disociada; (N) superposición de L y M; (O) contraste de fase para control negativo; (P) control negativo sin anticuerpo primario. Escala: 5 μ m.



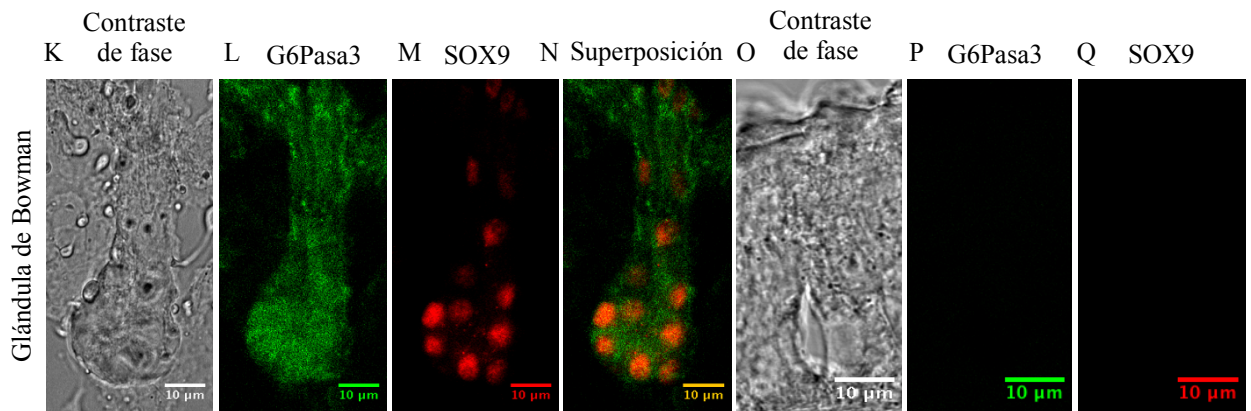


Figura 5: Las glándulas de Bowman y las células sustentaculares expresan G6Pasa3. (A) RT-PCR de mucosa olfatoria de rata para G6Pasa3 (303 pb) y 1 (211 pb), (carriles 2 y 4), hígado como control positivo para ambas isoenzimas en carriles 1 y 4; (B-F) inmunocitoquímica de células sustentaculares disociadas; (B) contraste de fase; (C) inmunofluorescencia para G6Pasa3; (D) superposición de B y C; (E) contraste de fase del control negativo, (F) inmunofluorescencia para G6Pasa 3 sin anticuerpo primario. (G-J) inmunocitoquímica de neuronas disociadas; (G) contraste de fase; (H) inmunofluorescencia para G6Pasa3; (I) inmunofluorescencia para OMP (marcador de neuronas olfatorias) (J) superposición de G, H e I; Escala: 10 μm. (K-Q) inmunohistoquímica del epitelio olfatorio para G6Pasa3 y SOX9 (marcador de glándulas de Bowman), (K) contraste de fase de una glándula de Bowman, (L) inmunofluorescencia para G6Pasa3, (M) inmunofluorescencia para SOX9, (N) superposición entre H e I, (O) contraste de fase del control negativo, (P-Q) inmunofluorescencia sin anticuerpos primarios contra G6Pasa3 y SOX9, respectivamente. Escala: 10 μm.

6 DISCUSIÓN

En este estudio se demostró la expresión de dos lanzaderaes de ATP (AK y CK-BB) en los cilios de las neuronas olfatorias, lo que sugiere su contribución en la homeostasis de esta molécula a lo largo del cilio en el proceso de transducción olfatoria. Además, se encontró la G6Pase3 en la mucosa olfatoria, específicamente en las células sustentaculares y en las glándulas de Bowman, lo que sugiere su participación en la secreción de la glucosa hacia el moco, permitiendo que los cilios la incorporen y utilicen como fuente energética para sus procesos metabólicos.

6.1 La Adenilato Kinasa

Culbertson (1966) encontró expresión de AK en los cilios de *Tetrahymena* mediante cromatografía de nucleótidos y detección de AMP y ATP. Como mencioné anteriormente, el análisis teórico de Raff y Blum (1968) requiere que en estructuras alargadas ($\geq 20 \mu\text{m}$) existan enzimas como la adenilato kinasa para garantizar la mantención de ATP en valores mínimos requeridos para su metabolismo en estas estructuras. Una posible implicación de ese estudio es que cilios como los del epitelio olfatorio tengan niveles elevados de adenilato kinasa.

En la presente investigación se encontraron en los cilios olfatorios dos isoenzimas de AKs, la AK1 y la AK4. Anteriormente, en un estudio con proteómica de estas estructuras (Kuhlmann 2014), se encontró solo la isoenzima AK1. En una primera búsqueda, probando un conjunto de partidores para las 6 isoenzimas de AK, apareció solo AK4. Es posible que la cantidad de ciclos fue muy baja para que se detectaran otras isoenzimas o que los partidores no fueron suficientemente específicos, o ambas razones. Debido a esta aparente inconsistencia se decidió cambiar los partidores de AK1, con lo cual se logró identificar el ARNm de esta proteína, aunque la señal obtenida fue más débil que la de AK4. La ausencia de la proteína AK4 en un análisis de proteómica puede tener varias causales, entre ellas que no se haya alcanzado el umbral de

identificación en la muestra, que no sea expresada en todo el epitelio o que la proteína se solubilice durante el aislamiento (Cao et al 2006). Por otra parte, existe evidencia que las neuronas olfatorias contienen ARNm para AK1 en su forma citosólica y ARNm para AK1 en su isoenzima unida a membrana (AK1 β), estas isoenzimas solo difieren en su extremo N-terminal y en su expresión (Janssen et al 2004); por lo que podemos inferir que AK4 también posea una isoenzima de ubicación citosólica no descrita cuyo gen no codifique los 11 aminoácidos de unión mitocondrial. Por último, se ha propuesto que la cooperación de las adenilato kinasas citosólicas y mitocondriales podría ser esencial para mantener un mecanismo de alto rendimiento de fosforilo entre el consumo de ATP citosólico y los sitios de producción mitocondrial, similar al que se ha establecido para la CK/PCr, lo que refuerza la localización de las isoenzimas 1 y 4 en el cilio.

6.2 La Creatina Kinasa

Encontramos que la CK-BB se expresa en los cilios y también en el resto de las neuronas olfatorias, lo cual no es sorprendente considerando sus múltiples funciones adicionales a la de lanzadera de ATP. Su función principal es fosforilar creatina en el sitio de síntesis de ATP y desfosforilar fosfocreatina en el sitio de su utilización en compartimientos citoplásmicos más distales, que sería la función más relacionada con el papel que jugaría en la homeostasis del ATP en el cilio. No obstante, es importante mencionar que esta enzima tiene en general otras funciones, las que también se relacionan con el tema de investigación más indirectamente, tales como la función del sistema CK/PCr de prevenir un aumento de la concentración de ADP libre intracelular, evitando así una inactivación de las ATPasas celulares y una pérdida neta de nucleótidos de adenina (Iyengar, 1984). Otras funciones del sistema CK/PCr es actuar como buffer de protones y proveer una relación ATP/ADP local en sitios subcelulares donde la CK está funcionalmente acoplada a enzimas o procesos que consumen ATP. Por otro lado, como se mencionó en la Introducción, la capacidad de regeneración de ATP por parte de CK es muy alta, excediendo

considerablemente los requerimientos de ATP de la reposición por fosforilación oxidativa y glicólisis. Esto podría indicar que la CK encontrada en los cilios jugaría un papel preponderante en la reposición del ATP, incluso en mayor proporción que la glicólisis y la fosforilación oxidativa.

6.3 Relación entre ambas lanzaderas de ATP y las fuentes de energía.

Luego de haber determinado la existencia de AK y CK en los cilios, es relevante preguntarse si ambas actuarían sinérgicamente o tendrían funciones separadas en el transporte del ATP. Se ha determinado que un elevado nivel de CK puede regular la reacción de la AK, conservándose la cantidad de nucleótidos de adenina en la célula (Iyengar, 1984), porque si el ADP se acumula sería transfosforilado via adenilato kinasa a ATP y AMP. La siguiente figura esquematiza dicha relación.

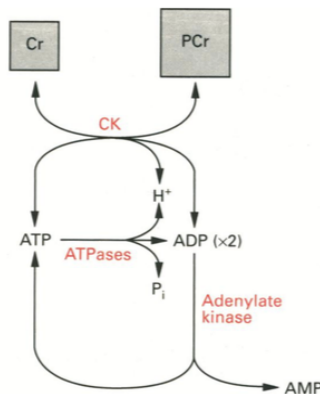


Figura 6: CK es una enzima de regeneración de ATP rápida y un sensor de bajo umbral para ADP. Dos productos de las ATPasas celulares, es decir, ADP y H^+ , son sustratos de la reacción de CK y se consumen durante la regeneración de ATP catalizada por CK. Por lo tanto, la CK está evitando la acidificación local cerca de las ATPasas celulares, así como una acumulación de ADP. Esta última, de otra manera, conduciría, después de una serie de conversiones enzimáticas, a una pérdida neta de nucleótidos de adenina celulares, que serían perjudiciales para una célula. ADP (x 2): dos moléculas de ADP son convertidas por la adenilato kinasa para dar una molécula de ATP y AMP cada una (Wallimann et al. 1992).

Se ha observado una conexión entre la glicólisis con las enzimas CK o AK en el músculo de contracción rápida donde la glicólisis es la vía principal de producción de ATP. Este acoplamiento funcional de la glicólisis con la CK se ve reflejado en un aumento de la expresión de la CK citosólica y en la colocalización de CK con las enzimas glicolíticas (Wallimann et al. 1992).

Los resultados de las inmunofluorescencias muestran que la CK se distribuye en toda la neurona olfatoria y particularmente en los botones dendríticos. Esto sugiere que el rol de CK como lanzadera estaría de acuerdo con el sistema en que las isoenzimas de CK citosólica y mitocondrial se encontrarían acopladas (Fig 7) más que con el “modelo de difusión facilitada de ATP” (Meyer et al. 1998).

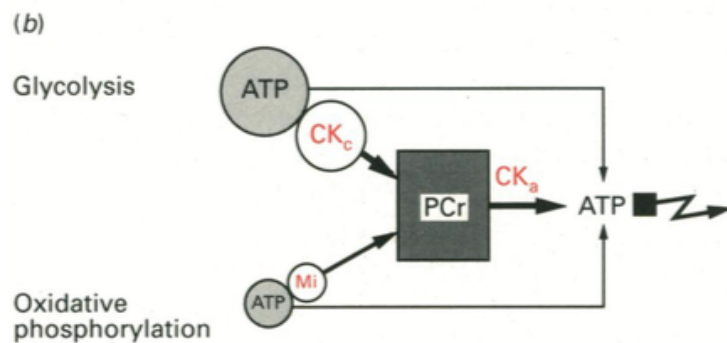


Figura 7: El sistema CK/PCr representado como un amortiguador “temporal” y “espacial” de energía o sistema “lanzadera de energía”. En este modelo, el CK citosólico está funcionalmente acoplado a la glicólisis (CK_c) o a varios otros sitios subcelulares (CK_a) con gran consumo de ATP, mientras la CK mitocondrial CK-Mi está funcionalmente acoplada a la fosforilación oxidativa. Esta es una vía directa a sitios subcelulares de consumo de energía, paralela a la difusión de ATP (Wallimann et al. 1992).

La situación en relación al suministro de energía y el transporte de ATP entre los sitios de producción y consumo son especialmente importantes en estructuras como el cilio. Las propiedades del sistema CK / PCr, que utilizan PCr y Cr, parecen ser muy adecuadas para superar las limitaciones de la difusión en estas estructuras. Esto último fue confirmado por la observación

mediante NMR que las longitudes medias de difusión de PCr y Cr (57 y 37 μm) son significativamente más altas que las de ADP y ATP (1,8 y 22 μm) (Yoshizaki et al. 1990).

6.4 El suministro de glucosa como sustrato metabólico

Villar et al. 2017 determinaron que la glucosa es un importante sustrato metabólico para el proceso de la transducción en los cilios de las neuronas olfatorias, además determinaron que en el moco que rodea a los cilios, la glucosa se encuentra en una concentración de alrededor de 1 mM. Existen evidencias de que en algunos epitelios que secretan glucosa al medio hay una elevada actividad de la G6Pasa 3 (Asaka et al. 1993). Por lo tanto, la presencia de esta enzima era algo esperado en nuestra investigación ya que su localización en las células sustentaculares y en las glándulas de Bowman es concordante con la distribución de los transportadores de GLUT (Nunez-Parra et al. 2011), los cuales se localizan en las células endoteliales, en las glándulas de Bowman de la lámina propia y en las microvellosidades de las células sustentaculares. Además, ya se ha descrito que la G6Pasa 3 se localiza en cerebro de ratón y de humano (Ghosh et al. 2005).

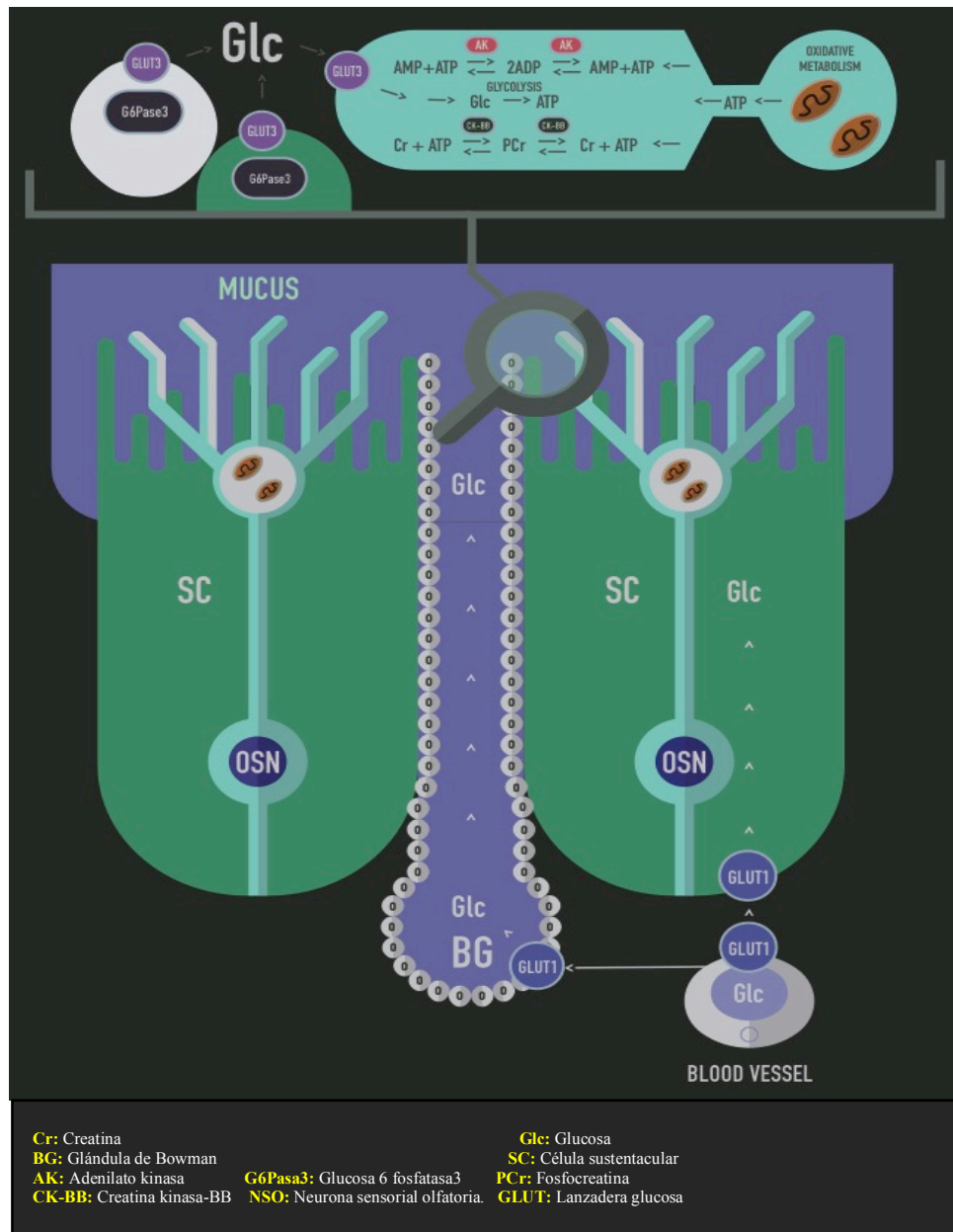
Si se considera un paralelo entre el sistema astrocitos y neuronas del SNC y el sistema células sustentaculares y neuronas olfatorias, se puede sugerir una relación funcional entre estas últimas, ya que se ha demostrado que los astrocitos, son el sitio principal de almacenamiento de glicógeno en el cerebro y contienen un complejo funcional G6Pasa y transportador de G6P en sus microsomas. Esto sugiere que son capaces de hidrolizar G6P a glucosa y ser una fuente de esta molécula en el cerebro (Ghosh et al. 2005). Las células sustentaculares en el epitelio olfatorio podrían cumplir la misión de almacenamiento de glicógeno, donde la determinación de la localización de G6Pasa3 es un gran paso para posteriormente seguir investigando posibles depósitos de este carbohidrato en dichas células.

6.5 Lactato como otro posible sustrato metabólico.

Si bien la glucosa es el principal metabolito localizado en el moco, existe la posibilidad de que el lactato también esté presente allí. En estudios preliminares utilizando lactato deshidrogenasa y un método enzimático cualitativo estándar, y usando moco como sustrato logré determinar la presencia de lactato. Sin embargo, el método utilizado no nos permitió estimar una concentración precisa de lactato en las lecturas, no obstante, fueron cercanas a las obtenidas para una solución de lactato de 0,2 a 0,5 mM. No incluí estos resultados debido a que las mediciones fueron muy variables pero sugieren la presencia de este metabolito en el moco. Como se mencionó más arriba, los astrocitos pueden exportar glucosa a partir de glicógeno, sin embargo, en la mayoría de las condiciones *in vitro* predomina la exportación de lactato. Cuando existe privación de glucosa los cultivos primarios de astrocitos, estos convierten su glicógeno en lactato extracelular (Dringen et al. 1993), y el lactato derivado del glicógeno sostiene la función neuronal (Brown et al. 2004). Además, la activación neuronal conduce a un aumento en el lactato que las neuronas pueden utilizar como sustrato metabólico, lo que sugiere que la energía se transfiere de los astrocitos a los axones en forma de lactato, sugiriendo que algo similar podría ocurrir en el epitelio olfatorio. En Simpson et al. 2007 se plantea la existencia de transportadores MCT1 de lactato en las células sustentaculares específicamente cerca de las microvellosidades y la zona basal, con una $K_m = 4$ mM. Por esto, las células sustentaculares pueden desempeñar un rol en la captación de glucosa y su secreción al entorno intercelular y mucoso además de su metabolización a lactato, el cual posteriormente sería exocitado por un cotransportador al exterior. Adicionalmente, se encontró evidencia que sugiere que las glándulas de Bowman podrían tener una función importante en el metabolismo de lactato en la mucosa olfatoria, ya que se localizó el transportador de MCT2, donde las células del conducto de las glándulas de Bowman podrían incorporar el lactato para su metabolismo (Nuñez-Parra et al. 2011). Por lo tanto, el lactato podría ser liberado al compartimento extracelular a través de MCT1 e incorporado por las células del conducto de las

glándulas de Bowman a través de MCT2. Una vez en las células podría ser procesado por el metabolismo oxidativo. Además, es importante mencionar que Mayer et al. 2008 localizó lactato deshidrogenasa en las membranas ciliares. Todo lo anterior permite considerar al lactato como un sustrato metabólico posible para el proceso de transducción.

Resumiendo, los resultados actuales y el trabajo previo del laboratorio proponemos el esquema representado en la figura 8, que explica dos aspectos de la quimiotransducción que no se habían evaluado previamente. En este modelo la glucosa fluye desde los vasos sanguíneos hacia la mucosidad a través de dos vías: las células sustentaculares y las células de la glándula de Bowman, ambas conteniendo G6Pase3. Paralelamente las lanzaderas de ATP, AK y CK, mantendrían los niveles apropiados de este metabolito para sostener la quimiotransducción a lo largo del cilio durante prolongadas exposiciones a odorantes.



Figura

8: Esquema explicativo del mecanismo de equilibrio de los niveles de ATP en un cilio y del flujo de glucosa desde la sangre al moco. La glucosa proveniente de los vasos sanguíneos es incorporada por las células sustentaculares y las glándulas de Bowman a través de GLUT1, fluyendo por el interior de estas células. Posteriormente, la glucosa es exocitada desde ambos tipos celulares a través de G6Pase3 hacia el moco por medio de GLUT3, quedando disponible para ser incorporada por los cilios, donde es metabolizada para generar ATP a través de glicólisis. Las mitocondrias en el botón dendrítico proporcionan ATP adicional a los cilios por fosforilación oxidativa. La concentración de ATP a lo largo del cilio es mantenida gracias a las lanzaderas de ATP (CK-BB y AK) a través de reacciones reversibles de fosforilación y desfosforilación.

7 CONCLUSIÓN

Las enzimas CK-BB y AK se encuentran presentes en los cilios de las neuronas olfatorias donde tendrían la función de lanzadera de ATP; esta función permite mantener los requerimientos energéticos del proceso de transducción, sobretodo en periodos de alta actividad. Por otro lado, la presencia de la enzima G6Pasa3 en las células sustentaculares y las glándulas de Bowman sumado a evidencias anteriores, permite explicar la llegada de glucosa desde los vasos sanguíneos al moco. Los resultados de esta tesis contribuyen a la comprensión de aspectos metabólicos del proceso de transducción olfatoria que no habían sido estudiados previamente.

8. REFERENCIAS

- Asaka Y., Watanabe J., Amatsu T., and Kanamura' S.: **Significance of High Glucose-6-phosphatase Activity in Rat Oviduct Epithelium.** *The journal histochemistry and cytochemistry* 1993, Vol. 41, No. 12, pp. 1841-1848.
- Berbari NF, O'Connor AK, Haycraft CJ, Yoder BK: **The primary cilium as a complex signaling center.** *Curr Biol* 2009 19,: R526–R535.
- Bessman SP, Geiger PJ. **Transport of energy in muscle: the phosphorylcreatine shuttle.** *Science* 1981, 211:448-452
- Bessman SR Carpenter LC. **The creatine-creatine phosphate energy shuttle.** *Annu Rev Biochem*, 1985, 54:831-862
- Bloodgood R.A.: **Sensory reception is an attribute of both primary cilia and motile cilia.** *J Cell Sci* 2010, 123: 505–509.
- Borisy, F. F., Ronnett G. V., Cunningham A. M., Juilfs D., Beavo J., and Snyder S. H.: **Calcium/calmodulin-activated phosphodiesterase expressed in olfactory receptor neurons.** *J. Neurosci.* 1992, 12:915–923.
- Brown A.M., Baltan Tekkok S., Ransom B.R.: **Glycogen regulation and functional role in mouse white matter.** *J Physiol* 2003a, 549:501–512.
- Brown, A. M., Tekkok, S. B., and Ransom, B. R. **Energy transfer from astrocytes to axons: the role of CNS glycogen.** *Neurochem. Int.* 2004, **45**, 529 –536
- Brown A.M., Evans R.D., Black J., Ransom B.R.: **Schwann cell glycogen selectively supports myelinated axon function.** *Ann Neurol* 2012, 72:406–418.
- Castro, M.A., Pozo, M., Cortes, C., Garcia M de L., Concha, II & Nualart, F. **Intracellular ascorbic acid inhibits transport of glucose by neurons, but not by astrocytes.** *J Neurochem* 2007, 102, 773-782.
- Cao W, Haig-Ladewig L, Gerton GL, Moss SB. **Adenylate kinases 1 and 2 are part of the accessory structures in the mouse sperm flagellum.** *Biol. Reprod.* 2006 75:492–500.
- Chen, T.Y., and Yau K.W.: **Direct modulation by Ca²⁺- calmodulin of cyclic nucleotide-activated channel of rat olfactory receptor neurons.** *Nature* 1994, 368:545–548.
- Cosson J. **ATP, The Sperm Movement Energizer**, University of South Bohemia, Faculty of Fisheries and Protection of Waters, CENAKVA, Vodnany, Czech Republic 2013 (pp. 1-46)

Culbertson J.R. **Cilia Isolated from Tetrahymena after Membrane Stabilization by 1,5-Difluoro-2,4-Dinitrobenzene.** *Science* 1966, 153, 1390.

Dzeja PP and Terzic A.: **Phosphotransfer networks and cellular energetics.** *J. Exp. Biol.* 2003, 206,2039–2047.

Dringen, R., Gebhardt, R., and Hamprecht, B. **Glycogen in astrocytes: possible function as lactate supply for neighboring cells.** *Brain Res.* 1993, 623, 208-214.

Evans R.D., Brown A. M, and Ransom B. R.: **Glycogen Function in Adult Central and Peripheral Nerves.** *Journal of Neuroscience Research* 2013, 91:1044–1049.

Farbman, A. I. **The cellular basis of olfaction.** *Endeavour* 1994, 18, 2–8.

Firestein, S., Darrow B., and Shepherd G. M.:**Activation of the sensory current in salamander olfactory receptor neurons depends on a G protein-mediated cAMP second messenger system.** *Neuron.* 1991, 6:825–835.

Fluegge D, Moeller LM, Cichy A, Gorin M, Weth A, Veitinger S, Cainarca S, Lohmer S, Corazza S, Neuhaus EM, Baumgartner W, Spehr J, Spehr M.: **Mitochondrial Ca (2+) mobilization is a key element in olfactory signaling.** *Nat Neurosci* 2012, 15:754 –762.

Ford WCL **Glycolysis and sperm motility: does a spoonful of sugar help the flagellum go round?** *Human Reproduction Update* 2006, 12: 269-274.

Forsyth, R.J., Bartlett, K., Burchell, A., Scott, H.M. and Eyre, J.A. **Astrocytic glucose-6-phosphatase and the permeability of brain microsomes to glucose 6-phosphate.** *Biochem. J.* 1993, 294, 145-151.

Gamberucci, A., Marcolongo, P., Fulceri, R., Giunti, R., Watkins, S.L., Waddell, I.D., Burchell, A. and Benedetti, A. **Low levels of glucose-6-phosphate hydrolysis in the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle: involvement of glucose-6-phosphatase.** *Mol. Membr. Biol.* 1996, 13, 103-108.

Ginger, M. L., Ngazoa, E. S., Pereira, C. A., Pullen, T. J., Kabiri, M., Becker, K., Gull, K., and Steverding, D.: **Intracellular positioning of isoforms explains an unusually large adenylate kinase gene family in the parasite *Trypanosoma brucei*.** *J. Biol. Chem.* 2005, 280, 11781–11789.

Guionie, O., Clottes, E., Stafford, K., and Burchell, A. **Identification and characterisation of a new human glucose-6-phosphatase isoform.** *FEBS* 2003, 551, 159-164.

Goh BH, Khan A, Efendic S, Portwood N: **Expression of glucose-6-phosphatase system genes in murine cortex and hypothalamus.** *Horm Metab Res* 2006, 38(1):1- 7.

Ghosh N, Cheung Y, Mansfield B, Chou J: **Brain Contains a Functional Glucose-6-Phosphatase Complex Capable of Endogenous Glucose Production.** *The journal of biological chemistry*, 2005, 280 (N°12): 11114-11119.

Harkema J.R.: **The Nose Revisited: A Brief Review of the Comparative Structure, Function, and Toxicologic Pathology of the Nasal Epithelium.** *Toxicologic Pathology* 2006, 34:252–269.

Hemmer W, Riesinger I, Wallimann T, Eppenberger HM, Quest AFG. **Brain-type creatine kinase in photoreceptor cell outer segments: role of a phosphocreatine circuit in outer segment energy metabolism and phototransduction.** *J Cell Sci* 1993, 106:671-683

Hubley M.J., Rosansket R.C. y Moerland T.S. **Diffusion Coefficients of ATP and Creatine Phosphate in Isolated Muscle: Pulsed Gradient ³¹P NMR of Small Biological Samples.** *NMR in Biomedicine* 1995, Vol. 8. 72-78.

Iyengar MR **Creatine kinase as an intracellular regulator.** *J Muscle Res Cell Motil* 1984, 5:527-534

Janssen, E., Dzeja, P. P., Oerlemans, F., Simonetti, A. W., Heerschap, A., de Haan, A., Rush, P. S., Terjung, R. R., Wieringa, B., and Terzic, A.: **Adenylate kinase 1 gene deletion disrupts muscle energetic economy despite metabolic rearrangement.** *EMBO J.* 2000,19, 6371–6381.

Janssen E., Kuiper J., Hodgson D., Zingman L.V., Alexey E. Alekseev A. E., Terzic A. and Wieringa B.: **Two structurally distinct and spatially compartmentalized adenylate kinases are expressed from the AK1 gene in mouse brain** *Molecular and Cellular Biochemistry* 2004, 256/257: 59–72.

Jones, D. T., and R. R. Reed: **G_{olf}: an olfactory neuron-specific G protein involved in odorant signal transduction.** *Science.* 1989, 244:790–795.

Kleene, S. J., and R. C. Gesteland. **Calcium-activated chloride conductance in frog olfactory cilia.** *J. Neurosci.* 1991b, 11:3624–3629.

Kramer, R. H., and Siegelbaum S. A.: **Intracellular Ca²⁺ regulates the sensitivity of cyclic nucleotide-gated channels in olfactory receptor neurons.** *Neuron.* 1992, 9:897–906.

Kuhlmann K, Tschapek A, Wiese H, Eisenacher M, Meyer HE, Hatt HH, Oeljeklaus S, Warscheid B **The membrane proteome of sensory cilia to the depth of olfactory receptors.** *Mol Cell Proteomics* 2014, 13:1828– 1843.

Marcolongo P, Fulceri R, Gamberucci A, Czeglé I, Banhegyi G, Benedetti A: **Multiple roles of glucose-6-phosphatases in pathophysiology: state of the art and future trends.** *Biochim Biophys Acta* 2013, 1830(3):2608-2618.

Mayer, U., Ungerer, N., Klimmeck, D., Warnken, U., Schnolzer, M., Frings, S. & Mohrlen, F.: **Proteomic analysis of a membrane preparation from rat olfactory sensory cilia.** *Chemical senses* 2008, 33, 145-162.

Maue R.A., Dionne E.: **Preparation of isolated mouse olfactory receptor neurons.** *Pflügers Archiv.* 1987, Volume 409, Issue 3, pp 244-250.

Martin, C. C., Oeser, J. K., Svitek, C. A., Hunter, S. I., Hutton, J. C., and O'Brien, R. M.: **Identification and characterization of a human cDNA and gene encoding a ubiquitously expressed glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein.** *J. Mol. Endocrinol.* 2002, 29, 205–222.

Menco, B. P.: **The ultrastructure of olfactory and nasal respiratory epithelium surfaces.** In **Nasal Tumors in Animals and Man.** *Anatomy, Physiology and Epidemiology* 1983, (G. R. a. S. F. Stinson, ed.), Vol. 1, pp. 45–102.

Meyer, R. A. **A linear model of muscle respiration explains monoexponential phosphocreatine changes.** *Am. J. Physiol.* 1988, 254, C548-C553.

Mitchell B., Lotte B. Pedersen, Michael Feely, Joel L. Rosenbaum, and David R. Mitchell: **ATP Production in *Chlamydomonas reinhardtii* Flagella by Glycolytic Enzymes.** *Molecular Biology of the Cell* 2005, Vol. 16, 4509–4518.

Nakamura, T., and G. H. Gold.: **A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia.** *Nature* 1987, 325:442–444.

Noguchi, M., Sawadas, T., and Akazawa, T.: **ATP-regenerating system in the cilia of *Paramecium caudatum*.** *J. Exp. Biol.* 2001, 204, 1063–1071.

Nunez-Parra, A., Cortes-Campos, C., Bacigalupo, J., Garcia M de, L., Nualart, F. & Reyes, J.G.: **Expression and distribution of facilitative glucose (GLUTs) and monocarboxylate/H⁺ (MCTs) transporters in rat olfactory epithelia.** *Chem Senses* 2011, 36, 771-780.

Noma T. **Dynamics of nucleotide metabolism as a supporter of life phenomena.** *J Med Invest* 2005; 52:127–136.

Nomura, T., Takahashi, S. Y Ushiki, T.; **Cytoarchitecture of the normal rat olfactory epithelium: light and scanning electron microscopic studies.** *Arch Histol Cytol* 2004, 67, 159 – 170.

Lee Y, Morrison BM, Li Y, Lengacher S, Farah MH, Hoffman PN, Liu Y, Tsingalia A, Jin L, Zhang PW, Pellerin L, Magistretti PJ, Rothstein JD.; **Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration.** *Nature* 2012, 487:443–448.

Pace, U., and Lancet D.: **Olfactory GTP-binding protein: signal- transducing polypeptide of vertebrate chemosensory neurons.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1986, 83:4947–4951.

Raff E. and Blum J.J. **A Possible Role for Adenylate kinase in Cilia: Concentration Profiles in a Geometrically Constrained Dual Enzyme System.** *J. Theoret. Biol.* 1968, 18, 53-71.

Ronnett G.V., Moon C.: **G proteins and olfactory signal transduction.** *Annu Rev Physiol* 2002, 64:189–222.

Rospars JP, Gu Y, Grémiaux A, Lucas P.: **Odour transduction in olfactory receptor neurons.** *Chin J Physiol* 2010, 53:364–372.

Silva Teixeira C. S., Cerqueira N.M.F.S.A. and Silva Ferreira A. C.: **Unravelling the Olfactory Sense: From the Gene to Odor Perception.** *Chemical Senses* 2015, Vol 41, 105–121.

Simpson I.A., Carruthers A. and Vannucci S.J.: **Supply and demand in cerebral energy metabolism: the role of nutrient transporters.** *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 2007; 27, 1766–1791

Strong, S. J. & Ellington, W. R. **Horseshoe crab sperm contain a unique isoform of arginine kinases that is present in midpiece and flagellum.** *J. Exp. Zool.*, 1993, 267:563–571.

Tekkok SB, Brown AM, Westenbroek R, Pellerin L, Ransom BR **Transfer of glycogen-derived lactate from astrocytes to axons via specific monocarboxylate transporters supports mouse optic nerve activity.** *J Neurosci Res* 2005, 81:644–652.

Tombes, R. M. & Shapiro, B. M. **Metabolite channeling: a phosphocreatine shuttle to mediate high energy phosphate transport between sperm mitochondrion and tail.** *Cell*, 1985, 41:325–334.

Tanabe, M. Yamada, Noma T., Kajii T., Nakazawa A.: **Tissue-specific and developmentally regulated expression of the genes encoding adenylate kinase isozymes,** *J. Biochem.* 1993, 113, 200–207.

Van Schaftingen E. and Gerin I.: **The glucose-6-phosphatase system.** *Biochem. J.* 2002, 362, 513–532.

Vega C., Poitry-Yamate C.L., Jirounek P., Tsacopoulos M, Coles J.A.: **Lactate is released and taken up by isolated rabbit vagus nerve during aerobic metabolism.** *J Neurochem* 1998,71:330–337.

Vendelin M., Birkedal R.: **Anisotropic diffusion of fluorescently labeled ATP in rat cardiomyocytes determined by raster image correlation spectroscopy.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2008, 295(5): C1302-1315.

Villar P., Bacigalupo J., Delgado R., Vergara C., Reyes J.G.: **Energy Requirements of Odor Transduction in the Chemosensory Cilia of Olfactory Sensory Neurons Rely on Oxidative Phosphorylation and Glycolytic Processing of Extracellular Glucose.** *The Journal of Neuroscience* 2017, , 37(23):5736-5743.

Vollrath, M., Altmannsberger, M., Weber, K., and Osborn, M.: **An ultra-structural and immunohistological study of the rat olfactory epithelium: Unique properties of olfactory sensory cells.** *Differentiation* 1985, 29, 243–53.

Wallimann, T., Wegmann, G., Moser, H., Huber, R., and Eppenberger, H. M.: **High content of creatine kinase in chicken retina: compartmentalized localization of creatine kinase isoenzymes in photoreceptor cells.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1986b, 83, 3816–3819.

Wallimann, T, Moser, H., Zurbriggen, B.: **Creatine kinase isoenzymes in spermatozoa.** *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 1986a, 7, 25-34.

Wallimann, T. and Hemmer, W.: **Creatine kinase in non-muscle tissues and cells.** *Mol. Cell. Biochem.* 1994, 133/134, 193-220.

Wallimann T, Wyss M, Brdiczka D, Nicolay K, Eppenberger HM.: **Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis.** *Biochem J.*, 1992, 281:21-40.

Watanabe, T. & Flavin, M. **Nucleotide-metabolizing enzymes in Chlamydomonas flagella.** *J. Biol. Chem.*, 1976, 251:182–192.

Wyss M, Smeitink J, Wevers RA, Wallimann T.: **Mitochondrial creatine kinase: a key enzyme of aerobic energy metabolism.** *Biochim Biophys* 1992, Acta 1051:119-166.

Yeung C.H., Majumder G.C., Rolf C., Behre H.M. and Cooper T.G.: **The role of phosphocreatine kinase in the motility of human spermatozoa supported by different metabolic substrates.** *Molecular Human Reproduction* 1996, vol.2 no.8 pp. 591-596.

Yoneda T., Sato M., Maeda M., Takagi H. **Identification of a novel adenylate kinase system in the brain: Cloning of the fourth adenylate kinase.** *Molecular Brain Research* 1998, 62, 187-195.

Yoshizaki K., Watari H. and Radda G.K. **Role of phosphocreatine in energy transport in skeletal muscle of bullfrog studied by ³¹P-NMR.** *Biochim. Biophys.* 1990; Acta 1051, 144-150

Zhang H, Mitchell DR. **Cpc1, a Chlamydomonas central pair protein with an adenylate kinase domain.** *J Cell Sci* 2004; 117:4179–4188.