



UNIVERSIDAD DE CHILE

UNIVERSIDAD DE CHILE -FACULTAD DE CIENCIAS -ESCUELA DE PREGRADO

**“Evaluación de la administración de beta-hidroxibutirato y activación de la vía dependiente de cAMP en la función de transporte de glutamato asociado a senescencia en astrocitos”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular

**Rocío Consuelo Bustos Izquierdo**

Director del Seminario de Título: Christian González Billault

Co-Director: Cristopher Villablanca

Julio 2023

Santiago – Chile



UNIVERSIDAD DE CHILE

## INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el Sr(ta) Rocío Consuelo Bustos Izquierdo.

**“Evaluación de la administración de beta-hidroxibutirato y activación de la vía dependiente de cAMP en la función de transporte de glutamato asociado a senescencia en astrocitos”**

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular

Director Seminario de Título: Christian Gonzalez-Billault

Comisión Revisora y Evaluadora

Presidente Comisión: Alejandro Roth

Evaluador: Marco Tulio Nuñez

Santiago de Chile, .....



Mi nombre es Rocío Consuelo Bustos Izquierdo, me suelen llamar Chio. Nací el 21 de septiembre de 1999 en Santiago, con la llegada de la primavera. Soy la hermana del medio, de tres hermanas.

Cursé mi educación básica y media en el Colegio Pedro de Valdivia, siempre con ganas de aprender más y más. Desde pequeña demostré un gran interés por la explicación de mi entorno. Había soñado con ser doctora de la Universidad de Chile, pero a medida que fui creciendo descubrí mi pasión; la investigación científica.

Empecé a soñar con el nobel, con lograr cosas grandes y aportar así mi granito de arena.

Finalmente entré a la Universidad que siempre quise y cursé mis 5 años de Ingeniería en Biotecnología Molecular, donde aprendí mucho sobre la biotecnología, la ciencia y el trabajo en equipo.

Durante todo este tiempo también hice un montón de amigos, con los que viví experiencias inolvidables, que son las que siempre llevaré en mi corazón.

Esta tesis va dedicada a mi yo pequeña,

Esa niña de los muchos ¿Por qué?

A aquella que siempre quiso explicarse el mundo

y fue encontrando ciertas respuestas a través la ciencia.

Quisiera agradecer a todos y todas quienes me acompañaron en este proceso.

Partiendo por mi familia, quienes me soportaron (literalmente) todo este tiempo, por sus palabras de ánimo y creer en mí, por apoyarme en mis decisiones, y por estar incondicionalmente. Especialmente a mis papas, Claudia y Patricio, por siempre entregarme tanto amor y las herramientas necesarias para seguir mi camino. Los amo con todo mi corazón.

A mis amigos, por entender que quizás de pronto ya no tenía los mismos tiempos de antes, por interesarse y preguntarme cómo iba en el proceso, y también por sacarme risas en los momentos en que nos podíamos ver.

A mi pololo, Benjamín, por acompañarme al laboratorio a veces hasta los fines de semana, por escucharme hablar por horas de lo que hacía y de lo que pasaba ahí, por todo el apoyo, ánimo y amor que me brindó en esta etapa.

A todo el laboratorio CENEDYN por recibirme e integrarme, por sus consejos, por su ayuda, por sus conversaciones de almuerzo y por todas las experiencias. Especialmente a mi tutor Christian, por confiar en mis capacidades y darme la oportunidad de trabajar en el laboratorio. Y a mi co-tutor Christopher, por todo el interés, paciencia y apoyo que brindo a este proyecto.

A la comisión evaluadora, Dr Alejandro Roth y Dr Marco Tulio Núñez por los comentarios y consejos para lograr la mejor versión de mi trabajo.

Finalmente, agradecer al proyecto FONDAP 15150012 y al centro GERO por financiar el desarrollo y termino de este proyecto.

Gracias.

## Índice de contenido

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	10
<b>Cultivos primarios de astrocitos:</b> .....	10
<b>Inducción de senescencia celular:</b> .....	10
<b>Inmunoblots:</b> .....	11
<b>Inmunofluorescencia:</b> .....	13
<b>Cultivo de línea celular C8D1A:</b> .....	15
<b>Tratamiento con cuerpos cetónicos:</b> .....	15
<b>Medición de cuerpos cetónicos en el medio:</b> .....	16
<b>Kit ELISA competitivo:</b> .....	16
<b>Sensor FRET EPAC:</b> .....	17
<b>Sensor FRET AKAR4:</b> .....	17
<b>RESULTADOS</b> .....	19
<b>Ensayos Western-blot de extractos de proteína total de cultivos primarios de astrocitos murinos muestran diferencias significativas para el marcador LAMIN-B1</b> .....	19
<b>Cultivos primarios de astrocitos murinos muestran fenotipos heterogéneos en cuanto a morfología e inmunomarcaje</b> .....	20
<b>Evaluación de niveles de cAMP:</b> .....	24
<b>Tratamientos con BHB en células C8D1A no muestran diferencias concluyentes en los niveles de cAMP evidenciado por ensayos de ELISA competitivo</b> .....	24
<b>Tratamientos con BHB en células C8D1A no muestra diferencias en los niveles de cAMP intracelular evidenciado por sensor FRET-EPAC</b> .....	25
<b>Tratamientos con BHB muestran una inducción de cAMP intracelular en cultivo de primario de astrocitos murinos que es inhibida en astrocitos senescentes evidenciado por sensor FRET-EPAC</b> .....	27
<b>Determinación de la vía de señalización activada por cAMP:</b> .....	30
<b>Tratamientos con BHB en células C8D1A no muestran diferencias en la actividad de PKA evidenciado por sensor FRET-AKAR4</b> .....	30
<b>Tratamientos con BHB muestran una tendencia al aumento de la actividad de PKA en cultivos primarios de astrocitos murinos control y senescentes evidenciado por sensor FRET-AKAR4</b> .....	32
<b>Evaluación de la expresión y localización de GLT1 y GLAST:</b> .....	34

<b>Ensayos Western-blot de extractos de proteína total de la línea celular C8D1A para diferentes marcadores. ....</b>	<b>34</b>
<b>Inmunofluorescencias en cultivos primarios de astrocitos murinos muestran cambios en la detección de los transportadores GLT1 y GLAST tras tratamientos.....</b>	<b>36</b>
<b>Astrocitos primarios generan cambios morfológicos gatillados por estimulación de la vía cAMP mediante forskolin. ....</b>	<b>44</b>
<b>DISCUSION Y PROYECCIONES .....</b>	<b>49</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>62</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>64</b>

## Índice de Tablas

**Tabla 1.** Sondas y anticuerpos primarios y secundarios utilizados en inmunoblot.

**Tabla 2.** Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en inmunofluorescencias.

## Índice de figuras

**Figura 1.** Análisis de la membrana revelada de Western-blot muestra diferencias significativas en el marcador LAMIN-B1 entre el control y la condición senescente.

**Figura 2.** Imágenes de microscopía confocal de co-inmunofluorescencias muestran cultivos heterogéneos, pero positivos para marcadores de astrocitos.

**Figura 3.** Imágenes de microscopía confocal de co-inmunofluorescencias muestran un mayor marcaje de GFAP en astrocitos control en comparación a astrocitos senescentes.

**Figura 4.** Medición de niveles de cAMP por ensayo de ELISA competitivo en línea celular C8D1A, no muestra diferencias significativas en muestras tratadas con BHB.

**Figura 5.** Imágenes de microscopía confocal de sensor FRET-EPAC no muestra diferencias en los niveles intracelulares de cAMP en muestras de línea celular C8D1A.

**Figura 6.** Imágenes de microscopía confocal de sensor FRET-EPAC muestra diferencias significativas en cuanto a niveles intracelulares de cAMP en muestras de cultivo primario de astrocitos en condición control (DMSO) tratadas con BHB.

**Figura 7.** Imágenes de microscopía confocal de sensor FRET-EPAC no muestran diferencia en los niveles de cAMP en muestras de cultivo primario de astrocitos en condición senescente (DOXO) tratadas con BHB.

**Figura 8.** Imágenes de microscopía confocal de sensor FRET AKAR4 no muestra diferencias en la actividad de PKA en muestras de la línea celular C8D1A tratadas con BHB.

**Figura 9.** Imágenes sensor FRET AKAR4 en cultivo primario de astrocitos en condición control (DMSO) muestra una tendencia al aumento en la actividad de PKA en muestras tratadas con BHB.

**Figura 10.** Imágenes sensor FRET AKAR4 en cultivo primario de astrocitos en condición senescente (DOXO) muestra una tendencia al aumento en la actividad de PKA en muestras tratadas con BHB.

**Figura 11.** Membrana revelada de Western-blot para marcadores en astrocitos tratados de líneas celulares C8D1A.

**Figura 12.** Imágenes de microscopía confocal de inmunofluorescencias para el transportador de glutamato GLT1 en condición control (DMSO) muestra un aumento en la detección del transportador sin y con permeabilización.

**Figura 13.** Imágenes de microscopía confocal de inmunofluorescencias para el transportador de glutamato GLT1 (DOXO) muestra un aumento en la detección en condiciones con permeabilización.

**Figura 14.** Imágenes de microscopía confocal de inmunofluorescencias para el transportador de glutamato GLAST en condición control (DMSO) muestra un aumento en la detección en condiciones sin permeabilización.

**Figura 15.** Imágenes de microscopía confocal de inmunofluorescencias para el transportador de glutamato GLAST (DOXO) muestran un aumento significativo en la detección con los tratamientos de BHB aplicados en la condición sin permeabilización.

**Figura 16.** Parámetros de forma a partir de imágenes de microscopía confocal de inmunofluorescencias de cultivos primarios de astrocitos control (DMSO) sugiere una estalación de estos mismos.

**Figura 17.** Parámetros de forma a partir de imágenes de microscopía confocal de inmunofluorescencias de cultivos primarios de astrocitos senescentes (DOXO) muestran un mayor tamaño que astrocitos control (DMSO) y una menor susceptibilidad a la estalación.

## Lista de abreviaturas

**ALDH1L1:** 10-formiltetrahidrofolato deshidrogenasa.

**ARN:** Ácido ribonucleico.

**ARNm:** Ácido ribonucleico mensajero.

**BDNF:** Factor neurotrófico derivado del cerebro.

**BHB:** Beta-hidroxibutirato.

**BSA:** Seroalbúmina bovina.

**cAMP:** Adenosín monofosfato cíclico.

**C8D1A:** Células clonales de astrocitos tipo I aisladas de cerebelo de ratón.

**CD11B:** Integrina alfa M.

**CFP:** Proteína cian fluorescente.

**CP:** Con permeabilización.

**CREB:** Elemento de unión en respuesta a cAMP.

**DAPI:** 4',6-diamidino-2-fenilindol.

**dbCAMP:** Adenosina monofosfato dibutirílico cíclico.

**DMEM:** Medio Eagle modificado de Dulbecco.

**DMSO:** Dimetilsulfóxido.

**DOXO:** Doxorubicina.

**FBS:** Suero bovino fetal.

**FRET:** Transferencia de energía por resonancia de Förster.

**GAPDH:** Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa.

**GLAST:** Transportador de glutamato/aspartato.

**GLT1:** Transportador de glutamato 1.

**GLU:** Glucosa.

**GTPasas:** Guanosina trifosfatasa.

**GFAP:** Proteína ácida fibrilar glial.

**HRP:** Peroxidasa de rábano.

**HPLC:** Cromatografía líquida de alta resolución.

**IF:** Inmunofluorescencia.

**LAMINB1:** Lámina nuclear.

**N:** número de replicas biológicas.

**P16:** Inhibidor 2A de quinasa dependiente de ciclina.

**PAN-B-TUBULINA:**

**PBS:** Tampón fosfato salino.

**PFA:** Perfluoroalcoxi.

**PHALL:** Faloidina.

**PKA:** Proteína quinasa A.

**PVDF:** Fluoruro de polivinilideno.

**RIPA:** Tampón de ensayo de radio-inmunoprecipitación.

**RHO:** Rho GTPasa.

**ROCK:** Proteína quinasa asociada a Rho.

**SDS-PAGE:** Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico.

**SNC:** Sistema nervioso central.

**SP:** Sin permeabilización.

**TBS-T:** Solución salina tamponada con TRIS y Tween.

**WB:** Western-blot.

**UA:** Unidades arbitrarias.

**YFP:** Proteína amarilla fluorescente.

## RESUMEN

Los astrocitos son un tipo celular esencial en el sistema nervioso central (SNC). Participan en numerosos eventos celulares, incluyendo el correcto funcionamiento de la sinapsis tripartita y la mantención del fenotipo neuronal. Así, alteraciones en los astrocitos pueden conducir a consecuencias deletéreas para el SNC. En ese contexto, reportes indican que astrocitos senescentes o envejecidos presentan una disminución de los transportadores de glutamato (GLT1 y GLAST), lo que se relaciona con una mayor susceptibilidad a procesos de excitotoxicidad neuronal. Reportes de ensayos *in vitro* han indicado que la activación de vías de señalización dependientes de cAMP aumenta la expresión de los transportadores de glutamato en astrocitos primarios de ratón y promueven la aparición de un fenotipo de astrocitos maduro, asociado a procesos de estelación. Así, la modulación de vías que promueven un aumento en cAMP podría recatar la pérdida de función de los transportadores de glutamato asociada a senescencia o envejecimiento.

Reportes recientes y datos no publicados de nuestro laboratorio indican que la administración de dieta cetogénica/cuerpos cetónicos promueve la activación de vías dependientes de cAMP. Dada la importancia de los transportadores de glutamato en astrocitos y su relación con las vías activadas por cAMP, nosotros propusimos estudiar las posibles funciones de cuerpos cetónicos específicamente en cultivos primarios de astrocito. Para ello, se administró el cuerpo cetónico beta-hidroxibutirato (BHB) por 24 horas en astrocitos controles y senescentes, evaluando cambios en los niveles de cAMP además de determinar la activación de PKA, a través de ensayos de ELISA competitivo y sensores FRET. Se evaluó cambios en la expresión, y localización de los transportadores de glutamato GLT1 y GLAST, a través de ensayos inmunocitoquímicos como Western-blot e inmunofluorescencias. Los ensayos fueron

realizados en un número de dos replicas biológicas, a partir de las cuales los resultados muestran una tendencia a aumentar las concentraciones de cAMP intracelular en astrocitos primarios control, mostrando diferencias significativas, contrario a lo que se observa en astrocitos senescentes. Por otro lado, no se observa un aumento considerable en la actividad de PKA tanto en astrocitos primarios control como senescentes tratados con BHB. En cuanto a la detección de los transportadores se observa un aumento en la detección de GLT-1 en astrocitos primarios control, tratados con BHB, contrario a lo que se observa en astrocitos senescentes, sin observar diferencias significativas. En cuanto a GLAST se observa un aumento en astrocitos control y senescentes, mostrando diferencias significativas en estos últimos.

Resultados de esta investigación muestran efectos diferenciales en astrocitos control y senescentes tratados con BHB. Y aunque se considera que el cAMP tiene efectos beneficiosos para células y organismos envejecidos, es posible que la senescencia interfiera con el impacto positivo esperado de BHB debido a cambios metabólicos que ocurren durante la senescencia. Esto podría ser un aspecto relevante para investigar con mayor profundidad en el futuro, con el objetivo de desarrollar tratamientos senomórficos.

## ABSTRACT

Astrocytes are an essential cell type in central nervous system (CNS). They participate in numerous cellular events, including the correct functionality of the tripartite synapse and the maintenance of the neuronal phenotype. Thus, alterations in astrocytes can lead to deleterious consequences for the CNS. In this context, reports indicate that senescent or aged astrocytes show a decrease in glutamate transporters (GLT1 and GLAST), which related to an increased susceptibility to neuronal excitotoxicity processes. Reports from in vitro assays have indicated that activation of cAMP-dependent signaling pathways increases the expression of glutamate transporters in primary mouse astrocytes and promotes the appearance of a mature astrocyte phenotype, associated with stellate processes. Thus, modulation of pathways that promote an increase in cAMP could rescue the loss of function of glutamate transporters associated with senescence or aging.

Recent reports and unpublished data from our laboratory indicate that the administration of ketogenic diet/ketotic antibodies promotes the activation of cAMP-dependent pathways. Given the importance of glutamate transporters in astrocytes and their relationship to cAMP-activated pathways, we proposed to study the possible functions of ketone bodies specifically in primary astrocyte cultures. To this end, we administered the ketone body beta-hydroxybutyrate (BHB) for 24 hours in control and senescent astrocytes, evaluating changes in cAMP levels in addition to determining PKA activation, through competitive ELISA assays and FRET sensors. Changes in the expression and localization of glutamate transporters GLT1 and GLAST were evaluated by immunocytochemical assays such as Western-blot and immunofluorescence. The assays were performed in several two biological replicates, from which the results show a tendency to increase intracellular cAMP concentrations in primary control astrocytes, showing significant differences, contrary to what is

observed in senescent astrocytes. On the other hand, no considerable increase in PKA activity is observed in both control and senescent primary astrocytes treated with BHB. Regarding the detection of transporters, an increase in GLT-1 detection is observed in control primary astrocytes treated with BHB, contrary to what is observed in senescent astrocytes, with no significant differences. As for GLAST, an increase is observed in control and senescent astrocytes, showing significant differences in the latter. Results of this research show differential effects in control and senescent astrocytes treated with BHB. And although cAMP is considered to have beneficial effects for aging cells and organisms, it is possible that senescence interferes with the expected positive impact of BHB due to metabolic changes that occur during senescence. This could be a relevant aspect to investigate further in the future, with the aim of developing senomorphic treatments.

## INTRODUCCIÓN

El sistema nervioso central está compuesto de dos tipos principales de células; las neuronas y las células gliales. Las neuronas tienen la función de recibir, procesar y transmitir estímulos a través de señales químicas y eléctricas, siendo especializadas en la conducción del impulso nervioso, en forma de potencial de acción, mediante conexiones llamadas sinapsis (Kandel, E. R., y col., 2013). Por su parte, las células gliales tienen como función principal actuar como soporte de las neuronas, cumpliendo funciones auxiliares estructurales, metabólicas y tróficas. Existen diversos tipos de células gliales, tales como las microglías, los oligodendrocitos y los astrocitos. Los astrocitos, en particular, son un tipo de célula glial que participa en distintos procesos fisiológicos del sistema nervioso central, como la neurogénesis, la regulación del tono vascular y el control de la formación y función sináptica (Volterra, A., Meldolesi, J., 2005).

La transmisión sináptica entre neuronas es producida gracias a la liberación de diversos neurotransmisores de tipo inhibitorio o excitatorio. En la mayoría de las sinapsis excitatorias se produce la liberación del neurotransmisor glutamato desde la neurona presináptica a la neurona postsináptica. Sin embargo, la mayor parte de este neurotransmisor se difunde fuera de la hendidura sináptica hasta las células gliales, en su mayoría astrocitos, donde el glutamato es captado por los transportadores de glutamato, siendo GLT1 y GLAST los más predominantes en las células gliales del cerebro (Danbolt, N. C., 2001). Estos transportadores, son proteínas transportadoras presentes en la membrana plasmática y corresponden a transportadores de glutamato de alta afinidad (transportador de aminoácidos excitatorios, EAAT por sus siglas en inglés), pertenecientes a la familia de transportadores de solutos (SLC) y, a su vez, a la subfamilia de los transportadores de aminoácidos (SLC1).

Tanto GLT1 como GLAST son importantes para la mantención de la homeostasis del glutamato en el espacio extracelular. Sin embargo, estos transportadores tienen diferentes patrones de expresión en las distintas regiones del cerebro (Danbolt, N. C., 2001). En general, GLT1 (también conocido como EAAT2) es codificado por el gen SLC1A2 y es el transportador de glutamato predominante en el cerebro. Se expresa principalmente en astrocitos y es más abundante en la corteza cerebral, el estriado y el hipocampo. Desde un punto de vista cuantitativo, GLT1 es responsable de hasta un 90% del transporte de glutamato en el sistema nervioso central (Danbolt, N. C., et al., 1992; Haugeto et al., 1996). Por otro lado, GLAST (también conocido como EAAT1), es codificado por el gen SLC1A3 y se expresa principalmente en el cerebelo (Danbolt, N. C., 2001). Ambos transportadores se localizan principalmente en la membrana de las células gliales y son responsables de la mayor parte de la captación de glutamato, el cual posteriormente es convertido en glutamina por acción de la enzima glutamina sintetasa. Posteriormente, la glutamina es transportada nuevamente hacia las neuronas donde se transforma enzimáticamente en glutamato vía la enzima glutaminasa para que este pueda ser reempaquetado en vesículas sinápticas y utilizado por las neuronas (Lalo, U., y col., 2021). Por lo anterior, los astrocitos tienen un rol fundamental en la sinapsis y homeostasis cerebral, ejerciendo un control en el grado de activación de la neurotransmisión glutamatérgica, evitando que se produzca una excitotoxicidad por acumulación de glutamato, es decir, evitando que haya una sobreestimulación de las neuronas debido a la acumulación excesiva de neurotransmisores excitatorios como el glutamato en el espacio extracelular lo que provoca una señalización sináptica defectuosa que conduce a la muerte neuronal.

Si bien los astrocitos comparten ciertas características fenotípicas, constituyen una población celular bastante heterogénea en cuanto a morfología, tamaño y función, lo

cual se asocia a los diferentes procesos celulares en los que participan. Durante el envejecimiento estos procesos celulares y moleculares se ven comprometidos debido, principalmente, a la aparición de dos fenotipos en astrocitos; los astrocitos reactivos y los astrocitos senescentes, los cuales generan cambios en la organización de su citoesqueleto. (Villablanca, C., y col., 2023).

La senescencia es un estado de arresto permanente en el ciclo celular en respuesta a diferentes estímulos de daño tanto interno como externos. La aparición y acumulación de células senescentes puede promover daño en distintos tejidos debido a la activación de la respuesta a daño en el ADN (DDR, por sus siglas en inglés), la secreción de factores que promueven la generación de un ambiente proinflamatorio, la inducción de genes anti apoptóticos, los cambios en el metabolismo, entre muchas otras características. A consecuencia de esto, las células senescentes generan un fenotipo característico que incluye cambios aberrantes en su estructura mostrando formas alargadas y aplanadas, alteración en la membrana plasmática, acumulación de lisosomas y mitocondrias, y cambios nucleares como disminución en la Lamina-B1 (Hernández-Segura, A., y col., 2018).

En el contexto cerebral, las fuentes más probables de células senescentes son las células gliales. Ejemplo de esto se puede observar en un modelo murino de Taupatía que presentó senescencia específicamente en células con morfología glial, y donde su eliminación permitió prevenir el decline cognitivo dependiente de Tau (Bussian T.J., y col, 2018). Entre los distintos tipos de células gliales, existe un foco de estudio en los astrocitos, dada la importancia de ellos en la mantención del fenotipo neuronal y en la sinapsis tripartita entre otros (Cohen J. y Torres C., 2019).

Evidencia muestra que, en un modelo de astrocitos humanos senescentes inducidos por irradiación con rayos X, se observa una disminución en el ARNm codificante para

los transportadores de glutamato GLT1 y GLAST. Esta disminución se observó de manera gradual en astrocitos senescentes de más días (Limbad, C., y col., 2020). Adicionalmente, mediante un análisis de secuenciación de ARN, se observó que en genes que se expresan principalmente en astrocitos, aquellos asociados con actividades de transporte, específicamente los que codifican para GLT1 y GLAST, muestran una disminución en su expresión (Limbad, C. et al., 2020). En este mismo estudio se realizó un co-cultivo de astrocitos y neuronas, notando que aquellos en donde se cultivó con astrocitos senescentes presentan una mayor muerte celular en presencia de glutamato en comparación a co-cultivos con astrocitos control, lo que permitió concluir que los astrocitos senescentes no son capaces de captar el glutamato del medio posiblemente debido a una disminución en los transportadores de glutamato, lo que causaría la acumulación de este en el medio y por ende muerte neuronal por excitotoxicidad. (Limbad, C., y col., 2020).

Análogamente a lo que ocurre en la senescencia, hay evidencia que demuestra que a partir de cultivos de astrocitos obtenidos de ratones envejecidos se observa una disminución del transportador GLAST respecto a individuos jóvenes. Además, se observó una disminución en la expresión y actividad de la glutamina sintetasa que es la enzima que convierte glutamato en glutamina, lo cual está asociado a una menor metabolización del glutamato (Bellaver, B., y col., 2017).

Por otra parte, hay evidencia que muestra que la administración de Fasudil, un inhibidor de la GTPasa pequeña RhoA, aumenta la expresión y función de los transportadores de glutamato GLT-1 y GLAST en astrocitos primarios de ratón. Esto debido a que la inhibición de RhoA, produce cambios en el citoesqueleto de actina asociados a la adquisición del fenotipo estrellado clásico de los astrocitos maduros, que consiste en la generación de prolongaciones o ramificaciones astrocíticas, lo que tiene como consecuencia una mejora en la función de los transportadores de

glutamato debido a una mayor expresión de estos en la membrana (Lau, C. L., y col., 2011). En esta misma línea, otro estudio observó un aumento en la expresión de GLT1 y GLAST en astrocitos al aplicar tratamientos con dibutilil cAMP (dbcAMP), un análogo de cAMP y activador de la vía de PKA, en comparación a la condición control, lo cual sucede de forma exponencial a los días de aplicación del tratamiento. Así mismo se observó que se produce un aumento en el transporte de glutamato lo que condice con un aumento en la función de estos transportadores (Schlag, B. D. y col., 1998). Cabe señalar que el dbcAMP ha demostrado tener efectos similares al cAMP en la regulación del citoesqueleto en astrocitos, a través de la modulación de la dinámica de filamentos intermedios y filamentos de actina lo que afecta la organización del citoesqueleto, generado in vitro una morfología más bien estrellada con una retracción del citoplasma (James, E. G. y Fung-Chow C., 1984). Así, es posible indicar que la vía de señalización de cAMP tiene un papel importante en la regulación de la estructura y función del citoesqueleto celular en astrocitos. Adicionalmente, este mismo estudio antes mencionado ha descrito que en un modelo de co-cultivo de astrocitos y neuronas corticales se produce un aumento en los niveles de expresión de GLT-1 y GLAST, lo que da cuenta de la participación colaborativa de la neurona y el astrocito en la mantención de la homeostasis del glutamato y la expresión y función de estos transportadores. Junto a esto, se observa que el astrocito adopta una forma más bien estrellada o madura que recapitula lo reportado al inhibir RhoA donde se observa un aumento de estos transportadores (Schlag, B. D. y col., 1998).

Todos estos antecedentes sugieren que, tanto los cambios morfológicos asociados a la maduración de los astrocitos, como la ganancia de función respecto de la homeostasis de glutamato por aumento de los transportadores GLT1 y GLAST, son dependientes de vías de señalización activadas por cAMP y/o la inhibición de la vía

Rho/ROCK. De este modo, es plausible que tratamientos dirigidos a promover las vías dependientes de cAMP o modular la actividad de RhoGTPasas permitan mejorar funciones del astrocito, tales como la homeostasis de glutamato.

La dieta cetogénica es una dieta baja en carbohidratos y alta en grasas. Una de las principales características de la dieta cetogénica, es que se induce un estado metabólico de cetosis, en que el cuerpo usa grasas en lugar de carbohidratos como fuente principal de energía debido a escasez de glucosa en el organismo. Así a partir de grasas se produce la descomposición de triglicéridos en ácidos grasos y glicerol. Los ácidos grasos, en el hígado, se someten a un proceso llamado beta-oxidación, proceso mediante el cual se sintetizan tres principales moléculas denominadas cuerpos cetónicos; acetona, acetoacetato y beta-hidroxibutirato (BHB) (Newman, J. C y col., 2017). Así los cuerpos cetónicos son pequeñas moléculas orgánicas sintetizadas principalmente en el hígado a partir de grasas, los cuales circulan por el torrente sanguíneo durante el ayuno, el ejercicio prolongado o cuando se restringen los carbohidratos. Particularmente el BHB, el más abundante en sangre, es utilizado por varios tejidos periféricos incluido el cerebro debido a que es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica. Los cuerpos cetónicos en sangre se mantienen en un rango basal de  $>0,2$  mM, aumentando en cetosis hasta a 8 mM lo que aun implica un rango fisiológico. Sin embargo, en niveles superiores a 10 mM se entra en un estado de cetoacidosis que resulta en una acumulación excesiva de cuerpos cetónicos en sangre. (Hashim, S. A y col., 2014).

El BHB además de su rol bioenergético se ha identificado como un metabolito de señalización relacionándose con una variedad de beneficios para la salud, como la reducción de la inflamación y el aumento de la función cerebral. Estudios reportan que el BHB, podría tener un impacto en la estructura y función del citoesqueleto celular, siendo capaz de inhibir la actividad de la enzima histona desacetilasa (HDAC)

además de influir en la inhibición del inflammasoma NLRP3 en macrófagos, lo que podría implicar cambios en la expresión génica, señalización y funciones de las proteínas teniendo consecuencias en una amplia gama de procesos celulares y fisiológicos con implicaciones para la salud y longevidad (Newman, J. C., y col., 2017)

En este contexto, estudios indican que tratamientos con cuerpos cetónicos como beta-hidroxibutirato (BHB), en neuronas, modulan la expresión de algunas proteínas como el factor de transcripción BDNF a través de la activación de la vía de señalización de PKA. Así BHB estaría cumpliendo funciones regulatorias en la activación de la vía de señalización mediada por PKA/cAMP/CREB (Erling Hu y col., 2018). Esto va en la misma línea de estudios proteómicos de sinaptosomas realizados en nuestro laboratorio, donde se encontró que un modelo murino alimentado con dieta cetogénica cíclica (dieta cetogénica intercalada con dieta control) produce un aumento en las vías de señalización mediadas por cAMP, además de algunas proteínas efectoras de cAMP como PKA. Esto podría sugerir que dietas cetogénicas generan cambios asociados a la activación de la vía cAMP, que podrían impactar en la morfología y función de los astrocitos, como se señala en la literatura (Erling Hu y col., 2018).

Tomando en consideración los antecedentes anteriores, el presente seminario de título pretendió evaluar si la administración de cuerpos cetónicos promueve un aumento de cAMP y si este aumento genera una recuperación de la función de los transportadores de glutamato GLT1 y GLAST en un modelo de astrocitos murinos senescentes *in vitro*. Para esto, cultivos primarios de astrocitos fueron tratados con cuerpos cetónicos con el fin de utilizar extractos de proteínas totales en ensayos de inmunoblots para evaluar cambios en la expresión de los transportadores. Adicionalmente se desarrollaron cultivos con el fin de evaluar la localización de los transportadores a través de ensayos de IF. Junto con esto se realizaron ensayos para

evaluar niveles de cAMP intracelulares en astrocitos tratados con BHB mediante un kit de ELISA competitivo y ensayos de fluorescencia FRET, utilizando un sensor de cAMP basado en EPAC (FRET-EPAC de cuarta generación) capaz de sensor niveles intracelulares del metabolito. Finalmente, con el fin de determinar la activación de la vía de señalización dependiente de cAMP, se realizaron ensayos con el sensor de PKA FRET-AKAR4, el cual es capaz de detectar diferencias en la actividad de PKA.

**Hipótesis:** “El aumento de cAMP inducido por el beta-hidroxibutirato (BHB) aumenta la expresión y función de los transportadores de glutamato GLT1 y GLAST en astrocitos senescentes”.

**Objetivo general:** Evaluar el efecto de la administración de BHB y su rol en la activación de la vía de transducción dependiente de cAMP en la recuperación de la pérdida de función de transporte de glutamato asociado a senescencia en astrocitos murinos.

**Objetivos específicos:**

- Evaluar cambios en la producción de cAMP en astrocitos controles y senescentes tratados con beta-hidroxibutirato y determinar la activación consecuente de PKA.
- Evaluar cambios de expresión, localización y función de transportadores GLT1 y GLAST en astrocitos control y senescentes tratados con beta-hidroxibutirato y con análogos de cAMP que mimeticen selectivamente la activación de la vía de PKA.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Cultivos primarios de astrocitos:** Los cultivos primarios de astrocitos fueron generados, utilizando cortezas cerebrales de ratones neonatos C57BL/6 de 2-4 días post nacimiento como se ha descrito anteriormente (Schildge, S.,2013). Los cultivos fueron mantenidos en condiciones de hipoxia (3% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>), utilizando medio de mantención de astrocitos DMEM-F12 #12400-024 (17,5 mM de glucosa, 1% antibiótico, 1% glutamax, 10% FBS). Una vez alcanzada la confluencia, los cultivos fueron replaqueados sobre cubreobjetos de vidrio recubiertos con poli-L-lisina para ensayos de IF y de sensor FRET. Y sobre placas de cultivo de plástico recubiertos con poli-D-lisina, para ensayos de WB y experimentos de ELISA competitivo

**Inducción de senescencia celular:** Las muestras de los cultivos de astrocitos recibieron tratamiento control, 0,1% dimetilsulfóxido (DMSO), o 250nM de doxorubicina (DOXO), para inducir senescencia, por 24hrs. Posteriormente las muestras fueron colectadas a las 72hrs post-tratamiento en el caso de la condición control, y a los 14 días en el caso de los astrocitos senescentes. Finalmente, los cubreobjetos tratados con DMSO, fueron fijados con PFA-Sacarosa 4% a las 72hrs post-tratamiento, mientras que en la condición senescente fueron fijados a los 14 días post-tratamiento.

**Inmunoblots:** Se realizó una caracterización por inmunoblots utilizando extractos de proteína total de cultivos de astrocitos controles (DMSO por 2 días) y senescentes inducidos con doxorubicina (DOXO, por 14 días), los que fueron extraídos en buffer RIPA y posteriormente cuantificados en sistema Qubit, según instrucciones del fabricante. Posteriormente las muestras fueron preparadas a  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  en buffer de carga 5x y denaturadas por calor (5min a  $95^{\circ}\text{C}$ ). Las muestras fueron corridas en geles de poliacrilamida 10% conteniendo 0,5% de 2,2,2-tricloroetanol (tecnología stain-free), en condiciones denaturantes (SDS-PAGE) y, posteriormente, los geles fueron fotoactivados con luz UV por 5min. Luego, las proteínas fueron transferidas mediante electrotransferencia en membranas de PVDF de baja fluorescencia, las que fueron fotoactivadas por 1min con luz UV, para luego capturar el patrón de banda "stain-free" que posteriormente fue utilizado como control de carga. Las membranas, luego fueron ensayadas mediante WB utilizando los anticuerpos primarios y secundarios respectivos presentados en la **tabla 1**. Para observar los cambios de expresión de los marcadores señalados, primero se reveló la membrana mediante quimioluminiscencia y tomó una imagen en fotodocumentador para luego evaluar los marcadores mediante densitometría de las bandas, es decir, mediante la intensidad de señal detectada en la imagen utilizando el software ImageJ.

Por otro lado, con el fin de evaluar la expresión de transportadores de glutamato GLT1 y GLAST, se realizaron pruebas preliminares en extractos de proteínas totales a partir de tejido de cerebro y muestras de cultivo primario de astrocitos control (DMSO) y senescente (DOXO) para estandarizar el uso de los anticuerpos.

Adicionalmente, extractos de proteína total de líneas celulares de astrocitos C8D1A tratados con distintas concentraciones de BHB, fueron extraídos en buffer RIPA y posteriormente cuantificados en sistema Qubit, según instrucciones del fabricante. Finalmente, las muestras fueron preparadas y ensayadas siguiendo el protocolo

mencionado anteriormente. Los cambios de expresión de los transportadores señalados fueron evaluados de forma cualitativa, lo que implicó que, a partir de la observación visual, después de realizar el WB y revelar las bandas de proteínas, se buscó la presencia o ausencia de las bandas específicas que correspondían a la proteína de interés, comparando su presencia con proteínas de expresión constitutiva.

Tabla 1. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en inmunoblots.

<b>Anticuerpos primarios</b>	<b>Dilución</b>	<b>N° de catálogo</b>	<b>Anticuerpos secundarios</b>	<b>Dilución</b>	<b>N° de catálogo</b>
<b><i>ALDH1L1 Rabbit</i></b>	1:1000	Ab87117	<b><i>Anti-mouse HRP</i></b>	1:5000	715-035-150 (Jackson)
<b><i>GAPDH Mouse</i></b>	1:1000	MAB374	<b><i>Anti-rabbit HRP</i></b>	1:5000	711-035-152 (Jackson)
<b><i>LaminB1 Rabbit</i></b>	1:1000	Ab229025			
<b><i>GFAP Rabbit</i></b>	1:1000	Z0334			
<b><i>GLAST Rabbit</i></b>	1:500	PA5-77426			
<b><i>GLT1 Rabbit</i></b>	1:2500	NBP1-20136			

**Inmunofluorescencia:** Se realizó una caracterización por IF indirecta utilizando muestras de astrocitos controles y senescentes inducidos con doxorubicina, crecidos sobre cubreobjetos de vidrio y fijados con paraformaldehído. Primeramente, se permeabilizaron con PBS-triton 0,2% a temperatura ambiente por cinco minutos. Luego se realizaron tres lavados con PBS 1x a temperatura ambiente. Posteriormente se bloquearon las muestras por una hora con PBS 1x, BSA 5% a temperatura ambiente para luego incubar con los anticuerpos primarios presentados en la **tabla 2** en sus respectivas diluciones, en PBS 1x, BSA 1% durante una hora a temperatura ambiente en una cámara húmeda sobre parafilm. Se volvió a lavar tres veces con PBS 1x a temperatura ambiente por cinco minutos para incubar posteriormente por una hora con los anticuerpos secundarios presentados en la **tabla 2**, en PBS, BSA 5%. En el caso de usar una sonda para marcar, esta se incubó en conjunto con los anticuerpos secundarios. Una vez pasado el tiempo se colocaron las muestras en un portaobjetos con fluorsave. La expresión y localización de los marcadores fue evaluada mediante microscopía confocal y posterior análisis en software ImageJ. El conteo de las células positivas para los distintos marcadores fue realizado manualmente utilizando la herramienta "Multi-point" de ImageJ, en al menos 5 campos distintos elegidos al azar por tratamiento y por réplica biológica. El número total de células fue determinado por conteo de núcleos teñidos con DAPI o Hoescht.

Por otra parte, se evaluó cambios de localización de los transportadores de glutamato GLT1 y GLAST en muestras de astrocitos control (DMSO) y senescentes (DOXO) crecidos en cubreobjetos de vidrio, tratados con distintas concentraciones de BHB y fijados con PFA-Sacarosa 4%. Se realizaron ensayos en condiciones con y sin permeabilización para cada transportador. En el caso de condiciones con permeabilización, se permeabilizaron con PBS-triton 0,2% a temperatura ambiente

por cinco minutos. Luego se realizaron tres lavados con PBS 1x a temperatura ambiente. Posteriormente se bloquearon las muestras por una hora con PBS 1x, BSA 5% a temperatura ambiente para luego incubar con los anticuerpos primarios GLAST y GLT-1 usando una dilución de 1:200 para cada anticuerpo en PBS 1x, BSA 1% durante una hora a temperatura ambiente en una cámara húmeda sobre parafilm. Luego se volvió a lavar tres veces con PBS 1x a temperatura ambiente por cinco minutos para incubar posteriormente por una hora con el anticuerpo secundario anti-rabbit-HRP en PBS, BSA 1%. Se realizaron tres lavados por cinco minutos, incubando con DAPI durante el primer lavado. Una vez realizados los lavados se colocaron las muestras en un portaobjetos con fluorsave.

En el caso de la condición sin permeabilización se comenzó el protocolo bloqueando las muestras por 1 hora con PBS 1x, BSA 5% para luego continuar de la misma manera en que se mencionó anteriormente.

La expresión y localización de los marcadores fue evaluada mediante microscopía confocal, registrando un Z-stack de cada célula y posterior análisis en software ImageJ mediante MAX intensity de cada foto.

Tabla 2. Sondas y anticuerpos primarios y secundarios utilizados en inmunofluorescencias.

<b>Anticuerpos primarios</b>	<b>Dilución</b>	<b>N° de catálogo</b>	<b>Anticuerpos secundarios y sondas</b>	<b>Dilución</b>	<b>N° de catálogo</b>
<b><i>ALDH1L1 Rabbit</i></b>	1:100	Ab87117	<b><i>Phall-670</i></b>	1:140	PHDN1
<b><i>GFAP-cy3 Mouse</i></b>	1:100	C9205	<b><i>Anti-mouse 488</i></b>	1:500	A21202

<b><i>GFAP Rabbit policlonal</i></b>	1:150	AB011	<b><i>Anti-mouse 546</i></b>	1:500	A10036
<b><i>Pan-<math>\beta</math>-tubulina Mouse</i></b>	1:300	sc-398937	<b><i>Anti-rabbit 546</i></b>	1:500	A10046
<b><i>GLT1 Rabbit</i></b>	1:200	NBP1-20136	<b><i>Hoechst</i></b>	1:1000	62249
<b><i>GLAST Rabbit</i></b>	1:200	PA5-77426			

**Cultivo de línea celular C8D1A (CRL-2145-ATCC):** Los cultivos fueron mantenidos a 37°C en medio DMEM #12800-017 (25 mM de glucosa), 1% antibiótico, 10% FBS. Una vez alcanzaron confluencia, los cultivos fueron replaqueados sobre cubreobjetos de vidrio para ensayos de IF y de sensor FRET, o placas de cultivo de plástico para ensayos de WB y de ELISA competitivo.

**Tratamiento con cuerpos cetónicos:** Los tratamientos fueron realizados en condiciones de baja glucosa y sin piruvato en el medio, con el fin de promover el consumo de cuerpos cetónicos.

Se realizaron pruebas con la línea celular de astrocitos C8D1A, utilizando medio DMEM (Gibco #11966-025) + 2,5 mM de glucosa, considerando esta como una baja concentración de glucosa. Los tratamientos fueron aplicados en distintas concentraciones de BHB considerando 2 mM, 5 mM y 10 mM de BHB (Sigma aldrich, 54920) durante 24hrs. Como control positivo del aumento de cAMP esperado, se incluyó tratamientos con 1 mM de dbcAMP y como control negativo se utilizó astrocitos control sin ningún tratamiento.

Adicionalmente cultivos de astrocitos control y senescentes fueron tratados con concentraciones de 2 mM y 10 mM de BHB durante 24hrs en medio DMEM (Gibco

#11966-025) + 5 mM de glucosa (normoglucosa). Como control positivo del aumento de cAMP esperado, se incluyó tratamientos con 10mM *forskolin* (Tocris, 1099), activador de la enzima adenilato ciclasa y como control negativo se utilizó astrocitos control (DMSO) y senescentes (DOXO) sin ningún tratamiento.

**Medición de cuerpos cetónicos en el medio:** Una vez aplicados los tratamientos, se recolectaron muestras del medio inmediatamente y a las 24hrs post tratamiento. Estas mediciones se realizaron con strips de medición de cetonas en el equipo de medición de cuerpos cetónicos Optium Neo, analizando muestras de astrocitos de línea celular C8D1A y cultivos primarios.

**Kit ELISA competitivo:** Este kit (Abcam, ab65355) se fundamenta en el cambio de absorbancia detectado, donde una mayor absorbancia indica una menor concentración de cAMP en las muestras. Esto ya que el kit se basa en la unión del cAMP de la muestra o HRP-cAMP del kit a un anticuerpo anti-cAMP que a su vez está unido a una placa cubierta con proteína G. Entonces a más cAMP en la muestra, menos HRP-cAMP unido a la placa.

Se evaluó el aumento de cAMP en extractos de proteínas totales, extraídas en HCL 0,1M, de cultivos de la línea celular de astrocitos C8D1A, las cuales fueron tratadas con BHB en las concentraciones antes mencionadas en medio sin suero y baja glucosa, siguiendo el protocolo indicado por el fabricante en el kit de ELISA competitivo.

**Sensor FRET EPAC:** Este biosensor de cAMP basado en EPAC (FRET-EPAC-S-H187 de cuarta generación, Addgene #170348), muestra una pérdida en la eficiencia en el FRET al observar una disminución de la razón YFP/CFP (aceptor/donador) (DiPilato L. M., 2004) cuando aumentan las concentraciones de cAMP. Esto ya que la unión de cAMP al dominio regulador de EPAC permite que la secuencia VLVLE interactúe con este dominio regulador y así se libere la inhibición del dominio GEF por el dominio REM generando un cambio conformacional en el par FRET, lo que tiene produce un distanciamiento entre el fluoróforo donante y aceptor disminuyendo la eficiencia del FRET. Así, se realizó ensayos para evaluar diferencias en la concentración intracelular de cAMP mediante el sensor FRET. Se realizó transfecciones con lipofectamina 3000 por 24hrs en medio DMEM 10% FBS, en la línea celular C8D1A. Además, se realizó transfecciones con lipofectamina 3000 por 24hrs con medio DMEM 10% FBS en cultivos primarios de astrocitos control (DMSO) y senescentes (DOXO). En ambos casos, luego de la transfección, los cultivos fueron tratados con BHB en las concentraciones antes mencionadas en medio sin suero y baja (2,5 mM) o normo (5 mM) glucosa respectivamente. Esta eficiencia fue evaluada mediante microscopía confocal y posterior análisis en software ImageJ, dividiendo el promedio de fluorescencia obtenido entre el aceptor y el donador.

**Sensor FRET AKAR4:** Este biosensor (FRET-AKAR4, Addgen #61619) muestra una eficiencia en el FRET al observar un aumento en la razón YFP/CFP (aceptor/donador) (Depri, C., 2011), cuando aumentan los niveles de PKA fosforilado. Es decir, PKA fosforilado es capaz de unirse a un dominio de fosfopéptidos (treonina) presente en el sensor lo que disminuye la distancia entre los fluoróforos aceptor y donante dando como resultado una alta eficiencia en el FRET.

Para probar la eficiencia del sensor, se realizaron algunas pruebas transfectando con lipofectamina 2000 por 5hrs y posteriormente aplicando tratamientos con distintos

activadores de PKA como 6-BZN (50 mM), analogos de cAMP como dbcAMP (1 mM) y activadores como *forskolin* (10 mM) en línea celular COS7 (figura anexa 1), en medio DMEM 5% FBS con el fin de evaluar la eficiencia del sensor FRET, además se incluyó un control negativo sin ningún tratamiento. Al analizar los resultados obtenidos, notamos una diferencia significativa al utilizar *forskolin* por 2hrs, indicando que el sensor FRET detecta cambios eficientemente en esta situación control en respuesta a la activación de la función kinasa de PKA (figura anexa 1). Por otro lado, con el fin de probar nuevas técnicas de análisis para optimizar el FRET, al momento de tomar las imágenes se foto-blanqueó el aceptor del par FRET (CFP-YFP), esperando un aumento en la intensidad de fluorescencia del donador (CFP), sin embargo, tras analizar las imágenes no se observan mayores diferencias (figura anexa 2), por lo que se decidió realizar el análisis clásico usando la razón entre el donador y el aceptor para obtener eficiencias de FRET.

Se realizó pruebas en la línea celular C8D1A transfecando con lipofectamina 3000 por 24hrs en medio DMEM 10% FBS para luego aplicar tratamientos en las distintas concentraciones de BHB antes mencionadas en condiciones de medio sin suero y baja glucosa.

Adicionalmente se realizaron ensayos en muestras de cultivo primario de astrocitos control (DMSO) y senescentes (DOXO), transfecando con lipofectamina 3000 por 24hrs en medio DMEM 10% FBS para luego aplicar tratamientos de BHB en las distintas concentraciones antes mencionadas en condiciones de medio sin suero y normo glucosa.

La eficiencia de FRET fue evaluada mediante microscopía confocal y posterior análisis en software ImageJ, dividiendo el promedio de fluorescencia obtenido entre el aceptor y el donador.

## RESULTADOS

### **Ensayos Western-blot de extractos de proteína total de cultivos primarios de astrocitos murinos muestran diferencias significativas para el marcador LAMIN-B1.**

Con el fin de validar la inducción de senescencia en astrocitos primarios tratados con doxorubicina, analizamos el patrón de expresión de una batería de proteínas que han sido vinculadas con el proceso de senescencia en otros modelos celulares. Extractos de proteínas totales de cultivos primarios de astrocitos fueron utilizados para ensayos de WB en conjunto a distintos anticuerpos para evaluar la presencia de las proteínas correspondientes. Tras analizar las imágenes mediante densitometría óptica en el software ImageJ, se observó que ALDH1L1, una enzima expresada principalmente en astrocitos presenta una tendencia a aumentar sus niveles en el caso de los astrocitos inducidos a senescencia con doxorubicina (figura 1A-B), sin alcanzar diferencias significativas. En el caso de LAMINB1, se observa una disminución estadísticamente significativa en la densidad de la banda en el tratamiento con doxorubicina, lo cual es considerado una marca canónica de la senescencia celular (Hernandez-Segura A., y col., 2018) (figura 1A-C). Finalmente, en el caso de las proteínas GFAP, un marcador de astrocitos, y GAPDH, una proteína de expresión constitutiva, se observa una densidad de banda similar, tanto para los astrocitos en condición control como para astrocitos en condición de senescencia (figura 1 A-D-E), sin presentar diferencias significativas para estos marcadores.

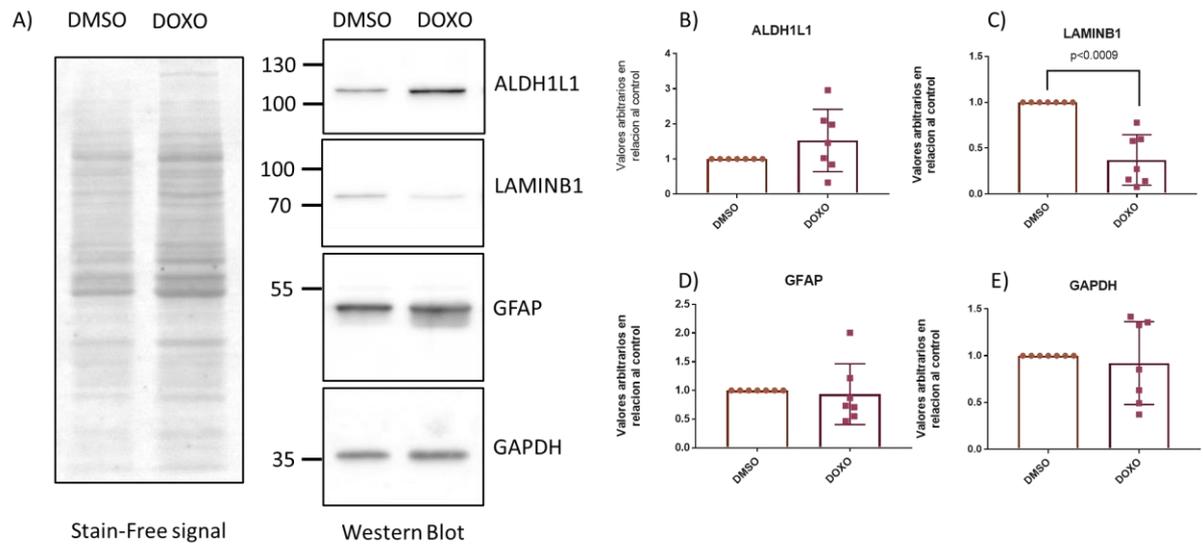


Figura 1. **Análisis de la membrana revelada de Western-blot muestra diferencias significativas en el marcador LAMIN-B1 entre el control y la condición senescente.** En (A) se observan los inmunoblots realizados evaluando distintos marcadores en la condición control (DMSO) y senescente (DOXO). En (B-E) se muestra la cuantificación densitométrica de las bandas obtenidas en el WB. Las barras indican promedio normalizado con la condición control y desviación estándar de dichos promedios. Para LAMINB1 (A) se observa una mayor densidad de la banda expresada en condiciones control, presentando una diferencia significativa (C) ( $p < 0.0009$ ) entre ambas condiciones luego de realizar un t-test. En el resto de los marcadores no se observan diferencias significativas.  $n = 3$ .

### **Cultivos primarios de astrocitos murinos muestran fenotipos heterogéneos en cuanto a morfología e inmunomarcaje.**

En el proceso de caracterización de nuestros cultivos primarios de astrocitos, decidimos evaluar la morfología y expresión de los marcadores de astrocitos en astrocitos controles (DMSO) y senescentes (DOXO). Astrocitos primarios crecidos directamente sobre cubreobjetos de vidrio fueron utilizados para ensayos de

inmunocitoquímica de fluorescencia, usando inicialmente un anticuerpo monoclonal hecho en ratón contra GFAP (GFAP-Cy3), junto con el anticuerpo policlonal hecho en conejo contra ALDH1L1 (figura 2A), ambas proteínas consideradas marcadores de astrocitos. El conteo manual de las células inmunomarcadas, indicó que alrededor de un 40% en promedio son positivas para GFAP, mientras que más de un 80% en promedio resultaron positivas para ALDH1L1, independientemente del tratamiento (figura 2B-C). En cuanto a la población de células positivas para ambos marcadores a la vez, alcanzó promedios cercanos al 30% (figura 2D). Esta heterogeneidad en los marcadores es acompañada por células morfológicamente distintas, tanto en forma como en tamaño, lo cual puede ser apreciado tanto en una misma condición, como entre tratamientos (figura 2A).

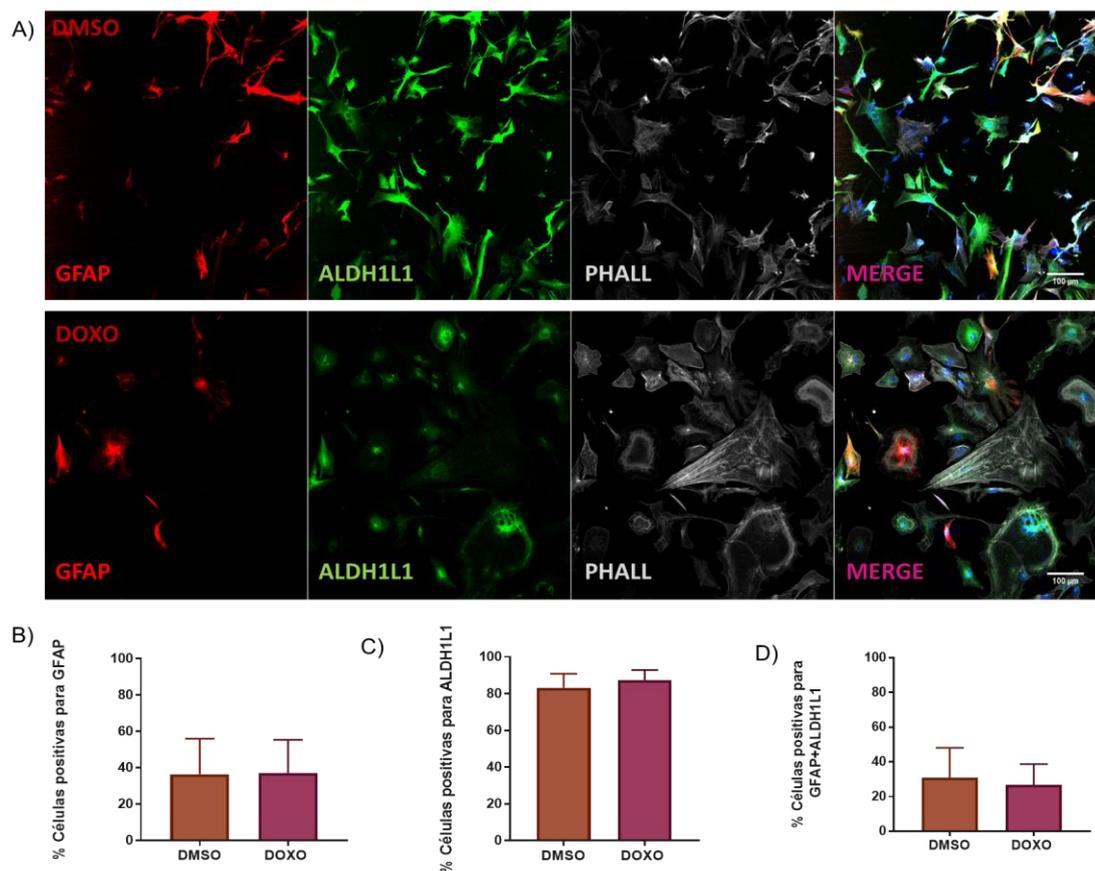


Figura 2. **Imágenes de microscopía confocal de co-inmunofluorescencias muestran cultivos heterogéneos, pero positivos para marcadores de astrocitos. (A)** Cultivos primarios de astrocitos controles (DMSO) y senescentes (DOXO) fueron inmunomarcados contra los marcadores de astrocitos GFAP (rojo) y ALDH1L1 (verde). Adicionalmente se usó faloidina (phall) y Hoechst (azul) para visualizar el total de las células. Las imágenes se encuentran ecualizadas para aumentar la señal aparente y facilitar la visualización. En **(B-D)** se grafica el porcentaje promedio y desviación estándar de las células positivas para cada marcador indicado en el eje Y. No se presentaron valores significativos luego de realizar un t-test. n=3 réplicas biológicas;  $\geq 200$  células por condición. Scale bar: 50  $\mu\text{m}$ .

Adicionalmente, los mismos cultivos, bajo las mismas condiciones antes mencionadas, fueron ensayados usando un anticuerpo policlonal hecho en conejo contra GFAP (filamentos intermedios), junto con anti-pan- $\beta$ -tubulina (microtúbulos) y faloidina (F-Actina), permitiendo así la observación de los tres principales componentes del citoesqueleto de astrocitos (figura 3A). Se contaron manualmente las células positivas para GFAP, observándose alrededor de un 60% en promedio de positividad en condiciones control, y alrededor de un 40% en promedio resultaron positivas para GFAP en condiciones senescentes inducidas con doxorubicina usando el anticuerpo policlonal (figura 3B). Además, se observa en condiciones control una mayor intensidad de señal, infiriendo un mayor nivel relativo para este marcador en astrocitos controles en comparación a astrocitos senescentes. Se puede observar que astrocitos senescentes (DOXO) muestran una morfología diferencial en comparación a astrocitos control (DMSO), observándose un notable aumento de tamaño en aquellos senescentes (figura 2 y 3). Dichos cambios están acompañados de diferencias en la distribución de los microfilamentos, donde actina

pasa de tener una distribución principalmente cortical en la condición control, a una presentación que asemeja fibras de estrés en la condición senescente (Figura 3A). En cuanto a los microtúbulos, el cambio más evidente es una disminución en la señal en relación con el tamaño de la célula en la condición de senescencia (Figura 3A).

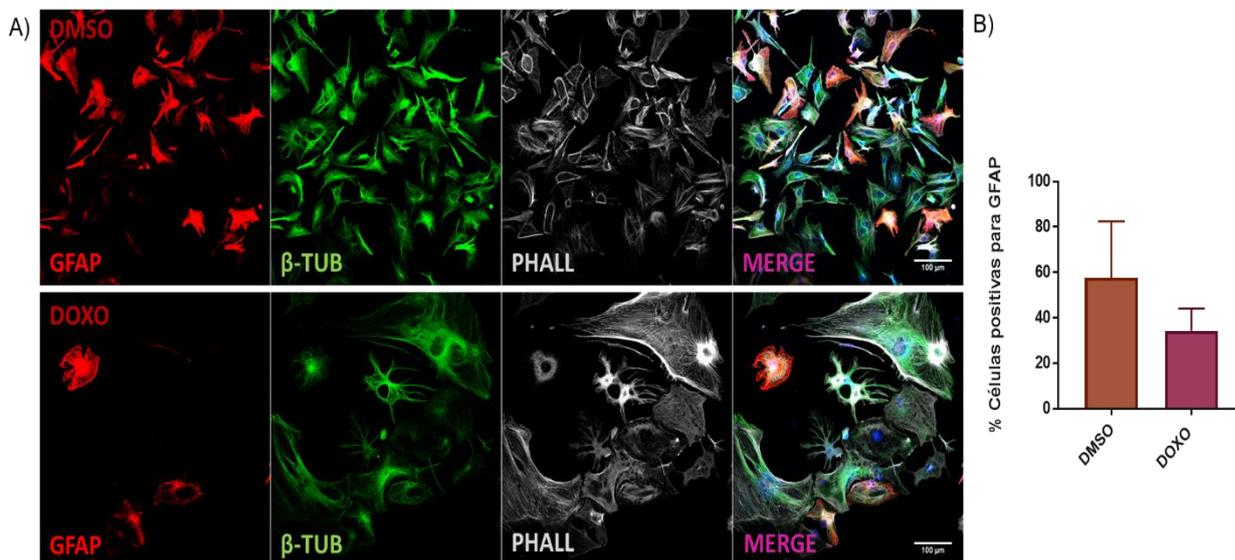


Figura 3. Imágenes de microscopía confocal de co-inmunofluorescencias muestran un mayor marcaje de GFAP en astrocitos control en comparación a astrocitos senescentes. (A) Cultivos primarios de astrocitos controles y senescentes fueron inmunomarcados contra el marcador de astrocito GFAP-poly (rojo) y el marcador de citoesqueleto Pan- $\beta$ -tubulina (verde). Adicionalmente se usó faloidina (phall) y Hoechst (azul) para visualizar el total de las células. En (B) se grafica el porcentaje promedio y desviación estándar de las células positivas para GFAP. No se presentaron valores significativos luego de realizar un t-test. n=3 réplicas biológicas;  $\geq 200$  células por condición. Scale bar: 50  $\mu$ m.

## **Evaluación de niveles de cAMP:**

### **Tratamientos con BHB en células C8D1A no muestran diferencias concluyentes en los niveles de cAMP evidenciado por ensayos de ELISA competitivo.**

Durante el transcurso del presente seminario de título hubo problemas con la obtención de animales para generar los cultivos primarios de astrocitos. Ante esta situación, decidimos explorar parte de nuestra hipótesis en la línea celular derivada de astrocitos C8D1A. Así, decidimos evaluar el efecto de BHB, uno de los principales cuerpos cetónicos en la circulación sanguínea de humanos y otros mamíferos, sobre la inducción de cAMP. Con el fin de promover el consumo de BHB, se optó, en un principio, por utilizar bajas concentraciones de glucosa en el medio (2,5 mM). De este modo, extractos de proteínas totales a partir de la línea celular C8D1A tratada con 2 mM y 10 mM de BHB durante 24hrs fueron ensayados para determinar niveles de cAMP mediante ELISA competitivo (figura 4). Siguiendo indicaciones del fabricante, diferencias en la absorbancia de las muestras se relacionaron con las diferencias en las concentraciones de cAMP intracelular. Tras analizar las muestras se observa una ligera tendencia al aumento en la cantidad de cAMP en la condición 10 mM de BHB, y una leve disminución en la condición 2 mM de BHB con relación al control negativo sin BHB. Dichas diferencias sin embargo no resultaron estadísticamente significativas. Tampoco se observó diferencias en la condición de células tratadas con dbcAMP utilizada como "control positivo".

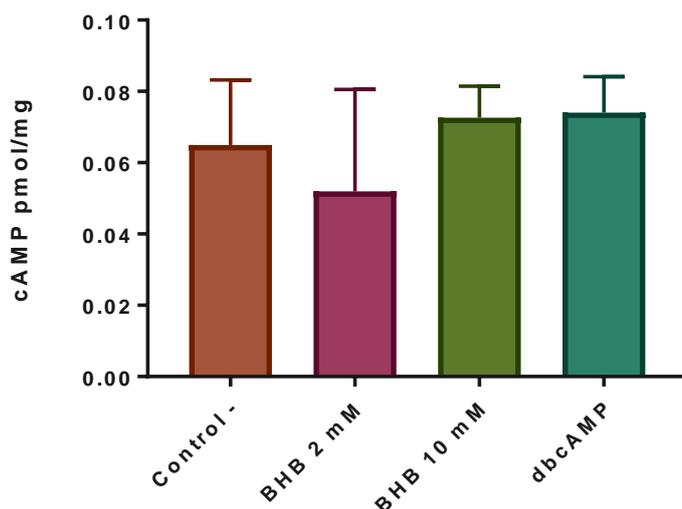


Figura 4. Medición de niveles de cAMP por ensayo de ELISA competitivo en línea celular C8D1A, no muestra diferencias significativas en muestras tratadas con BHB. Cantidades de cAMP intracelular en picomoles por miligramo fueron graficadas por cada tratamiento. Las barras corresponden al promedio y la desviación estándar de la medición en relación con cada condición. No se presentan diferencias significativas en ninguna de las condiciones a partir de un análisis de One-way ANOVA ( $p < 0,05$ ).  $n=2$  réplicas biológicas.

**Tratamientos con BHB en células C8D1A no muestra diferencias en los niveles de cAMP intracelular evidenciado por sensor FRET-EPAC.**

Debido a que la detección de cAMP en el ensayo de ELISA no evidenció diferencias significativas, decidimos utilizar una segunda aproximación basada en la utilización de un sensor genético que puede detectar los cambios de cAMP dentro de las células. Para ello, cultivos de la línea celular C8D1A tratados con 2 mM, 5 mM y 10 mM de BHB durante 24hrs en condiciones de baja glucosa (2,5mM) fueron utilizados para evaluar los niveles intracelulares de cAMP mediante el sensor FRET de cAMP basado en la proteína intercambiadora de GTP EPAC (FRET-EPAC).

Es importante mencionar que para efectos de análisis de los ensayos FRET se seleccionaron campos de célula única debido a que la eficiencia de transfección de los astrocitos esta alrededor de un 30%, lo cual impide encontrar campos con varias células transfectadas a la vez.

En líneas celulares derivadas de astrocitos, se observó que la condición tratada con 2 mM de BHB, muestra un leve aumento, no significativo, en los niveles intracelulares de cAMP, lo que se traduce en una disminución del ratio del FRET (Figura 5). No se observaron diferencias en las otras condiciones ensayadas.

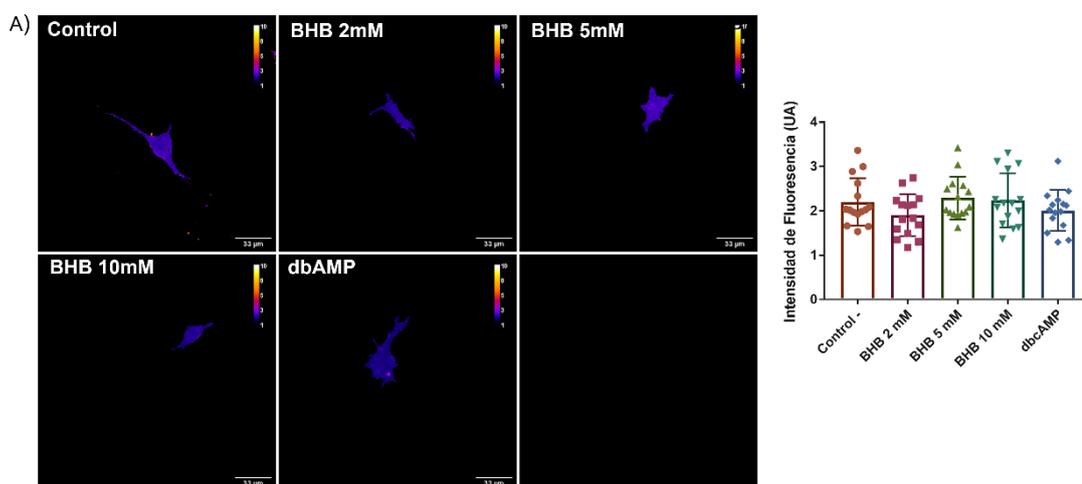


Figura 5. Imágenes de microscopía confocal de sensor FRET-EPAC no muestra diferencias en los niveles intracelulares de cAMP en muestras de línea celular C8D1A. (A) Se visualiza a través de un mapa térmico cambios en los niveles de cAMP bajo condición control, distintas concentraciones de BHB y dbcAMP como control positivo. Observando una coloración rojiza en aquellas con menor expresión y una coloración azul en aquellas condiciones con mayor expresión. Adicionalmente en (B) el gráfico nos muestra de manera cuantitativa las variaciones entre las distintas condiciones. Las barras corresponden al promedio y a la desviación estándar de la medición con relación a cada condición. No se observa un aumento significativo a

partir de un análisis One-way ANOVA ( $p < 0,05$ ). Scale bar: 50  $\mu\text{m}$ .  $n=1$ , 10-15 células por condición.

**Tratamientos con BHB muestran una inducción de cAMP intracelular en cultivo de primario de astrocitos murinos que es inhibida en astrocitos senescentes evidenciado por sensor FRET-EPAC.**

Con el fin de tener una mejor aproximación de lo que sucede a nivel celular. Se utilizaron cultivos primarios de astrocitos murinos tratados con 2 mM y 10 mM de BHB durante 24hrs en condiciones normales de glucosa (5 mM), para evaluar los niveles intracelulares de cAMP mediante el sensor FRET de cAMP basado en EPAC (FRET-EPAC). En cultivos primarios de astrocitos control (DMSO), las condiciones tratadas con 2 mM y 10 mM de BHB, muestran mayores niveles de cAMP intracelular en comparación a la condición control, siendo estadísticamente significativas en 10 mM de BHB (figura 6). La condición de *forskolin*, utilizada como control positivo, también muestran un aumento significativo en los niveles del metabolito con relación al control (figura 6), lo cual es evidenciado por una disminución en la eficiencia del FRET.

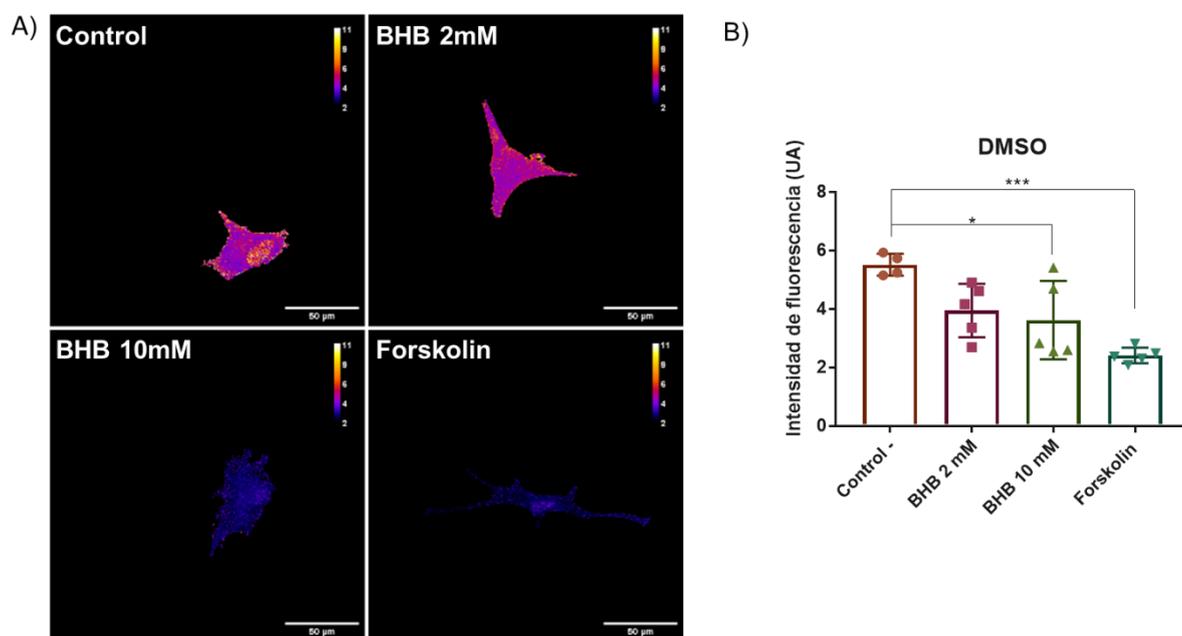


Figura 6. Imágenes de microscopía confocal de sensor FRET-EPAC muestra diferencias significativas en cuanto a niveles intracelulares de cAMP en muestras de cultivo primario de astrocitos en condición control (DMSO) tratadas con BHB. (A) Se visualiza a través de un mapa térmico cambios en los niveles de cAMP bajo condición control, distintas concentraciones de BHB y *forskolin* como control positivo. Observando una coloración rojiza en aquellas con menor expresión y una coloración azul en aquellas condiciones con mayor expresión. Adicionalmente en (B) el gráfico nos muestra de manera cuantitativa las variaciones entre las distintas condiciones. Las barras corresponden al promedio y a la desviación estándar de la medición con relación a cada condición. Se observan diferencias significativas en la condición de 10 mM de BHB, y *forskolin* en relación con el control a partir de un análisis One-way ANOVA ( $p < 0,05$ ). Scale bar: 50  $\mu\text{m}$ .  $n=1$ , 5 células por condición.

En cultivos primarios de astrocitos inducidos a senescencia (DOXO), las condiciones tratadas con BHB, no muestran variaciones en los niveles intracelulares de cAMP con relación al control negativo (figura 7), como sí se observó en astrocitos no senescentes (figura 6). El control positivo tratado con *forskolin* muestra diferencias significativas en cuanto al control negativo, presentando un mayor nivel del metabolito en relación con las otras condiciones (figura 7) evidenciado por el cambio en la eficiencia en el sensor, donde se observa un menor ratio de FRET asociado con un aumento en los niveles de cAMP.

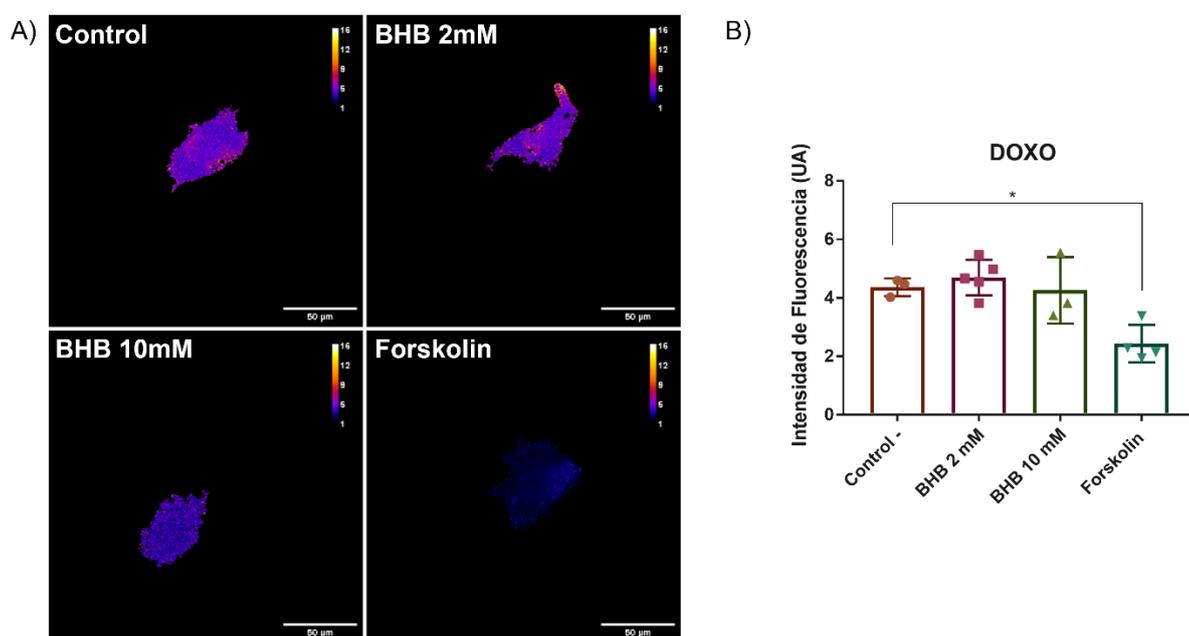


Figura 7. Imágenes de microscopía confocal de sensor FRET-EPAC no muestran diferencia en los niveles de cAMP en muestras de cultivo primario de astrocitos en condición senescente (DOXO) tratadas con BHB. (A) Se visualiza a través de un mapa térmico cambios en los niveles de cAMP bajo condición control, distintas concentraciones de BHB y *forskolin* como control positivo. Observando una coloración rojiza en aquellas con menor expresión y una coloración azul en aquellas condiciones con mayor expresión. Adicionalmente en (B) el gráfico nos muestra de manera cuantitativa las variaciones entre las distintas condiciones, sin observar

diferencias entre las condiciones tratadas con BHB y el control. Sin embargo, se observa un aumento significativo del metabolito en el control positivo *forskolin* con relación al control negativo a partir de un análisis One-way ANOVA ( $p < 0,05$ ). Las barras corresponden al promedio y a la desviación estándar de la medición con relación a cada tratamiento. Scale bar: 50  $\mu\text{m}$ .  $n=1, 5$  células por condición.

#### **Determinación de la vía de señalización activada por cAMP:**

#### **Tratamientos con BHB en células C8D1A no muestran diferencias en la actividad de PKA evidenciado por sensor FRET-AKAR4.**

Basado en los antecedentes reportados en la literatura, nuestra hipótesis indicaba que los cambios asociados a la presencia de cAMP inducirían un aumento en la actividad de la proteína quinasa A (PKA). En consecuencia, en el siguiente set de experimentos decidimos evaluar, si el BHB induce un aumento en la actividad de PKA. Para ello, cultivos de la línea celular C8D1A tratados con 2 mM, 5 mM y 10 mM de BHB durante 24hrs en condiciones de baja glucosa (2,5 mM) fueron utilizados para evaluar la actividad de PKA mediante el sensor FRET de PKA llamado AKAR4 (FRET-AKAR4). En la línea celular derivada de astrocitos, no se observó diferencias en la actividad de PKA en aquellas muestras tratadas con BHB en comparación a la condición control (figura 8). A su vez no se observan diferencias con la condición de control positivo usando dbcAMP (figura 8).

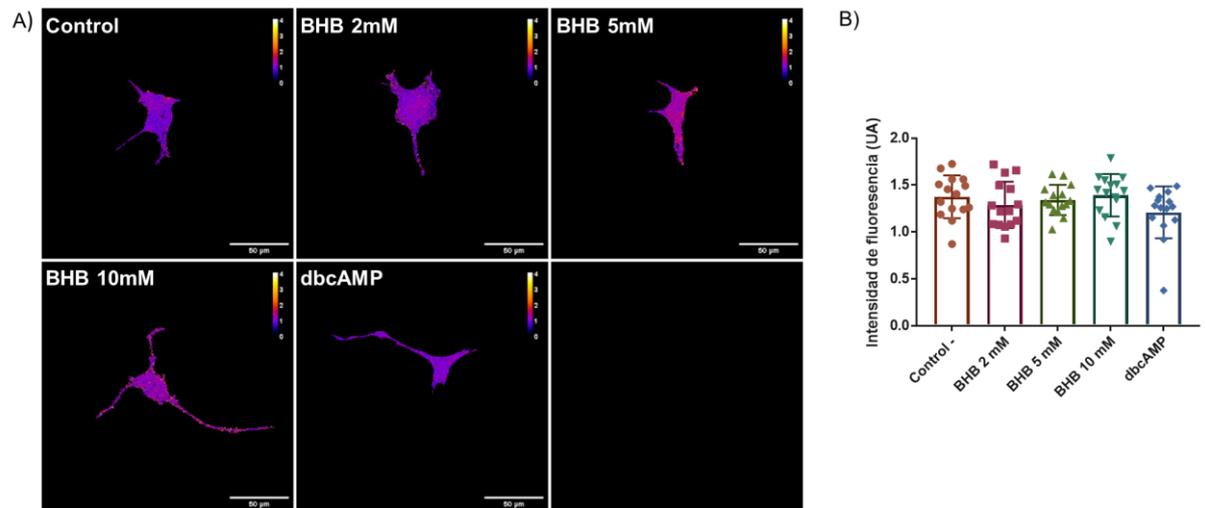


Figura 8. Imágenes de microscopía confocal de sensor FRET AKAR4 no muestra diferencias en la actividad de PKA en muestras de la línea celular C8D1A tratadas con BHB. (A) Se visualiza a través de un mapa térmico cambios en la actividad de PKA bajo condición control, distintas concentraciones de BHB, y dbcAMP. Observando una coloración azul en aquellas con menor actividad y una coloración más bien rojiza en aquellas condiciones con mayor actividad. Adicionalmente en (B) el gráfico nos muestra de manera cuantitativa las variaciones en la intensidad de fluorescencia observando una mayor intensidad de fluorescencia asociada con un aumento en la actividad del metabolito entre las distintas condiciones. Las barras corresponden al promedio y a la desviación estándar de la medición con relación a cada tratamiento. No se observan diferencias significativas a partir de un análisis One-way ANOVA. Scale bar: 50  $\mu\text{m}$ . n=1, 10-15 células por condición.

**Tratamientos con BHB muestran una tendencia al aumento de la actividad de PKA en cultivos primarios de astrocitos murinos control y senescentes evidenciado por sensor FRET-AKAR4.**

Cultivos primarios de astrocitos tratados con 2 mM y 10 mM de BHB durante 24hrs en condiciones normales de glucosa (5 mM) fueron utilizados para evaluar la actividad de PKA mediante el sensor FRET de PKA (FRET-AKAR4). En cultivos primarios de astrocitos en la condición control (DMSO), se observa un aumento en la actividad de PKA en la condición de 2 mM y 10 mM de BHB en relación con el control. Sin embargo, no se observan diferencias estadísticamente significativas (figura 9). A su vez, se observa un aumento no estadísticamente significativo de la actividad de PKA en el control positivo (figura 9).

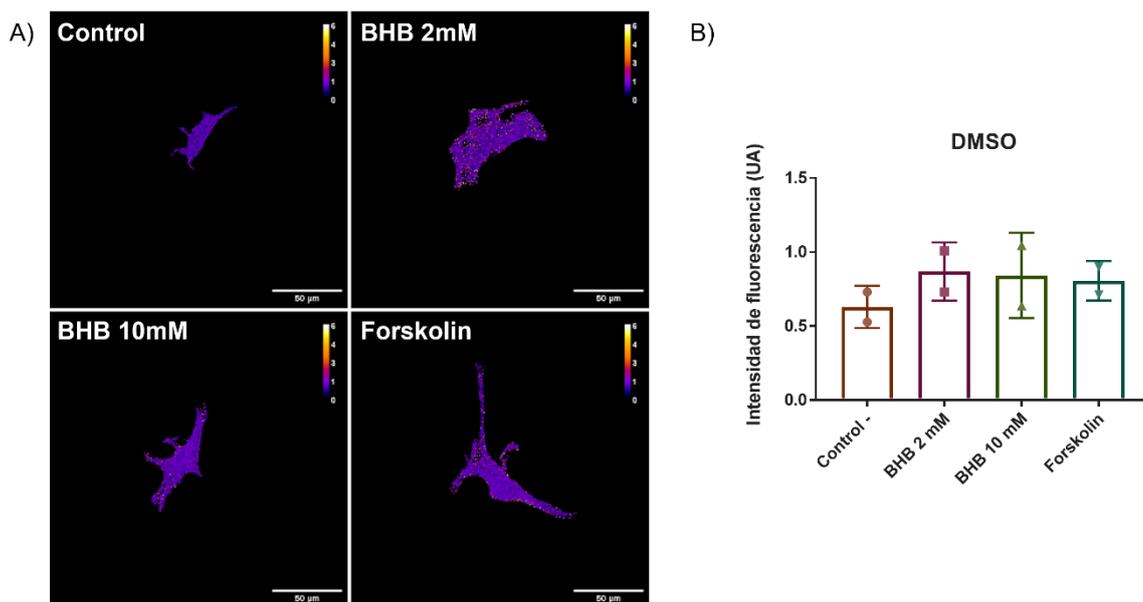


Figura 9. Imágenes sensor FRET AKAR4 en cultivo primario de astrocitos en condición control (DMSO) muestra una tendencia al aumento en la actividad de PKA en muestras tratadas con BHB. (A) Se visualiza a través de un mapa térmico

cambios en la actividad de PKA bajo condición control, distintas concentraciones de BHB, y dbcAMP. Observando una coloración azul en aquellas con menor actividad y una coloración más bien rojiza en aquellas condiciones con mayor actividad. Adicionalmente en **(B)** el gráfico nos muestra de manera cuantitativa las variaciones en la intensidad de fluorescencia observando una mayor intensidad de fluorescencia asociada con un aumento en la actividad entre las distintas condiciones. Las barras indican la intensidad de fluorescencia promedio de los promedios de cada replica biológica (n), junto a la desviación estándar correspondiente. No se observan diferencias significativas a partir de un análisis One-way ANOVA. Scale bar: 50  $\mu$ m. n=2, 5 células por condición.

De forma similar a los astrocitos controles, cultivos primarios de astrocitos en la condición senescente (DOXO) mostraron un aumento sin significancia estadística en la actividad de PKA en las muestras tratadas con 2 mM y 10 mM de BHB durante 24hrs en relación con el control (figura 10). A su vez, se observa un aumento no significativo de la actividad de PKA en el control positivo (figura 10).

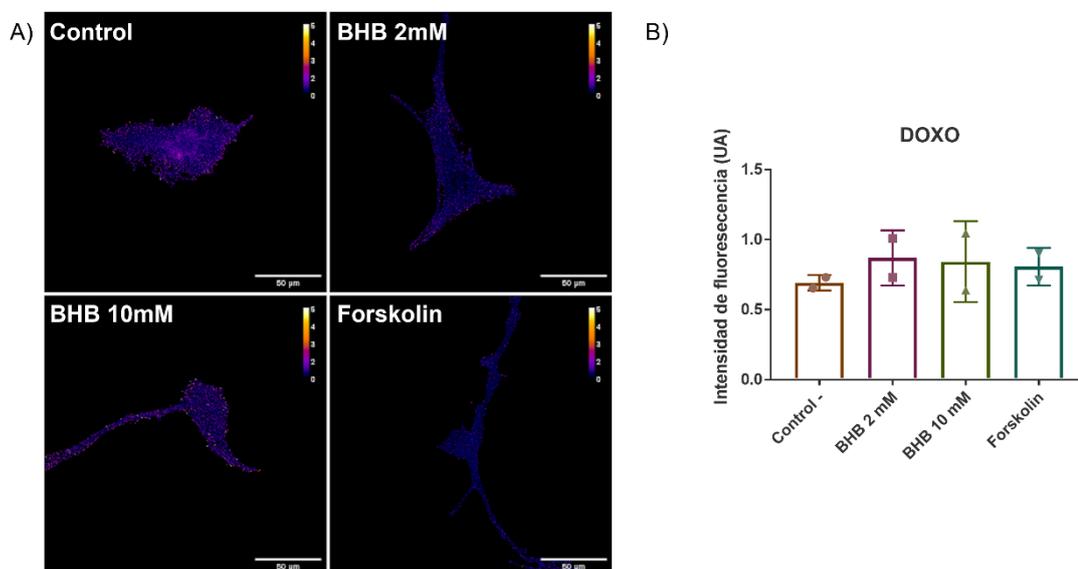


Figura 10. **Imágenes sensor FRET AKAR4 en cultivo primario de astrocitos en condición senescente (DOXO) muestra una tendencia al aumento en la actividad de PKA en muestras tratadas con BHB. (A)** Se visualiza a través de un mapa térmico cambios en la actividad de PKA bajo condición control, distintas concentraciones de BHB, y dbcAMP. Observando una coloración azul en aquellas con menor actividad y una coloración más bien rojiza en aquellas condiciones con mayor actividad. Adicionalmente en **(B)** el gráfico nos muestra de manera cuantitativa las variaciones en la intensidad de fluorescencia observando una mayor intensidad de fluorescencia asociada con un aumento en la actividad entre las distintas condiciones. Las barras indican la intensidad de fluorescencia promedio de los promedios de cada replica biológica (n), junto a la desviación estándar correspondiente. No se observan diferencias significativas a partir de un análisis One-way ANOVA. Scale bar: 50  $\mu$ m. n=2, 5 células por condición.

#### **Evaluación de la expresión y localización de GLT1 y GLAST:**

#### **Ensayos Western-blot de extractos de proteína total de la línea celular C8D1A para diferentes marcadores.**

Decidimos observar si las tendencias evidenciadas en la señalización inducida por cuerpos cetónicos en astrocitos, podría correlacionar con cambios en la expresión de los transportadores de glutamato. Para ello, extractos de proteína total de astrocitos de la línea celular C8D1A bajo los diferentes tratamientos utilizados a lo largo de este seminario de título, fueron utilizados para ensayos de WB en conjunto a distintos anticuerpos para evaluar la presencia de las proteínas correspondientes. Se observa una expresión homogénea de proteínas totales (figura 11A). Se utilizó GAPDH (figura 11B) como proteína de expresión constitutiva, observando una carga homogénea de las distintas muestras. Se realizó un inmunomarcaje contra

los transportadores GLT1 y GLAST (figura 11C-D) respectivamente, donde la migración esperada correspondía a 64 kDa en el caso de GLT1 y 60 kDa en el caso de GLAST. Se vio una marca cercana a los 70kDa que podría corresponder a la forma no glicosilada de las proteínas. Adicionalmente, se observó una marca en 130kDa (figura 11C-D) que podría corresponder a la forma glicosilada de las proteínas (Danbolt, N. C., 2001).

Se realizó un WB distinto con las mismas muestras en las mismas condiciones para evaluar ALDH1L1 un marcador propio de astrocitos (figura 11E), observando una banda en aproximadamente los 100Kda, según lo esperado.

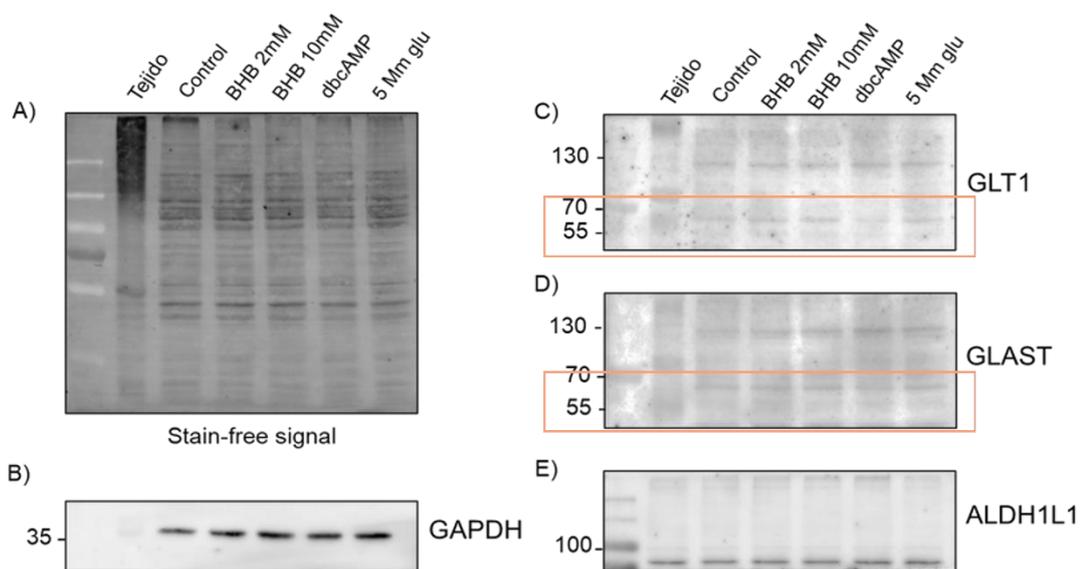


Figura 11. Membrana revelada de Western-blot para marcadores en astrocitos tratados de líneas celulares C8D1A. Se observan los inmunoblots realizados evaluando distintos marcadores bajo distintos tratamientos. n= 3.

**Inmunofluorescencias en cultivos primarios de astrocitos murinos muestran cambios en la detección de los transportadores GLT1 y GLAST tras tratamientos.**

Los ensayos de inmunoblot no mostraron resultados concluyentes. En consecuencia, decidimos establecer un protocolo complementario basado en IF indirecta para evidenciar la presencia de los transportadores de glutamato en la membrana plasmática de astrocitos tratados con BHB.

Astrocitos primarios crecidos directamente sobre cubres de vidrio fueron utilizados para ensayos de inmunocitoquímica de fluorescencia, usando anticuerpos primarios hechos en conejo contra epítopes extracelulares de los transportadores GLT-1 y GLAST. Se realizaron ensayos en condiciones sin permeabilización y con permeabilización (PBS-triton 0,2 %).

Es importante tener en consideración que la expresión y localización de los marcadores fue evaluada mediante microscopía confocal, registrando un Z-stack de cada célula y posterior análisis en software ImageJ mediante MAX intensity de cada foto. Utilizando los mismos parámetros de adquisición de imágenes entre cada condición.

Así, en cultivo primario de astrocitos control (DMSO), el transportador GLT1 se observa de una manera más localizada en la parte central de la célula tanto en la condición sin permeabilización como en la condición con permeabilización. En la condición sin permeabilización se observa una detección más bien leve, además de no observarse diferencias significativas en la detección del transportador tras aplicarse tratamientos con BHB o *forskolin*. Sin embargo, en condiciones con permeabilización, se ve un aumento en la detección además de una tendencia al

aumento en muestras tratadas BHB y *forskolin* mostrando un aumento significativo con este último (figura 12).

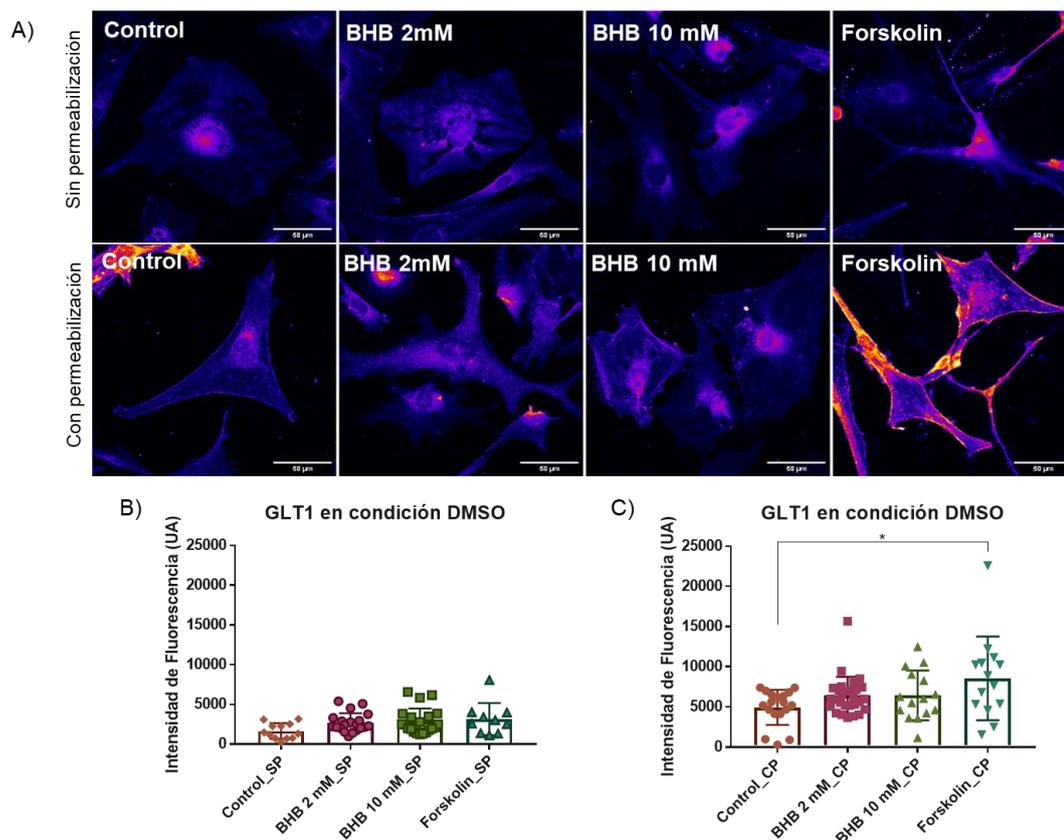


Figura 12. Imágenes de microscopía confocal de inmunofluorescencias para el transportador de glutamato GLUT1 en condición control (DMSO) muestra un aumento en la detección del transportador sin y con permeabilización. (A) Cultivos primarios de astrocytes en condición control (DMSO) fueron inmunomarcados contra GLUT1 bajo condición control, distintas concentraciones de BHB y *forskolin*. Las imágenes fueron tomadas en 16 bits lo que entrega un rango dinámico entre 0 y 65535 para las UA. La medición considera la fluorescencia promedio del área seleccionada; célula completa. En (A) se observan diferencias en la localización del transportador en las distintas condiciones, indicadas por una diferencia en la coloración, observando en colores amarillos-anaranjados una mayor expresión y en colores azules una menor expresión, correlacionada con la intensidad

de fluorescencia detectada. En **(B)** se grafica la intensidad de fluorescencia detectada del transportador en condiciones sin permeabilización, mientras que en **(C)** se grafica la intensidad de fluorescencia detectada del transportador en condiciones con permeabilización con los tratamientos aplicados. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de la medición con relación a los tratamientos aplicados. Se observa una diferencia significativa con el control positivo *forskolin* en la condición con permeabilización a partir de un análisis One-way ANOVA ( $p < 0.05$ ). Scale bar: 50  $\mu\text{m}$ .  $n=1$ , 10-20 células por condición.

En cultivo primario de astrocitos senescentes (DOXO), el transportador GLT1 se observa de manera más bien periférica en la condición sin permeabilización, mientras que en la condición con permeabilización se observa localizado en el centro de la célula. Adicionalmente, en la condición sin permeabilización se observa una disminución en la detección del transportador en las distintas condiciones con relación al control. Lo contrario se observa en la condición con permeabilización donde se ve un leve aumento en la detección del transportador en las distintas condiciones con relación al control. Sin embargo, no se observan diferencias entre los tratamientos (figura 13).

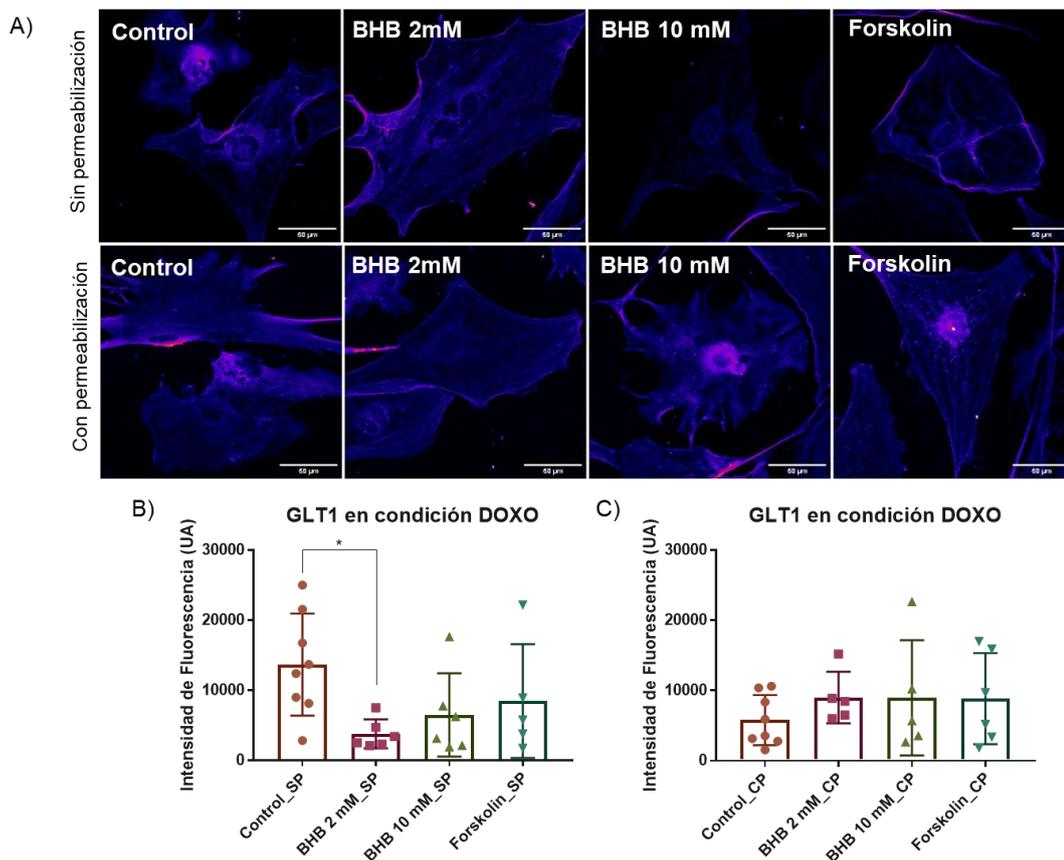


Figura 13. Imágenes de microscopía confocal de inmunofluorescencias para el transportador de glutamato GLUT1 (DOXO) muestra un aumento en la detección en condiciones con permeabilización. Cultivos primarios de astrocitos en condición senescente (DOXO) fueron inmunomarcados contra GLUT1 bajo condición control, distintas concentraciones de BHB y *forskolin*. Las imágenes fueron tomadas en 16 bits lo que entrega un rango dinámico entre 0 y 65535 para las UA. La medición considera la fluorescencia promedio del área seleccionada; célula completa. En (A) se observan diferencias en la localización del transportador en las distintas condiciones, indicadas por una diferencia en la coloración, observando en colores amarillos-anaranjados una mayor expresión y en colores azules una menor expresión, correlacionada con la intensidad de fluorescencia detectada. En (B) se grafica la intensidad de fluorescencia detectada del transportador en condiciones sin permeabilización, mientras que en (C) se grafica la intensidad de fluorescencia

detectada del transportador en condiciones con permeabilización con los tratamientos aplicados. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de la medición con relación a los tratamientos aplicados. Se observa una diferencia significativa en la condición de BHB 2 mM en comparación al control en condiciones sin permeabilización a partir de un análisis One-way ANOVA ( $p < 0.05$ ). Scale bar: 50  $\mu\text{m}$ .  $n=1$ , 10-20 células por condición.

En cultivo primario de astrocitos control (DMSO), se observa que el transportador GLAST presenta una localización que tiende a situarse mayoritariamente en el centro de la célula en las distintas condiciones. Adicionalmente, en condiciones sin permeabilización se observa un aumento en la detección del transportador al aplicar los tratamientos en comparación al control. Mientras que en condiciones con permeabilización no se producen mayores diferencias en la detección del transportador entre los tratamientos, exceptuando al control positivo con *forskolin*, que muestra cambios significativos además de mostrar cambios en la localización del transportador (figura 14).

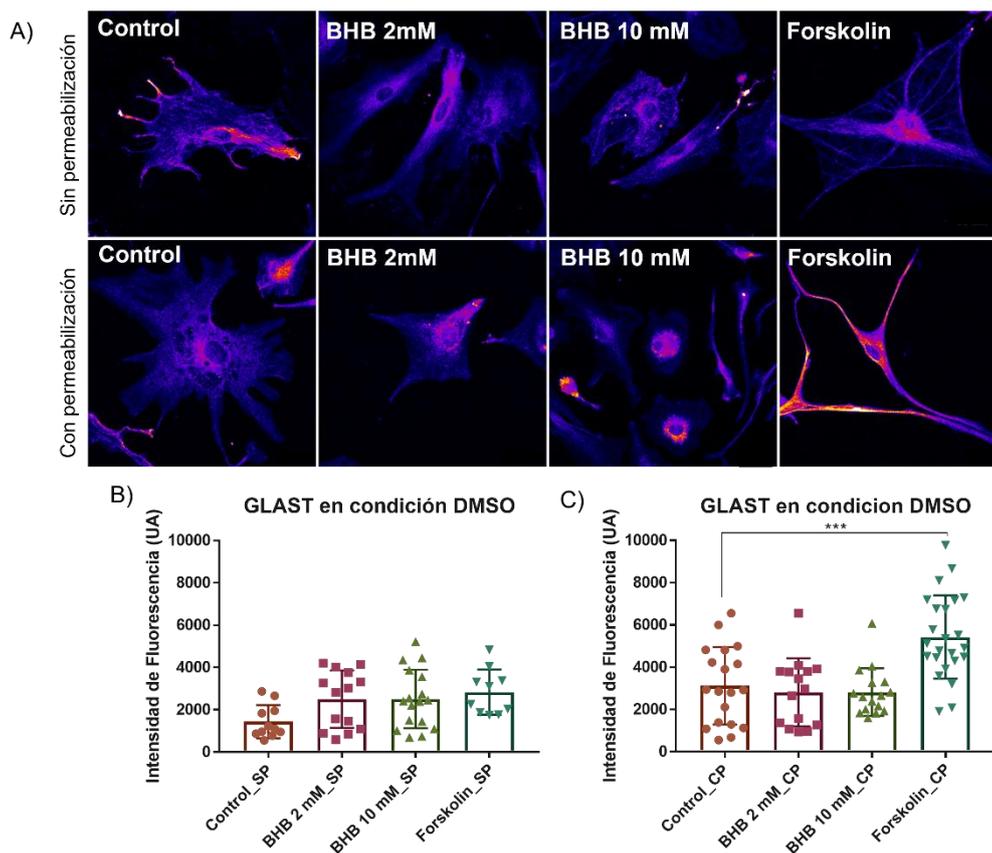


Figura 14. Imágenes de microscopía confocal de inmunofluorescencias para el transportador de glutamato GLAST en condición control (DMSO) muestra un aumento en la detección en condiciones sin permeabilización. Cultivos primarios de astrocitos en condición control (DMSO) fueron inmunomarcados contra GLAST bajo condición control, distintas concentraciones de BHB y *forskolin*. Las imágenes fueron tomadas en 16 bits lo que entrega un rango dinámico entre 0 y 65535 para las UA. La medición considera la fluorescencia promedio del área seleccionada; célula completa. En (A) se observan diferencias en la localización del transportador en las distintas condiciones, indicadas por una diferencia en la coloración, observando en colores amarillos-anaranjados una mayor expresión y en colores azules una menor expresión, correlacionada con la intensidad de fluorescencia detectada. En (B) se grafica la intensidad de fluorescencia detectada del transportador en condiciones sin permeabilización, mientras que en (C) se grafica

la intensidad de fluorescencia detectada del transportador en condiciones con permeabilización con los tratamientos aplicados. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de la medición con relación a los tratamientos aplicados. Se observa una diferencia significativa en el control positivo *forskolin* en comparación al control en condiciones con permeabilización a partir de un análisis One-way ANOVA ( $p < 0.05$ ). Scale bar: 50  $\mu\text{m}$ .  $n=1$ , 10-20 células por condición.

En cultivo primario de astrocitos senescentes (DOXO), se observa más bien una localización heterogénea del transportador GLAST que tiende a situarse en el centro en la condición sin y con permeabilización. Además, en la condición sin permeabilización se observa una mayor detección del transportador en las condiciones tratadas con BHB en relación con el control. Mientras que en la condición con permeabilización no se ven mayores diferencias en la detección del transportador entre las distintas condiciones con relación al control (figura 15).

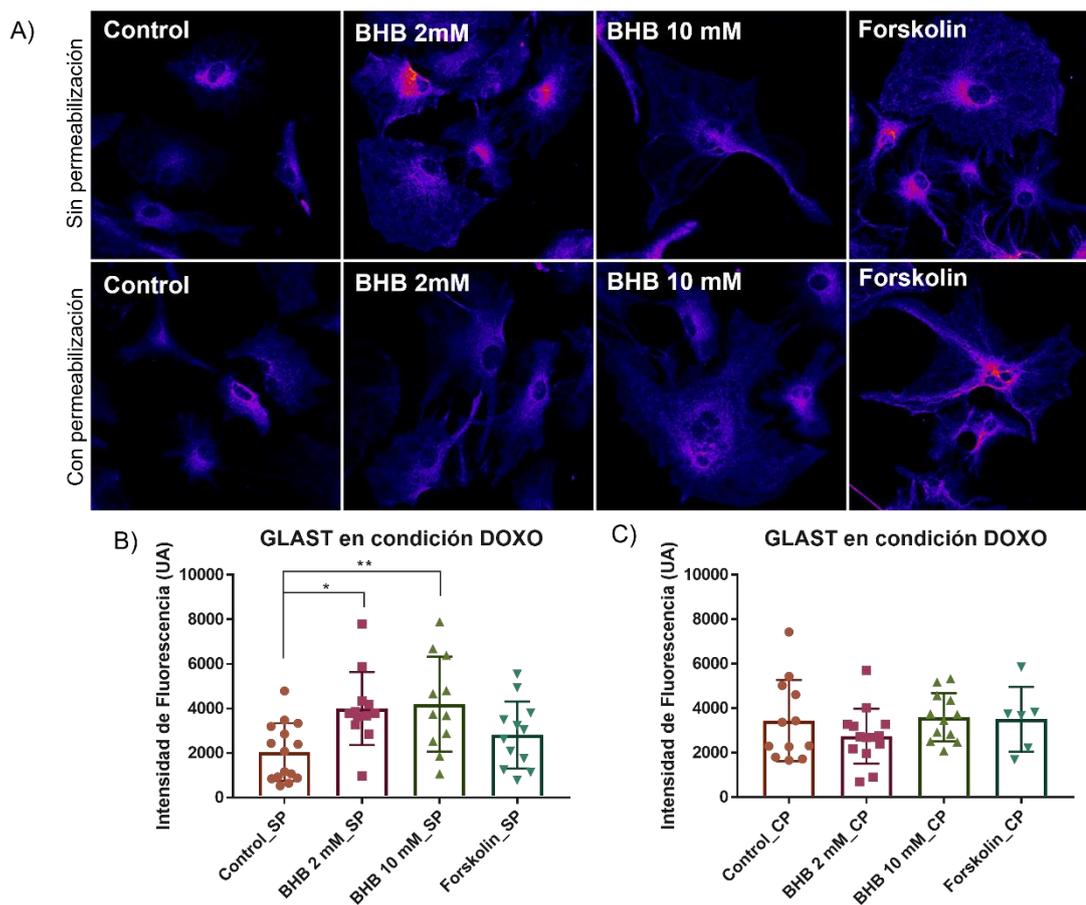


Figura 15. Imágenes de microscopía confocal de inmunofluorescencias para el transportador de glutamato GLAST (DOXO) muestran un aumento significativo en la detección con los tratamientos de BHB aplicados en la condición sin permeabilización. Cultivos primarios de astrocitos en condición senescente (DOXO) fueron inmunomarcados contra GLAST bajo condición control, distintas concentraciones de BHB y *forskolin*. Las imágenes fueron tomadas con un aumento de 40X en aceite de inmersión, en 16 bits lo que entrega un rango dinámico entre 0 y 65535 para las UA. La medición considera la fluorescencia promedio del área seleccionada; célula completa. En (A) se observan diferencias en la localización del transportador en las distintas condiciones, indicadas por una diferencia en la coloración, observando en colores amarillos-anaranjados una mayor expresión y en colores azules una menor expresión, correlacionada con la intensidad de

fluorescencia detectada. En **(B)** se grafica la intensidad de fluorescencia detectada del transportador en condiciones sin permeabilización, mientras que en **(C)** se grafica la intensidad de fluorescencia detectada del transportador en condiciones con permeabilización con los tratamientos aplicados. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de la medición con relación a los tratamientos aplicados. Se observa una diferencia significativa en BHB 2 y 10 mM en comparación al control en condiciones sin permeabilización a partir de un análisis One-way ANOVA ( $p < 0.05$ ). Scale bar: 50  $\mu\text{m}$ .  $n=1$ , 10-20 células por condición.

### **Astroцитos primarios generan cambios morfológicos gatillados por estimulación de la vía cAMP mediante forskolin.**

Imágenes de microscopía confocal de IF de cultivos primarios de astroцитos fueron utilizadas para analizar distintos parámetros con el software ImageJ. Se analizaron parámetros como el área y perímetro celular, circularidad que indica que tanto se acerca la célula a un círculo perfecto la según la fórmula ( $\text{circularity} = 4\pi (\text{area}/\text{perimetro}^2)$ ), tomando valores cercanos a 1 cuando se trata de un círculo perfecto y 0 cuando tiene una forma más bien poligonal. Y, por último, solidez que indica la regularidad en la morfología celular según la fórmula ( $\text{solidez} = \text{Área} / \text{Área convexa}$ ), tomando valores cercanos a 1 cuando la superficie es más bien regular y 0 cuando es irregular. Astroцитos primarios en condición control (DMSO) muestran una tendencia no significativa a disminuir el área en los tratamientos con 2mM de BHB y *forskolin*, pero no en 10mM de BHB. Esto se encuentra acompañado a nulos cambios en el perímetro, lo que podría sugerir una retracción en el tamaño celular acompañado de la generación de proyecciones asociadas a la estelación en astroцитos. Estos cambios se ven reflejados significativamente en el control positivo *forskolin* donde se observa una disminución tanto de la circularidad como de la

solidez, siendo este último parámetro significativo. Lo cual da cuenta de una forma menos circular y por ende más irregular. Esto indicaría que nuestros cultivos primarios de astrocitos controles son susceptibles a los cambios morfológicos asociados a la vía de cAMP como se ha reportado previamente (Brozzi F y col. 2009).

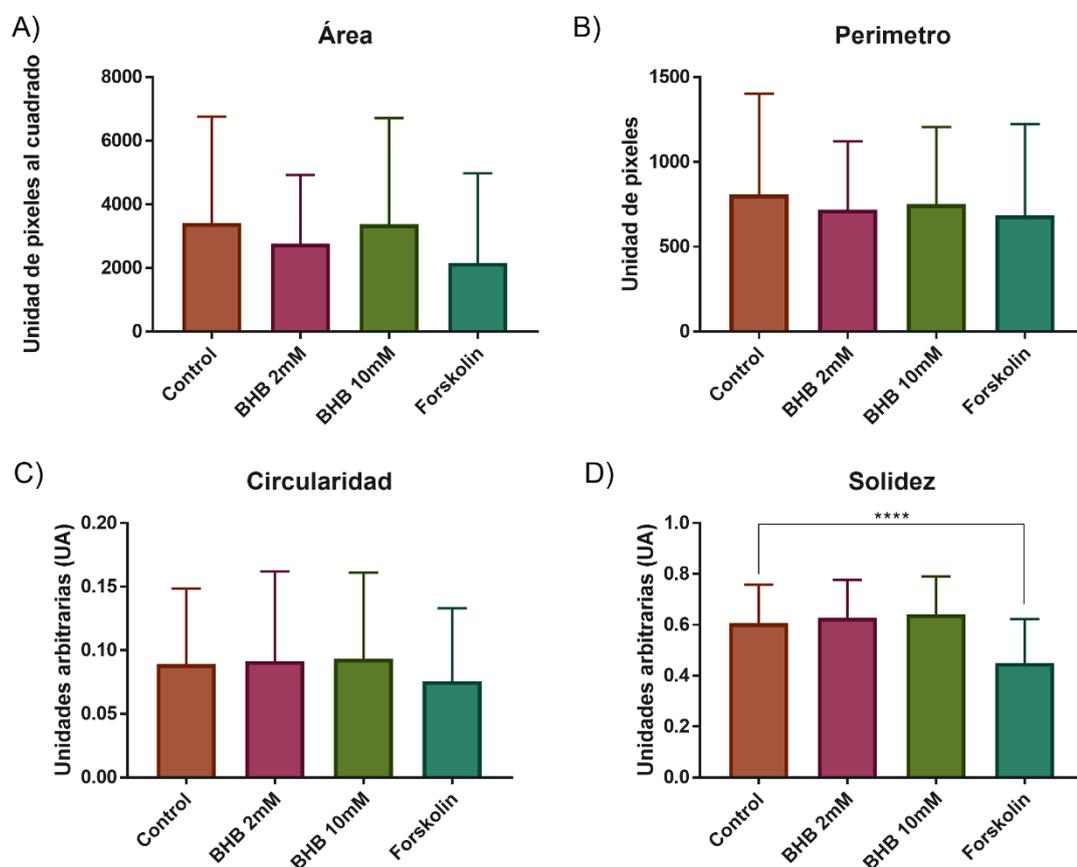


Figura 16. **Parámetros de forma a partir de imágenes de microscopía confocal de inmunofluorescencias de cultivos primarios de astrocitos control (DMSO) sugiere una estelación de estos mismos.** Cultivos primarios de astrocitos en condición control (DMSO) fueron inmunomarcados contra Faloidina bajo condición control, distintas concentraciones de BHB y *forskolin*. Se observa **(A)** una disminución en el área celular en tratamientos de BHB 2Mm y *forskolin* en relación con el control, siendo esta pronunciada en condición *forskolin* más no significativa. Se observa **(B)** que no se producen cambios en el perímetro celular con los distintos tratamientos

con relación al control en las distintas condiciones. Se observa **(C)** una leve disminución de la circularidad en la condición *forskolin* con relación al control, sin observarse diferencias en las demás condiciones. Se observa **(D)** una solidez más bien homogénea entre las distintas condiciones, sin embargo, se muestran diferencias significativas en la condición *forskolin* con relación al control a partir de un análisis One-way ANOVA ( $p < 0.05$ ).  $n=2$ , 10-20 células por condición.

Al comparar el tamaño celular de astrocitos primarios en condición senescente (DOXO) con astrocitos primarios en condición control, observamos que astrocitos senescentes muestran un mayor tamaño celular, según lo esperado. Por otro lado, astrocitos senescentes muestran una tendencia al aumento en el área de células tratadas con 2 mM de BHB y *forskolin*, lo que condice con el aumento observado en el perímetro en estas mismas condiciones, siendo estadísticamente significativo en la condición *forskolin* (figura 17B). Adicionalmente se produce una disminución significativa en la solidez de la condición tratada con *forskolin*, indicando que astrocitos senescentes son susceptibles de cambios gatillados por cAMP. Sin embargo, es notorio que cambios en la solidez de astrocitos senescentes tratados con *forskolin* (figura 17D) son menos significativos que astrocitos controles (Figura 16D), sugiriendo una menor estelación de los astrocitos senescentes.

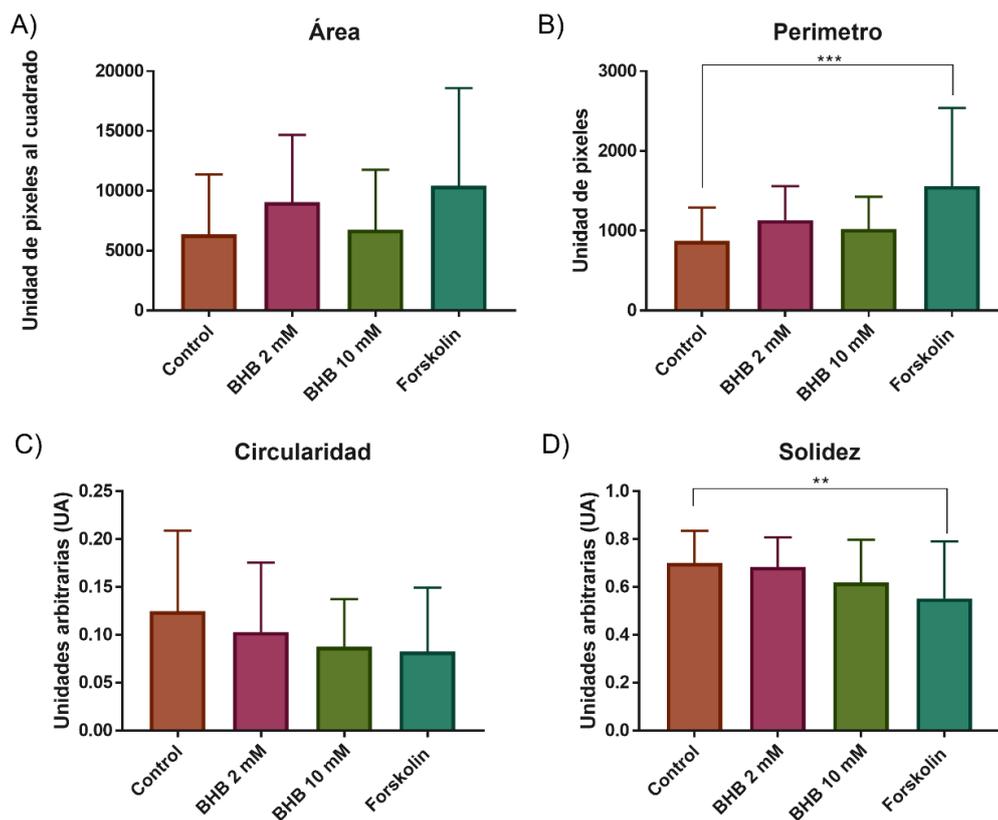


Figura 17. Parámetros de forma a partir de imágenes de microscopía confocal de inmunofluorescencias de cultivos primarios de astrocitos senescentes (DOXO) muestran un mayor tamaño que astrocitos control (DMSO) y una menor susceptibilidad a la estelación. Cultivos primarios de astrocitos en condición senescente (DOXO) fueron inmunomarcados contra Faloidina bajo condición control, distintas concentraciones de BHB y *forskolin*. Se observa (A) un aumento en el área celular en las condiciones de BHB 2 mM y *forskolin* con relación al control, siendo esta pronunciada en condición *forskolin* más no significativa. De igual manera se observa (B) un aumento en el perímetro bajo las distintas condiciones, observando un aumento significativo en la condición *forskolin* en relación con el control. Se observa (C) una disminución de la circularidad en las distintas concentraciones con relación al control. Se observa (D) una disminución en la solidez entre las distintas condiciones, observándose una diferencia significativa en la condición *forskolin* con

relación al control a partir de un análisis One-way ANOVA ( $p < 0.05$ ).  $n=2$ , 5-10 células por condición.

## DISCUSION Y PROYECCIONES

El envejecimiento es un proceso fisiológico asociado a muchas consecuencias deletéreas en seres vivos. Es por ello por lo que el campo de la gerontología ha puesto esfuerzos en la búsqueda de terapias que permitan retrasar o revertir dichas consecuencias. Algunas de esas terapias se enfocan en la modificación de la dieta, donde las dietas cetogénicas han demostrado tener buenos resultados en términos de longevidad y funciones corporales a distintos niveles, en modelos murinos (Newman, J., 2018). Se ha observado también que los beneficios de las dietas cetogénicas se extienden a órganos altamente sensibles al envejecimiento, como es el cerebro, en distintos modelos animales (Jensen, N. J., 2020).

Una de las principales marcas del envejecimiento en cerebro es el aumento de células gliales senescentes, las cuales promueven, al menos en parte, la aparición de patologías cerebrales asociadas a la edad. Entre ellas, los astrocitos destacan por su importancia en la mantención del fenotipo neuronal y el control de la homeostasis de neurotransmisores. Publicaciones recientes y resultados no publicados de nuestro laboratorio, indican que las dietas cetogénicas promueven vías de señalización gatilladas por cAMP (Erling, Hu., y col., 2018). Estas mismas vías son responsables de la maduración de astrocitos y la ganancia de función de proteínas específicas como GLT-1 y GLAST (Schlag, B. D. y col., 1998) encargadas del control homeostático de glutamato extracelular. Así, nuestro estudio pretendió evidenciar si BHB, uno de los principales cuerpos cetónicos derivados de dietas cetogénicas, promovía un aumento de cAMP y/o ganancia de función de los transportadores de glutamato *in vitro*, usando para ello modelos de cultivos primarios de astrocitos murinos y líneas celulares inmortalizadas derivadas de astrocitos.

Primero, utilizamos técnicas de inmunomarcaje para poder evaluar la expresión de marcadores de astrocitos y senescencia celular en cultivos primarios provenientes de ratón. Mediante técnicas de inmunofluorescencia observamos qué alrededor de un 80% de la población celular se muestra marcada efectivamente para el marcador de astrocitos ALDH1L1, tanto en condiciones control como en astrocitos senescentes (figura 2A). Los resultados para GFAP monoclonal (figura 2A) mostraron una cantidad cercana al 40% de astrocitos control y senescentes marcados positivamente. Así mismo se probó con GFAP policlonal (figura 3B), notando un aumento en las células marcadas positivamente para GFAP con alrededor de un 60% en astrocitos control y un 40% en astrocitos senescentes. El aumento en los astrocitos marcados con GFAP policlonal (figura 3) en comparación con GFAP monoclonal (figura 2) es muy probable que esté asociado a la capacidad del anticuerpo policlonal de marcar las diferentes isoformas de GFAP. Las diferencias en que exista un menor marcaje de GFAP en relación a ALD1L1 puede tener lugar en que la expresión de GFAP depende de la maduración del astrocito y su reactividad. Por lo tanto, es muy probable que este se vea disminuido en condiciones in vitro debido a que cultivos primarios tienden a generar un fenotipo de astrocito más bien inmaduro (Villablanca C., 2023). Sin embargo, los resultados obtenidos de ambos marcadores nos permiten establecer que la técnica de cultivo primario genera cultivos enriquecidos y heterogéneos de astrocitos. A pesar de esto no se descarta en un futuro el uso de otros marcadores contra astrocitos y otros tipos celulares como microglías y fibroblastos para determinar la naturaleza de las células negativas para los marcadores utilizados en este estudio, y así tener mayor certeza de las contaminaciones con otros tipos celulares que pudiesen generarse en el cultivo.

Con el fin de evidenciar el fenotipo senescente, se utilizó un marcador característico de la senescencia celular; Lamina B1, el cual es uno de los mayores componentes

de la lámina nuclear y debiese ver disminuida su expresión en condiciones de senescencia (Matias, I., y col, 2021). Consecuentemente los resultados mostraron una pérdida significativa en la expresión de este marcador para el cultivo de astrocitos en senescentes en comparación a los astrocitos en condición control (figura 1C). Por otra parte, al observar faloidina, un marcador del citoesqueleto de actina (figura 2A-3A) de manera visual podemos notar una reorganización del marcador en astrocitos senescentes en comparación a astrocitos control, lo cual es consecuente con cambios en la forma y tamaño celular esperados según lo reportado en la literatura (Hernandez-Segura A., y col., 2018).

Siguiendo esta misma línea, en senescencia, según se ha reportado en la literatura, astrocitos generan cambios aberrantes en su estructura mostrando formas alargadas y aplanadas, alteración en la membrana plasmática, acumulación de lisosomas y mitocondrias, y cambios nucleares, lo cual está asociado a cambios en su función (Hernandez-Segura A., y col., 2018). Particularmente, se ha reportado que, en un modelo de astrocitos senescentes, se produce una disminución en los transportadores de glutamato GLT1 y GLAST (Limbad y col., 2020). Adicionalmente se ha reportado que a partir de distintas rutas metabólicas tanto inhibidores de Rho quinasa como análogos de cAMP, aumentan la expresión de transportadores de glutamato GLT1 y GLAST en astrocitos (Schlag, B. D. y col., 1998, Lau, C. L., y col., 2011). Dado que estudios recientes indican que tratamientos con cuerpos cetónicos como BHB, en neuronas, tendrían algunas funciones regulatorias en la activación de la vía de señalización mediada por PKA/cAMP/CREB (Erling, Hu., y col., 2018), lo que podría indirectamente aumentar los niveles de expresión y cambios en la localización de estos transportadores de glutamato en astrocitos. Esto podría ser beneficioso a nivel de senescencia de astrocitos, pudiendo tal vez recuperar los

niveles de expresión y función de los transportadores perdidos en la condición de senescencia.

Adicionalmente, estudios realizados en ratones alimentados con dieta cetogénica cíclica, la cual consiste en una dieta alta en grasas y baja en carbohidratos administrada intercaladamente con dieta control durante 1 año, mostraron a partir de una proteómica realizada en sinaptosomas un aumento en componentes de la vía de señalización mediada por cAMP, tales como la subunidad catalítica de PKA (Acuña D y col. Datos no publicados).

En este contexto es que se aplicaron tratamientos con BHB en astrocitos *in vitro*. Se estableció una estrategia experimental en la línea celular de astrocitos C8D1A y en astrocitos de cultivo primario control (DMSO) y senescentes (DOXO). Las células fueron tratadas con 2 mM, 5 mM y 10 mM por 24hr, que corresponden a concentraciones altas, pero fisiológicas, de BHB asociadas a cetosis (Hashim, S. A y col., 2014). Los tratamientos fueron aplicados en medios sin suero y sin piruvato, con el fin de promover el consumo de cuerpos cetónicos y prevenir posibles interferentes del suero en la medición y detección de los cambios esperados al aplicar los tratamientos. Ensayos con este montaje experimental fueron realizados previamente en el laboratorio, donde se aplicaron tratamientos en neuronas en medio de cultivo sin suero para evidenciar cambios en proteínas activadas por cAMP (Muñoz P., 2014). Por otro lado, con el fin de poder controlar los niveles de glucosa en el medio, y forzar un mayor aprovechamiento y consumo de cuerpos cetónicos, los ensayos fueron realizados en condiciones consideradas de baja glucosa (2,5 mM) respecto a niveles de glucosa normales en sangre (5 mM) (Medlineplus) o bien en condiciones de normoglucosa, pero siempre disminuyendo el nivel de glucosa utilizado comúnmente en cultivos celulares, para simular el contexto fisiológico asociado a cetosis.

Una vez aplicados los tratamientos, con el fin de evaluar los niveles de cAMP intracelular de las muestras, se realizó un ensayo de ELISA competitivo. Los resultados (figura 4) no muestran diferencias en la concentración intracelular de cAMP, por lo que no se pudo obtener resultados concluyentes de este ensayo. Sin embargo, en este caso en particular, es posible que el resultado pueda atribuirse a razones técnicas ya que el kit utilizado estaba fuera del tiempo recomendado por el fabricante para su uso óptimo. Por otro lado, el kit requiere una alta concentración de proteínas, las cuales no fueron alcanzadas de forma óptima en nuestros extractos de cultivos celulares. Para descartar estos problemas técnicos, nuevos ensayos podrían ser realizados con kits fluorométricos, que son más sensibles y requieren cantidades de muestras más acotadas que el método colorimétrico que utilizamos. Cabe recalcar que el número de muestras ensayadas ( $n=2$  réplicas biológicas) estuvo determinado por la cantidad de stock de los reactivos disponibles.

Adicionalmente, se realizó ensayos para evaluar diferencias en los niveles intracelulares de cAMP, mediante el sensor FRET de cAMP basado en EPAC (FRET-EPAC de cuarta generación). Este sensor, a diferencia de otros biosensores basados en FRET, muestra una pérdida en la eficiencia en el FRET al observar una disminución de la razón YFP/CFP (aceptor/donador) cuando aumentan las concentraciones de cAMP. Al analizar mediante ImageJ la razón aceptador/donador obtenido en la línea celular C8D1A tratada con BHB, podemos observar una menor intensidad asociada a un ligero aumento en la concentración aparente de cAMP en la condición 2 mM de BHB, sin embargo, no se observaron diferencias significativas (figura 5). De igual manera no se observaron diferencias con el control positivo dbcAMP. Es posible que dichas diferencias no se hayan observado debido a que se define la estabilidad de dbcAMP en su forma liofilizada, pero en solución puede ser menos estable, lo que está asociado también al tiempo de almacenamiento. En este

caso la alícuota era bastante antigua y podría haber generado problemas. Por otro lado, sería necesario aumentar los tiempos de tratamiento con dbcAMP para evaluar posibles variaciones en rangos de tiempo más extensos como se señala en la literatura (Lau, C. L., y col., 2011). En este caso se realizó ensayos con una réplica biológica ya que correspondía a una prueba de concepto.

Si bien, en un comienzo nos guiamos por este montaje experimental, bajando las concentraciones de glucosa y piruvato para forzar el sistema al consumo de BHB, a medida que fuimos avanzando en la investigación encontramos, en la literatura, estudios que demuestran que la coexistencia de piruvato y BHB en el medio no interfiere en la utilización de uno u otro en el contexto celular (Kolb H y col., 2021). Adicionalmente se han observado efectos de BHB en neuronas hipocampales en condiciones normales de glucosa (Erling Hu y col., 2018). Inclusive, un estudio observo que, en rebanadas de cerebro de ratón tratadas con glucosa, BHB y piruvato, las neuronas utilizaban preferentemente BHB, debido a la gran capacidad de las células cerebrales en realizar beta-oxidación (Valente-Silva y col., 2015). Tomando estos antecedentes en conjunto, se podría plantear una revisión de las condiciones utilizadas en el presente estudio, donde se podrían evidenciarse los roles de BHB como molécula metabólica y de señalización.

De forma similar a lo hecho con la línea celular C8D1A, se exploró cambios en los niveles de cAMP en cultivos primarios de astrocitos sometidos a tratamientos con BHB. En este sentido, ensayos FRET de cAMP en cultivos primarios de astrocitos control (DMSO), mostraron un aumento significativo en la concentración de cAMP en aquellas muestras tratadas con 10 mM de BHB y en las tratadas con *forskolin* (figura 6). Sin embargo, en astrocitos senescentes (DOXO) solo se observa un aumento significativo en la concentración de cAMP en muestras tratadas con *forskolin* (figura 7), indicando que, tal vez, la senescencia celular en astrocitos evita el aumento de

cAMP derivado del tratamiento con cuerpos cetónicos. Entendiendo que, los cuerpos cetónicos asociados a una activación de vías dependientes de cAMP podrían ser beneficiosas en el envejecimiento, la insensibilidad a BHB mostrada por los astrocitos senescentes podría indicar una característica deletérea más en el repertorio de pérdidas de función asociadas a la senescencia celular (Hernández-Segura, A., y col. 2018). Es más, se ha reportado que células senescentes presentan un decaimiento en la vía de señalización cAMP/PKA (Hansen, R. y col., 2013), lo que podría sugerir que la senescencia celular en astrocitos inhibe de alguna forma vías relacionadas con el aumento de cAMP. Sin embargo, se desconoce la vía que podría promover el aumento de cAMP mediado por BHB. Una posibilidad cierta es que el metabolismo de cuerpos cetónicos esté profundamente alterado en células senescentes, ya que este requiere la maquinaria mitocondrial para ser procesado, y las mitocondrias en senescencia se encuentran disfuncionales, incluyendo pérdida del potencial de membrana y aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno (Miwa, S., 2022). Sumado a esto en senescencia se ve una pérdida en la proteostasis celular lo que podría estar afectando también en la insensibilidad ante el consumo de cuerpos cetónicos como el BHB en células senescentes.

Una debilidad del presente estudio es no haber podido ensayar todas las variables en términos de tiempo de administración y concentraciones de BHB, glucosa, piruvato, suero y otros componentes que puedan participar del metabolismo y acción de los cuerpos cetónicos. Así, algunas de las diferencias acá reportadas podrían acentuarse, por ejemplo, modificando los tiempos de tratamiento con BHB, ya que se han reportado cambios en diversos procesos, como un aumento en la expresión de BDNF, lo cual se relaciona con una activación en la vía de PKA/CREB tras la aplicación de BHB en neuronas hipocámpales de rata durante tiempos muy acotados de 30min a 1hr (Erling Hu y col., 2018). A su vez, se observó que tratamientos con

BHB, en neuronas de rata, durante tiempos más extensos de 48hrs, se asocian a aumentos en la regulación de la autofagia/mitofagia y el control de calidad mitocondrial (Gómora-García JC y col., 2023). Apoyando esta idea, observamos que, en algunos ensayos, la cantidad de cuerpos cetónicos consumidos en 24 horas de tratamiento fue escasa (anexo figura 1), indicando tal vez que se requieren mayores tiempos para producir cambios en el metabolismo de las células. De todas maneras, es importante tener en consideración que al ser cAMP un segundo mensajero es bastante probable que este metabolito este altamente regulado en la célula y variaciones en sus niveles intracelulares sean difíciles de pesquisar. Por último, el uso de técnicas de medición más sensibles como cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) podría ayudar a mejorar la detección de cAMP y medir con mayor precisión su cantidad y cambios en las distintas condiciones.

Con el fin de evaluar cambios río abajo de la producción de cAMP en astrocitos controles y senescentes tratados con BHB y se realizaron ensayos con un sensor de la actividad de PKA (FRET-AKAR4), por ser una quinasa directamente activada por cAMP. Se realizaron ensayos para medir la actividad de PKA en muestras de la línea celular C8D1A tratadas con BHB, sin observar diferencias concluyentes en la actividad de PKA (figura 8). Adicionalmente, se realizó ensayos en astrocitos primarios control (DMSO) y senescentes (DOXO), donde en ambos casos se vio un aumento no significativo de la actividad de PKA en células tratadas con BHB en relación con el control (figura 9 y 10). A pesar de que no se observan diferencias significativas en los resultados, se nota una tendencia a aumentar la actividad de PKA en condiciones más altas de BHB como 10 mM de BHB, la cual es una concentración alta pero fisiológica de BHB en cetosis. Tal como se mencionó anteriormente es posible que no se hayan observado diferencias significativas en las otras condiciones debido al tiempo de aplicación de los tratamientos, que en este

caso fue de 24hr y hay reportes que indican cambios en tiempos muy acotados o más extensos (Erling Hu y col., 2018; Gómora-García, JC y col.,2023).

Con el fin de evidenciar posibles consecuencias funcionales de los tratamientos, se realizaron ensayos de WB para evaluar la expresión diferencial de GLT1 y GLAST en astrocitos tratados con BHB. En un primer acercamiento se realizaron pruebas de los anticuerpos en distintas muestras de astrocitos primarios control (DMSO) y senescentes (DOXO), y en muestras de tejido de hipocampo y cerebelo, con el fin de estandarizar el uso de los anticuerpos (figura anexa 5 y 6). Luego se realizó un inmunomarcaje contra estos transportadores en líneas celulares C8D1A. En el caso de GLT1 la migración esperada corresponde a 64 kDA, que corresponde a la forma no glicosilada de la proteína. Se observó una marca difusa en 70kDa que podría corresponder a la proteína de interés, ya que según se indica en la hoja de datos del anticuerpo este podría marcar entre 55-70kDa. Adicionalmente, se observó una marca en 130kDa que correspondería a la forma glicosilada de la proteína (figura 11). En el caso de GLAST la migración esperada corresponde a 60 kDA, y se observó una marca en aproximadamente los 70kDa, que correspondería a la proteína de interés. Además de observarse una marca en 130kDa que corresponde a la forma glicosilada de la proteína (figura 11). Sin embargo, no se observan diferencias en la expresión de las proteínas tras los tratamientos ni tampoco se observa claramente la expresión de los transportadores, lo cual es probable que sea ya que como ha reportado en la literatura astrocitos en cultivo, y más líneas en celulares, los astrocitos son más bien inmaduros y ven disminuida la expresión marcadores propios como los transportadores de glutamato GLT1 y GLAST (Villablanca C., 2023). Una forma de aumentar la expresión *in vitro* de estos transportadores es haciendo tratamientos con moduladores de RhoA/ROCK o activadores de vías dependientes de cAMP, lo cual podría ser considerado en futuros ensayos, teniendo en cuenta eso sí que los

cambios perseguidos tras tratamientos con BHB podrían verse enmascarados por el uso de otras drogas.

A pesar de la baja expresión de GLT1 y GLAST detectada por WB en nuestros modelos celulares, se realizaron ensayos de IF con el fin de observar cambios en la localización de los transportadores, apelando a la mayor sensibilidad conferida por la microscopía de fluorescencia. Con el fin de determinar cambios en la distribución de los transportadores, entre el citoplasma y la membrana plasmática, se utilizó condiciones con permeabilización y sin permeabilización (Cheng y col., 2019). Así, en el caso de condiciones sin permeabilización se esperaría ver el transportador distribuido principalmente en la membrana, de manera superficial, y en el caso con permeabilización se esperaría ver el transportador distribuido de manera más homogénea en la célula.

Siguiendo lo anterior, cultivos primarios de astrocitos control (DMSO) la señal de GLT1 en la condición sin permeabilización no muestra variaciones significativas tras aplicarse tratamientos con BHB o *forskolin* (figura 12), a diferencia de lo que se observa con permeabilización donde se ve un pequeño aumento en la detección de la señal en muestras tratadas con BHB y un aumento significativo en aquellas tratadas con *forskolin* (figura 12). Esto quiere decir que la distribución de GLT1 hacia la membrana plasmática no pareciera verse afectada por los tratamientos utilizados. Sin embargo, en astrocitos senescentes (DOXO) no se observa dicho aumento, es mas en condiciones sin permeabilización se observa una disminución y en condiciones con permeabilización no se ven mayores diferencias (figura 13). Esto podría indicar que tal como se mencionó anteriormente células senescentes inhiben de alguna forma vías relacionadas con el aumento de cAMP que deberían promover el aumento de los transportadores de glutamato GLT1 y GLAST.

En el caso de GLAST cultivos primarios de astrocitos primarios control (DMSO) muestran un leve aumento en muestras tratadas con BHB en condiciones sin permeabilización, sin mostrar diferencias en la condición con permeabilización (figura 14). Por otra parte, en condiciones senescentes (DOXO) la señal de GLAST en la condición sin permeabilización muestra un aumento significativo del transportador en muestras tratadas con BHB mientras que en condiciones con permeabilización no se observan mayores diferencias (figura 15), pudiendo indicar que al aplicar tratamientos con BHB se produce un cambio en la localización del transportador hacia la membrana, sin cambiar la expresión total de GLAST.

Estos resultados muestran una detección diferencial de los transportadores según la condición control o senescente, y dependiendo del transportador GLUT1 o GLAST. Esto puede tener que ver con los diferentes patrones de expresión de los transportadores en el contexto cerebral (Danbolt, N. C., 2001). Uno de los problemas de nuestra estrategia, fue que la observación de las inmunofluorescencias sin permeabilización no vimos una localización preferentemente de membrana. Esto puede deberse a distintos problemas técnicos, tales como (i) una sobre fijación de lípidos, que podría haber dado paso a la formación de poros por los cuales entrasen los anticuerpos, aún sin haber sido permeabilizadas las células; o (ii) un ruido por tinción inespecífica de los anticuerpos utilizados; u (iii) otro problema fuera de nuestro conocimiento. Futuros controles, tales como uso de fijador menos concentrado o tinción de otras células distintas de astrocitos, como control negativo, podrían ayudar a dilucidar defectos en la metodología. De todas formas, cambios significativos en la condición con permeabilización indican que, independientemente de la localización de los transportadores, estos pueden cambiar su expresión en tratamientos con BHB o *forskolin*.

Finalmente, a partir de IF obtenidas desde astrocitos primarios, se realizó un análisis de los fenotipos control (DMSO) y senescente (DOXO) tratados con BHB. Se utilizaron descriptores de forma para evaluar cambios morfológicos asociados a los tratamientos aplicados. En caso de astrocitos control no se observaron cambios significativos relacionados con el tamaño o el perímetro celular, pero sí en la solidez de células tratadas con *forskolin*. Esto podría indicar procesos de estelación, generando proyecciones celulares más intrincadas y complejas, que se verían reflejadas en una disminución de parámetros como la circularidad o la solidez, los cuales dan cuenta de la irregularidad de la célula. Esta observación, sin embargo, no fue acompañado de un aumento en el perímetro, como se hubiese esperado al haber más ramificaciones o proyecciones celulares, lo que podría tener relación con una tendencia a disminuir el área celular, que no resultó ser significativa en la población de células analizadas. Tomando en consideración lo anteriormente expuesto, los astrocitos controles tratados con *forskolin* tendrían una mayor complejidad, tendiente a la estelación, y probablemente un menor tamaño, lo que explicaría el nulo cambio en el perímetro. Por otra parte, creemos que la ausencia de cambios en astrocitos tratados con BHB podría deberse a que (i) el BHB no logra generar los cambios fenotípicos relacionados con el aumento de cAMP o (ii) los tiempos de tratamiento (24hrs) son muy acotados para producir los cambios morfológicos esperados. Cabe destacar que se ha reportado la presencia de cambios morfológicos en astrocitos primarios usando dbcAMP después de 3-6 días (Brozzi F y col. 2009), sugiriendo que los tiempos de tratamiento usados en este trabajo podrían ser subóptimos para la observación de cambios morfológicos.

Adicionalmente, se observó que en astrocitos senescentes (DOXO) se ve un aumento significativo en el perímetro celular acompañado de una disminución en la circularidad en los tratamientos con *forskolin* (figura 17). Esta disminución en la

circularidad, sin embargo, resultó ser menos significativa que en la condición control, lo que podría dar cuenta de una pérdida de función con respecto al proceso de estelación gatillado por cAMP. Dicha observación podría también relacionarse con el aumento de tamaño de las células senescentes, el cual tienen una tendencia a aumentar aún más después de tratamientos con *forskolin*, lo cual puede observarse por una tendencia en el aumento del área y el perímetro (figura 17 A y B). Así, astrocitos controles tenderían a un fenotipo morfológico más pequeño e irregular (estrellado), mientras que los astrocitos senescentes tendrían pérdida de irregularidad y ganancia de tamaño tras ser tratados con el inductor de las vías dependientes de cAMP *forskolin*. Consecuencias funcionales de este crecimiento diferencial de proyecciones celulares debe ser determinado en el futuro.

Cabe recalcar que ensayos realizados con cultivos primarios de astrocitos fueron realizados con un n=2 réplicas biológicas, ya que, durante el desarrollo del presente seminario de título, se tuvo problemas con la obtención de animales para realizar los cultivos, por lo que posteriormente se siguió realizando pruebas de concepto con la línea celular C8D1A. Dicha línea celular, al igual que la mayoría de las líneas celulares, son inmortalizadas mediante modificaciones genéticas que inhiben puntos de control del ciclo celular, por lo que no es recomendado su uso en estudios de senescencia. Sin embargo, sí pudieron ser usadas para evaluar cambios generales, no relacionados con la senescencia, pero sí asociados a los tratamientos previamente indicados.

## CONCLUSIONES

Observamos, mediante FRET, un aumento del cAMP intracelular de astrocitos controles tratados con BHB, lo cual fue inhibido en astrocitos senescentes. Dicho aumento no fue posible vincularlo con cambios en la actividad de PKA, lo que podría deberse al tiempo de aplicación de los tratamientos. Así, una conclusión general del presente trabajo es que se requiere realizar curvas de tiempo y concentraciones de BHB más amplias para identificar cambios que puedan haberse visto atenuados por la ventana única de tiempo (24hrs) utilizada por nosotros. Sin embargo, dado que cAMP se considera un metabolito con efectos beneficiosos para las células y los organismos envejecidos, existe la posibilidad de que la diferencia en los resultados obtenidos entre astrocitos control y senescentes se deba a que en estos últimos el efecto positivo esperado de los cuerpos cetónicos como BHB se ve inhibido por cambios metabólicos propios de la senescencia.

Por otro lado, contra intuitivamente a lo esperado, los resultados sugieren cambios diferenciales en el aumento de los transportadores de glutamato tras ser tratados con BHB, mostrando un aumento significativo únicamente en el caso de GLAST en inmunofluorescencias sin permeabilización de astrocitos senescentes. Dado que no observamos cambios de cAMP en astrocitos senescentes tratados con BHB, las diferencias en GLAST bien podrían deberse a otro mecanismo de señalización de BHB diferente de cAMP, o bien una pérdida del evento de aumento de cAMP que podría estar ocurriendo en tiempos más acotados.

Finalmente, es importante considerar que el estudio del efecto de cuerpos cetónicos a nivel molecular y celular es un campo de investigación incipiente. Por ese motivo, no existen directrices ampliamente validadas para el uso de cuerpos cetónicos en tratamientos *in vitro*. Así, la presente investigación puede ser tomada como un

insumo más para establecer nuevas condiciones experimentales respecto del uso de cuerpos cetónicos como el BHB. Del mismo modo, en el contexto de terapias antienviejimiento, futuros estudios respecto de BHB podrían validar el uso de cuerpos cetónicos en declives fisiológicos asociados al envejecimiento como la senescencia o bien el desbalance en la homeostasis glutamatérgica asociada a diferentes enfermedades neurodegenerativas (Andersen, J. V., 2021).

## BIBLIOGRAFIA

1. Andersen, J. V., Markussen, K. H., Jakobsen, E., Schousboe, A., Waagepetersen, H. S., Rosenberg, P. A., & Aldana, B. I. (2021). Glutamate metabolism and recycling at the excitatory synapse in health and neurodegeneration. *Neuropharmacology*, 196, 108719.
2. Bellaver, B., Souza, D. G., Souza, D. O., & Quincozes-Santos, A. (2017). Hippocampal Astrocyte Cultures from Adult and Aged Rats Reproduce Changes in Glial Functionality Observed in the Aging Brain. *Molecular neurobiology*, 54(4), 2969–2985.
3. Brozzi, F., Arcuri, C., Giambanco, I., & Donato, R. (2009). S100B Protein Regulates Astrocyte Shape and Migration via Interaction with Src Kinase: IMPLICATIONS FOR ASTROCYTE DEVELOPMENT, ACTIVATION, AND TUMOR GROWTH. *The Journal of biological chemistry*, 284(13), 8797–8811.
4. Bussian, T.J., et al., Clearance of senescent glial cells prevents tau-dependent pathology and cognitive decline. *Nature*, 2018. 562(7728): p. 578-582.
5. Cheng, R., Zhang, F., Li, M., Wo, X., Su, Y. W., & Wang, W. (2019). Influence of Fixation and Permeabilization on the Mass Density of Single Cells: A Surface Plasmon Resonance Imaging Study. *Frontiers in chemistry*, 7, 588.
6. Cohen, J., & Torres, C. (2019). Astrocyte senescence: Evidence and significance. *Aging cell*, 18(3), e12937.
7. Danbolt, N.C., Storm-Mathisen, J., Kanner, B.I., 1992. An [Na+K+] coupled L-glutamate transporter purified from rat brain is located in glial cell processes. *Neuroscience* 51, 295–310.
8. Danbolt, N. C. (2001). "Glutamate uptake." *Prog Neurobiol* 65(1): 1-105.
9. DiPilato, L. M., Cheng, X., & Zhang, J. (2004). Fluorescent indicators of cAMP and Epac activation reveal differential dynamics of cAMP signaling within discrete subcellular compartments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(47), 16513–16518.
10. Erling Hu, Huan Du, Xinliang Zhu, Leilei Wang, Sen Shang, Xingjuan Wu, Haixia Lu, Xiaoyun Lu. (2018) Beta-hydroxybutyrate Promotes the Expression of BDNF in Hippocampal Neurons under Adequate Glucose Supply, *Neuroscience*, Volume 386. Pages 315-325.
11. Gómora-García JC, Montiel T, Hüttenrauch M, Salcido-Gómez A, García-Velázquez L, Ramiro-Cortés Y, Gomora JC, Castro-Obregón S, Massieu L. (2023). Effect of the Ketone Body, D-β-Hydroxybutyrate, on Sirtuin2-Mediated Regulation of Mitochondrial Quality Control and the Autophagy–Lysosomal Pathway. *Cells*. 2023; 12(3):486.
12. Hashim, S. A., & VanItallie, T. B. (2014). Ketone body therapy: from the ketogenic diet to the oral administration of ketone ester. *Journal of lipid research*, 55(9), 1818–1826.

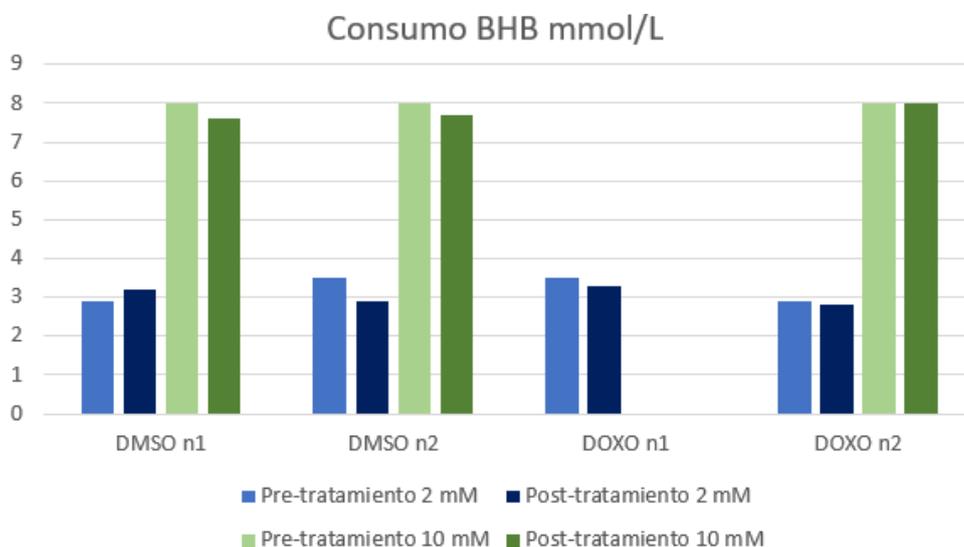
13. Haugeto, Ø., Ullensvang, K., Levy, L.M., Chaudhry, F.A., Honore', T., Nielsen, M., Lehre, K.P., Danbolt, N.C., 1996. Brain glutamate transporter proteins form homomultimers. *J. Biol. Chem.* 271, 27715–27722.
14. Hernandez-Segura, A., Nehme, J., & Demaria, M. (2018). Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends in cell biology*, 28(6), 436–453.
15. Hnasko, T. S., & Hnasko, R. M. (2015). The Western Blot. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1318, 87–96.
16. Im, K., Mareninov, S., Diaz, M., & Yong, W. H. (2019). An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1897, 299–311.
17. James E. Goldman, Fung-Chow Chiu. (1884) Dibutyryl cyclic AMP causes intermediate filament accumulation and actin reorganization in astrocytes, *Brain Research*, Volume 306, Issues 1–2, 85-95.
18. Jensen, N. J., Wodschow, H. Z., Nilsson, M., & Rungby, J. (2020). Effects of Ketone Bodies on Brain Metabolism and Function in Neurodegenerative Diseases. *International journal of molecular sciences*, 21(22), 8767.
19. Kandel, E. R., Schwartz, J. H., & Jessell, T. M. (2013). *Principles of neural science* (5th ed.). McGraw-Hill.
20. Kolb, H., Kempf, K., Röhling, M., Lenzen-Schulte, M., Schloot, N. C., & Martin, S. (2021). Ketone bodies: from enemy to friend and guardian angel. *BMC medicine*, 19(1), 313.
21. Lalo, U., Koh, W., Lee, C. J., & Pankratov, Y. (2021). The tripartite glutamatergic synapse. *Neuropharmacology*, 199, 108758.
22. Lau, C. L., O'Shea, R. D., Broberg, B. V., Bischof, L., & Beart, P. M. (2011). The Rho kinase inhibitor Fasudil up-regulates astrocytic glutamate transport subsequent to actin remodelling in murine cultured astrocytes. *British journal of pharmacology*, 163(3), 533–545.
23. Limbad, C., Oron, T. R., Alimirah, F., Davalos, A. R., Tracy, T. E., Gan, L., Desprez, P. Y., & Campisi, J. (2020). Astrocyte senescence promotes glutamate toxicity in cortical neurons. *PloS one*, 15(1), e0227887.
24. Maalouf, M., Rho, J. M., & Mattson, M. P. (2009). The neuroprotective properties of calorie restriction, the ketogenic diet, and ketone bodies. *Brain research reviews*, 59(2), 293–315.
25. Matias, I., Diniz, L. P., Damico, I. V., Araujo, A. P. B., Neves, L. D. S., Vargas, G., Leite, R. E. P., Suemoto, C. K., Nitrini, R., Jacob-Filho, W., Grinberg, L. T., Hol, E. M., Middeldorp, J., & Gomes, F. C. A. (2021). Loss of lamin-B1 and defective nuclear morphology are hallmarks of astrocyte senescence in vitro and in the aging human hippocampus. *Aging Cell*, 21(1).

26. Newman, J. C., Covarrubias, A. J., Zhao, M., Yu, X., Gut, P., Ng, C. P., Huang, Y., Haldar, S., & Verdin, E. (2017). Ketogenic Diet Reduces Midlife Mortality and Improves Memory in Aging Mice. *Cell metabolism*, 26(3), 547–557.e8.
27. Newman, J. C., & Verdin, E. (2017).  $\beta$ -Hydroxybutyrate: A Signaling Metabolite. *Annual review of nutrition*, 37, 51–76.
28. Muñoz, P. (2014). Role of EPAC in axon determination.
29. Popoli, M., Yan, Z., McEwen, B. S., & Sanacora, G. (2011). The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. *Nature reviews. Neuroscience*, 13(1), 22–37.
30. Roberts, M. N., Wallace, M. A., Tomilov, A. A., Zhou, Z., Marcotte, G. R., Tran, D., Perez, G., Gutierrez-Casado, E., Koike, S., Knotts, T. A., Imai, D. M., Griffey, S. M., Kim, K., Hagopian, K., McMackin, M. Z., Haj, F. G., Baar, K., Cortopassi, G. A., Ramsey, J. J., & Lopez-Dominguez, J. A. (2017). A Ketogenic Diet Extends Longevity and Healthspan in Adult Mice. *Cell metabolism*, 26(3), 539–546.e5.
31. Samoilova, M., Weisspapir, M., Abdelmalik, P., Velumian, A. A., & Carlen, P. L. (2010). Chronic in vitro ketosis is neuroprotective but not anti-convulsant. *Journal of neurochemistry*, 113(4), 826–835.
32. Miwa, S., Kashyap, S., Chini, E., & von Zglinicki, T. (2022). Mitochondrial dysfunction in cell senescence and aging. *The Journal of clinical investigation*, 132(13), e158447.
33. Schildge, S., Bohrer, C., Beck, K., & Schachtrup, C. (2013). Isolation and culture of mouse cortical astrocytes. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (71), 50079.
34. Schlag, B. D., Vondrasek, J. R., Munir, M., Kalandadze, A., Zeleniaia, O. A., Rothstein, J. D., & Robinson, M. B. (1998). Regulation of the glial Na<sup>+</sup>-dependent glutamate transporters by cyclic AMP analogs and neurons. *Molecular pharmacology*, 53(3), 355–369.
35. Valente-Silva, P., Lemos, C., Köfalvi, A., Cunha, R. A., & Jones, J. R. (2015). Ketone bodies effectively compete with glucose for neuronal acetyl-CoA generation in rat hippocampal slices. *NMR in Biomedicine*, 28(9), 1111-1116.
36. Vigelsø, A., Dybboe, R., Hansen, C. N., Dela, F., Helge, J. W., & Guadalupe Grau, A. (2015). GAPDH and  $\beta$ -actin protein decreases with aging, making Stain-Free technology a superior loading control in Western blotting of human skeletal muscle. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 118(3), 386–394.
37. Villablanca, C., Vidal, R., Gonzalez-Billault, C., Are cytoskeleton changes observed in astrocytes functionally linked to aging?, *Brain Research Bulletin*, Volume 196, 2023, p. 59-67.
38. Volterra, A., Meldolesi, J. 2005. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci* 6, 626–640

## ANEXO

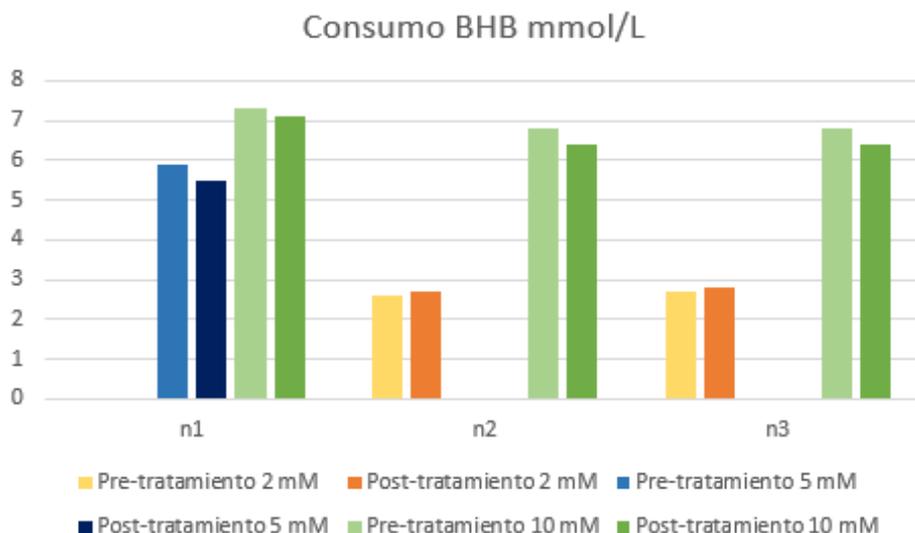
### Los cultivos celulares muestran una disminución de cuerpos cetónicos en el medio.

Muestras de medio con baja glucosa y tratados con BHB fueron utilizados para medir la cantidad de cuerpos cetónicos en el medio para evaluar la cantidad y el consumo de estos por parte de los astrocitos, tanto en línea celular de astrocitos C8D1A como en cultivos primarios de astrocitos. Tras medir las muestras con el kit Optium Neo, se observó que en líneas celulares se presenta una tendencia a aumentar el consumo de cuerpos cetónicos por parte de los astrocitos en la condición 10 mM de BHB en comparación a las otras condiciones, por ende, se ve una disminución de cuerpos cetónicos en el medio. En el caso de la condición 2 mM de BHB no se observa un mayor consumo en comparación a las otras condiciones si no que se observa un leve aumento de cuerpos cetónicos en el medio.



### Anexo 1. Consumo de BHB del medio en cultivo primario de astrocitos murinos.

Los valores fueron obtenidos a partir de muestras del medio de cultivos de astrocitos primarios control (DMSO) y senescentes (DOXO), tratados con concentraciones de 2 mM y 10 mM de BHB. Se observa una mayor disminución de cuerpos cetónicos en el medio, en la condición DMSO en comparación a la condición DOXO. La concentración máxima registrada por el equipo corresponde a 8 mmol/L de BHB.



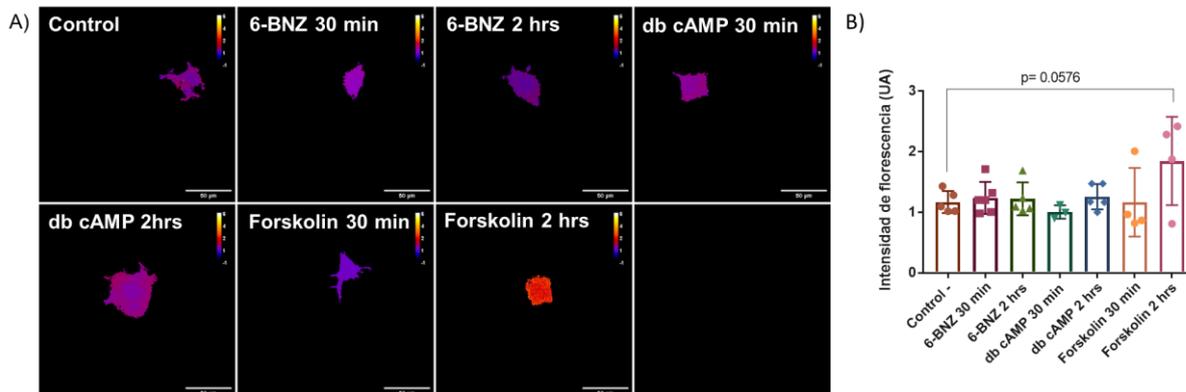
#### Anexo 2. Consumo de BHB del medio en cultivo de línea celular derivada de astrocitos C8D1A.

Los valores fueron obtenidos a partir de muestras del medio de cultivos de líneas celulares de astrocitos C8D1A, tratados con concentraciones de 2 mM, 5 mM y 10 mM de BHB. Se observa una mayor disminución en la condición 5 mM y 10 mM de BHB en comparación a las otras condiciones, mientras que se observa un leve aumento en la condición 2 mM. La concentración máxima registrada por el equipo corresponde a 8 mmol/L de BHB.

#### Las pruebas de eficiencia del sensor FRET AKAR4 indican cambios al utilizar distintos compuestos en distintas condiciones.

Se utilizó distintos análogos y activadores de cAMP, a tiempos de 30min y 2hr para evaluar la eficiencia del sensor FRET de PKA AKAR4 (FRET-AKAR4). Se utilizó 6-BZN, un análogo de cAMP activador selectivo de PKA, db cAMP activador análogo estable de cAMP, no hidrolizable por fosfodiesterasas, y *forskolin* un activador de adenilato ciclasa, que aumenta los niveles intracelulares de cAMP además de afectar las corrientes de calcio e inhibir la actividad de MAP quinasa.

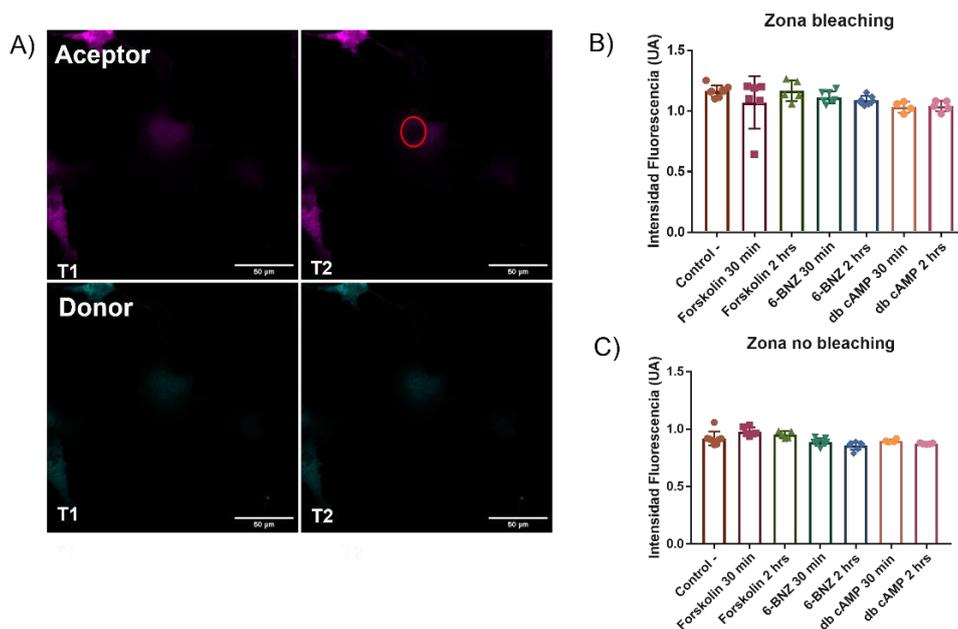
Luego de analizar la eficiencia del sensor con los distintos activadores en línea celular COS7, se observa una mayor actividad de PKA con *forskolin*, indicando un aumento significativo en relación con el control.



Anexo 3. Imágenes de microscopía confocal de sensor FRET-AKAR4 muestra un aumento significativo en la actividad de PKA en línea celular COS7 tratada con *forskolin*. (A) Se visualiza a través de un mapa térmico cambios en la actividad de PKA con distintos activadores de PKA y de la vía cAMP. Observando una coloración azul en aquellas muestras con menor actividad y una coloración más bien rojiza en aquellas condiciones con mayor actividad. Adicionalmente en (B) el gráfico se muestra de manera cuantitativa las variaciones en la intensidad de fluorescencia observando una mayor intensidad de fluorescencia asociada con un aumento en la actividad de PKA en entre las distintas condiciones, observando un aumento significativo con *forskolin* en relación con el control a partir de un análisis One-way ANOVA ( $p < 0,05$ ). Scale bar: 50  $\mu\text{m}$ .

**La estrategia de bleaching no muestra diferencias significativas al utilizar distintos compuestos a distintos tiempos.**

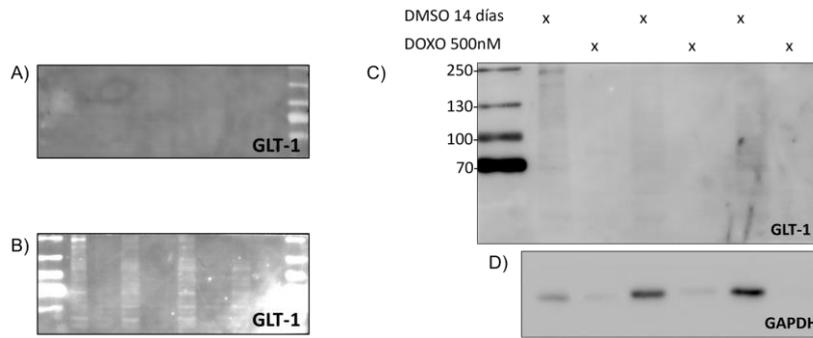
Se utilizó distintos análogos y activadores de cAMP, a tiempos de 30min y 2hr para evaluar la eficiencia del sensor FRET AKAR4, como se mencionó anteriormente. Se blicheo el aceptor del par FRET (CFP-YFP), esperando un aumento en la intensidad de fluorescencia del donador.



Anexo 4. Imágenes bleaching sensor FRET AKAR4 en línea celular COS7 no muestra diferencias significativas con los diferentes tratamientos. (A) Se visualiza en coloración magenta, YFP el aceptor del par FRET, indicando en T1 el aceptor pre-bleaching y en T2 el aceptor una vez blicheado. En color cyan se visualiza CFP, el donador del par FRET, indicando en T1 el pre-bleaching del aceptor y en T2 una vez realizado el bleaching. No se observan un aumento en la señal del donador cuando se blichea el aceptor. En (B) podemos observar la intensidad de fluorescencia medida en el donador, en un ROI seleccionado para el bleaching mientras que en (C) se observa la intensidad de fluorescencia en un ROI donde no se realizó bleaching, sin notar diferencias significativas al comparar estas mediciones a partir de un Análisis con One-way ANOVA ( $p < 0.05$ ). Scale bar: 50  $\mu\text{m}$ .

**En astrocitos de cultivos primarios un aumento en la dilución del anticuerpo GLT1 mejora el marcaje.**

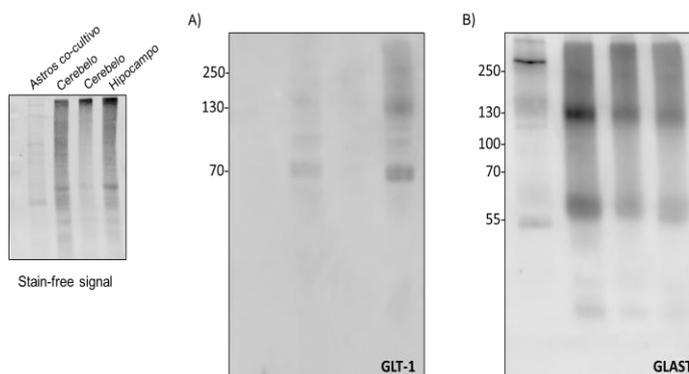
En muestras de distintos extractos de proteínas totales de cultivos de astrocitos control (DMSO) y senescentes (DOXO), se probaron diferentes diluciones del anticuerpo contra el transportador GLT1 para optimizar el uso de este mismo.



**Anexo 5. Membrana revelada para pruebas de anticuerpo contra transportador GLT1 en muestras de cultivos primarios de astrocitos control (DMSO) y senescentes (DOXO).** En (A) se utilizaron distintas muestras de astrocitos primarios, se bloqueó con TBS-T-Leche 5% por 1hr y luego se incubó el anticuerpo GLT-1 por 1hr en una dilución de 1:1000, obteniendo resultados bastante sucios. Con el fin de optimizar el uso del anticuerpo en (B) se bloqueó con TBS-T-BSA 5% por 1hr y luego se incubó el anticuerpo GLT-1 por 1hr en una dilución de 1:2500, obteniendo mejores resultados. En (C) se bloqueó con TBS-T-BSA 5% O.N y luego se incubó el anticuerpo GLT-1 por 1hr en una dilución de 1:2500 con lo que se estandarizo el protocolo.

**En extractos de cerebro bloquear con TBS-T-BSA 5% O.N mejora el marcaje del anticuerpo GLT1 y GLAST.**

En muestras de extractos de proteínas totales de cerebro y co-cultivo primario de astrocitos se probaron diferentes formas de bloquear la membrana con el fin de optimizar el uso de los anticuerpos contra los transportadores GLT1 y GLAST.



**Anexo Figura 6. Membrana revelada de Western-blot para marcadores de transportadores GLT1 y GLAST en extractos de proteínas totales de cerebro y**

**co-cultivo de astrocitos primarios.** Se bloqueó durante la noche con BSA y luego se utilizaron los anticuerpos en una dilución de 1:2500 para GLT1 y de 1:500 para GLAST. Se observa una clara expresión de ambos transportadores en sus distintas conformaciones post cambios traduccionales (forma glicosilada).