



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR



TESIS DOCTORAL
REGULACIÓN DE LA CAPTACIÓN DE GLUCOSA EN
ASTROCITOS POR EL EJE INSULINA / IGF-I

EDWIN HERNÁNDEZ GARZÓN

MADRID, 2014



**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**



TESIS DOCTORAL

**REGULACIÓN DE LA CAPTACIÓN DE GLUCOSA EN ASTROCITOS
POR EL EJE INSULINA / IGF-I**

Memoria de tesis para optar al grado de doctor presentada por
el licenciado en Biología
Edwin Hernández Garzón

Director de la tesis
Ignacio Torres Alemán
Profesor de Investigación de CSIC en el Instituto Cajal-CSIC,
miembro del Ciberneted

Lugar de realización
**Laboratorio de neuroendocrinología del departamento de
neurobiología funcional y de sistemas del Instituto Cajal – CSIC**



El Dr. IGNACIO TORRES ALEMÁN, profesor de investigación del CSIC, certifica que la memoria presentada por EDWIN HERNÁNDEZ GARZÓN para optar al grado de Doctor en ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid ha sido realizada bajo su dirección en el laboratorio de Neuroendocrinología del Instituto Cajal - CSIC.

Madrid, Octubre de 2014

A mis padres

Agradecimientos

“La gratitud es una vacuna, antitoxina y un antiséptico”

John Henry Jowett

Realizar esta tesis ha sido una experiencia más que enriquecedora, las cosas que he vivido durante este tiempo, las personas que he encontrado, el aprendizaje, las decepciones, las alegrías y otro sin fin de acontecimientos y emociones han hecho de estos años un viaje inolvidable y enriquecedor. Sin embargo, esta tesis no habría podido ser lo que es sin todas las personas que me han acompañado en esta travesía, así que aprovecharé estas palabras para agradecerles la huella que han dejado en mí.

Primero, quisiera agradecer a mi director de tesis, Ignacio, la oportunidad que me diste en tu laboratorio marcará el resto de mi quehacer como profesional. Las oportunidades que me has dado para crecer como científico, siempre motivándome a encontrar una solución, una respuesta, han dejado una honda huella en mí. Gracias por compartir tu conocimiento y sabiduría conmigo, por las discusiones en el despacho, por darme alas para realizar experimentos preciosos, pero también por saber decirme no. No exagero cuando digo que has forjado mi carácter como científico y parte como persona.

A la gente del labo, Ana, Laura, Ángel, Andrea del Perpetuo y Víctor, chicos, este trabajo tiene un trocito de vosotros, bueno, mucho. Sin vuestras discusiones, ayuda y colaboración esto no hubiese sido lo mismo, lo distintos que sois, la manera de enfocar las cosas y vuestra pasión por cada cosas que hacéis solo ha aportado cosas buenas en mí. Sin ustedes esto no hubiese sido lo mismo. A Miguel, Manuel y Lola, no tengo palabras para agradeceros todo lo que me habéis ayudado, tanto en el trabajo como en lo personal, sois personas maravillosas, vuestro soporte ha sido esencial. Todos vosotros habéis dado alegría a mi corazón.

A los colaboradores que han participado en este trabajo cuyo aporte es invaluable, pero sobre todo a Eduardo y Alberto, que dejaron de lado días enteros para ayudarme y sacar experimentos tan espectaculares.

A las vecinitas, Irene, Patri y Lula, y a las Vicarias, Eva, Eva y Çağla gracias por vuestras sonrisas, vuestras ganas de compartir y vuestro ánimo e ímpetu. Sois todo un ejemplo.

Al equipo del Cajal, porque con cerveza y fútbol la vida es mejor.

A la gente de todos y cada uno de los servicios del Cajal, pero en especial a Noelia, Carmen, Belén y Silvia, siempre me habéis aguantado y nunca teníais un no como respuesta, gracias por toda la ayuda.

Al Instituto Cajal en general, por haber creado un espacio para la ciencia y la investigación con tan poco. Ha sido enriquecedor trabajar aquí y siempre recordare este sitio como mi casa.

A la gente del CBM, gracias por el apoyo, la alegría por escucharme y apoyarme y por vuestros consejos, gracias de corazón.

A Manu, por tu fortaleza y alegría, por tu amistad y compañía, eres un ejemplo y me honra ser tu amigo.

A Teresa, Dani, Francesca, mil gracias por los buenos momentos y la amistad, de esas que son invaluable.

A los master amigos. Vadir, JuanMa, Antonio, Jorge, Carlos, Manu, Patri y Laura, gracias por los buenos momentos, por el apoyo y el cariño, por ayudarme a adaptarme a Madrid cuando no me entendía nadie. Sois espectaculares, Os quiero un montón.

A Elio y Ema, mi nueva familia, gracias por acogerme recibirme y quererme tanto es un honor el que me hayáis recibido de esta forma. Igual, a la familia francesa, vuestro corazón no parece tener tamaño, es gigante, no sé cómo pagaros tanto cariño.

A mi familia en Colombia, por apoyarme y quererme desde la distancia, lograbais que sintiese el calor de mi casa estando lejos. Sois parte de mí.

A mis padres, porque me lo han dado todo, vuestro esfuerzo, tenacidad, valor y ganas es lo que soy. No sabéis lo afortunado que me siento por teneros. Me habéis forjado como persona. No se cómo pagaros todo lo que me habéis dado. Os amo.

A ti Elise, por ser mi otra parte, mi equilibrio. Me rescataste en un momento donde no sabía siquiera que existía un norte. Me has devuelto la alegría, la vida y has dado una razón a todo. Estar cada día a tu lado es la experiencia más increíble de mi vida y me habéis embarcado en la aventura más maravillosa. Te amo.

Y a la vida por ser maravillosa.

Resumen

La captura de glucosa cerebral ha sido objeto de estudio desde que se propuso a la glucosa como la principal fuente energética de las células neurales. Alteraciones en la captura de glucosa se encuentran asociadas a varias patologías neurológicas como la enfermedad de Alzheimer, Parkinson o epilepsia. El papel del eje Insulina/IGF-I, que regula la captura de glucosa periférica, no ha sido tenido en cuenta en la captura de glucosa cerebral, debido a la falta de evidencia en la participación de esta vía de señalización en la homeostasis de glucosa cerebral. En el presente trabajo se presenta evidencia del papel del eje Insulina/IGF-I en la captación de glucosa por parte de los astrocitos, determinada a través del análisis por citometría de flujo del consumo de un análogo fluorescente de la glucosa, el 6-NBDG. Además, a través del análisis de astrocitos donde se ha reducido la expresión del receptor de Insulina y de IGF-I usando ARNhc, se muestra que ambos receptores son esenciales para mantener la correcta captura de glucosa. Experimento *In Vivo* con microscopía confocal y 6-NBDG así como con tomografía por emisión de positrones en ratones donde se ha alterado la expresión de los receptores de Insulina o de IGF-I confirman la importancia de este sistema en la regulación de la captación de glucosas por parte de los astrocitos. También se muestra que alteraciones de la señalización del eje Insulina/IGF-I producen alteraciones en la captura de glucosa astrocitaria. Se determina que esta regulación ocurre a través de la interacción del receptor de IGF-I con el transportador facilitativo de glucosa 1 (GLUT1) y la localización en la membrana plasmática de estas proteínas mediada por la proteína interactuante con GAIP por el extremo C terminal (GIPC) usando citometría de flujo para medir la cantidad relativa de GLUT1 e IGF-IR que se encuentra en la membrana. GIPC es una proteína de andamiaje involucrada en la regulación del tráfico vesicular que interacciona con IGF-IR y GLUT1, pero no con el receptor de Insulina. Estas observaciones permiten proponer un nuevo papel para la Insulina, IGF-I y sus receptores en la homeostasis de glucosa en los astrocitos.

Summary

Brain glucose uptake has been the focus of research ever since glucose was proposed as the main energy source of neural cells. Altered brain glucose uptake has been associated to several neurological disorders like Alzheimer's and Parkinson's disease, or epilepsy. Until now, the role in brain glucose uptake of the Insulin/IGF-I axis that regulates glucose uptake in peripheral tissues has been dismissed because a lack of evidence of this signaling pathway in the regulation of brain glucose handling. Here, we present evidence that the Insulin/IGF-I axis has a role in the regulation of glucose uptake by astrocytes as determined by flow cytometry with a fluorescent glucose analog (6-NBDG). Furthermore, through analysis of astrocytes where the expression of the Insulin receptor or the IGF-I receptor has been decreased with the use of specific shRNAs we show that both receptors are needed to keep normal glucose uptake. *In vivo* experiments with confocal microscopy and 6-NBDG and Positron Emission Tomography in mice where the expression of the insulin or IGF-I receptors were diminished confirmed a key role of this axis in glucose uptake by astrocytes. We also show that alterations of the Insulin/IGF-I signaling cascade drive alterations in glucose uptake by astrocytes. We determined that these regulation is established through the interaction of IGF1R with the facilitative glucose transporter 1 (GLUT1) and the localization to the membrane of these proteins mediated by GIPC1 (for GAIP interacting protein, C terminus) using flow cytometry to measure the amount of GLUT1 and IGF-IR that is located at the membrane. GIPC1 is a scaffold protein involved in the regulation of vesicular trafficking that interacts with the IGF-IR and GLUT1 but no with the Insulin receptor. These observations lead us to propose a novel role for insulin, IGF-I and their receptors in astrocyte glucose homeostasis.

Tabla de contenido

1. Resumen	1
2. Summary	2
3. Tabla de contenido	3
4. Abreviaturas	6
5. Introducción	8
Control del flujo sanguíneo cerebral	10
Metabolismo en astrocitos	12
La glucosa como nutriente esencial	12
Metabolismo del glucógeno	16
Gluconeogénesis	17
Insulina, IGF-I y el sistema nervioso central	17
Insulina en el sistema nervioso central	17
IGF-I en el sistema nervioso central	20
Receptores de Insulina e IGF-I en el cerebro	21
Señalización de Insulina e IGF-I	22
Glucosa y el sistema Insulina / IGF1 en el cerebro	23
6. Objetivos	26
7. Materiales y métodos	28
Animales utilizados	29
Ratas Wistar	29
Ratones C57BL6	29
Cultivos primarios	29
Astrocitos de corteza cerebral	29
Neuronas granulares de cerebelo	30
Endotelio de micro vasculatura cerebral	31
Construcciones plasmídicas y producción de partículas virales	31
Ensayo de captura de glucosa	33
Inmunoensayos	34

Ensayo de translocación de proteína	35
Experimentos <i>In Vivo</i>	36
Administración de partículas lentivirales	36
Medición de la captación de glucosa en astrocitos	36
Procedimiento quirúrgico	36
Administración del 6-NBDG	37
Protocolo de estimulación	37
Microscopía de escaneo laser confocal	38
Análisis de datos	38
Imágenes PET de 18F-FDG	38
Ensayos de producción de glucógeno y lactato	39
PCR cuantitativa	40
Ensayo de ligación por proximidad <i>In Situ</i>	40
Co-localización de partículas inmunoreactivas	42
Electrofisiología	42
Preparación de las rodajas	42
Registros electrofisiológicos	43
Análisis Estadístico	43
8. Resultados	44
Insulina e IGF-I presentan un efecto sinérgico cooperativo sobre el metabolismo de los astrocitos	45
Regulación antagónica de la captación de glucosa en astrocitos por parte de los receptores del sistema IGF-I/Insulina	51
Efectos reguladores del sistema IGF-I/Insulina sobre la captación de glucosa <i>In Vivo</i>	53
Mecanismos de regulación de la captura de glucosa en el sistema Insulina/IGF-I/Glut1	58
9. Discusión	
Insulina e IGF-I conjuntamente promueven la captación de glucosa astrocitaria	65
Los receptores del sistema IGF-I / insulina regulan el funcionamiento y expresión de GLUT1	66

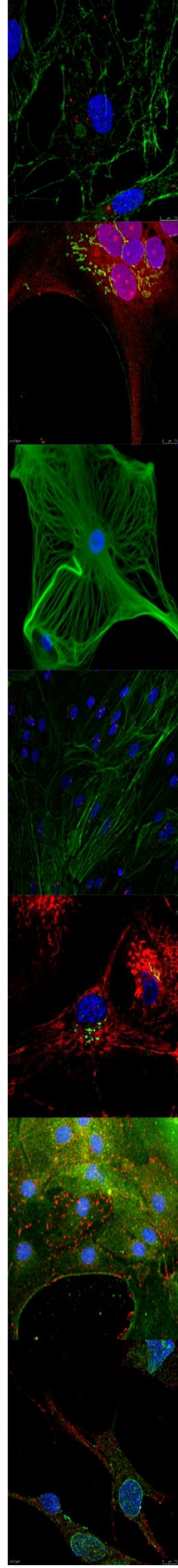
Mecanismo de acción del efecto de Insulina e IGF-I sobre la captura de glucosa	67
Implicaciones del efecto de I+I sobre la captura de glucosa cerebral	69
10. Conclusiones	72
11. Bibliografía	74

Abreviaturas

- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- ARNm: Ácido ribonucleico mensajero
- ARNhc: ARN horquillado corto
- ATP: Adenosín trifosfato
- Akt/PKB: Active human protein kinase
- BSA: Bovine serum albumin / Albúmina de suero bovino
- EAAT: Excitatory amino-acid transporter / Transportador de aminoácidos excitatorios
- EBSS: Equilibrated balance salt solution / Tampón salino equilibrado
- ERK: Extracellular signal-regulated kinases / Quinasas reguladas por señales extracelulares
- FBS: Fetal bovine serum / Suero fetal bovino
- GABA: Gamma-Aminobutyric acid / Ácido gamma-aminobutírico
- GH: Growth hormone / Hormona de crecimiento
- GHRH: Growth-hormone-releasing hormone / Hormona liberadora de la hormona de crecimiento
- GIPC: GAIP-interacting protein, C terminus / Proteína interactuante con GAIP por el extremo C terminal.
- GLUT1: Glucose transporte 1/ Transportador de glucosa 1
- GSK3 β : Glycogen synthase kinase 3 beta / Quinasa de la glucógeno sintasa 3 beta
- IGFbPs: Insulin growth factor binding proteins / Proteínas transportadoras de IGFs
- IGF-I: Insulin-like growth factor I / Factor de crecimiento parecido a la insulina tipo I
- IGF-II: Insulin-like growth factor I / Factor de crecimiento parecido a la insulina tipo II
- IGFIR: Insulin-like growth factor I Receptor / el receptor de IGF-I

- IGF1R: Insulin-like growth factor II receptor / Receptor de IGF-II
- IR: Insulin receptor / Receptor de insulina
- IRS: Insulin receptor substrate / Sustratos para el receptor de insulina
- LCR: Líquido cefalorraquídeo
- LDH: Lactato deshidrogenasa
- LRP1: Low density lipoprotein receptor-related protein 1 / Proteína 1 asociada al receptor de lipoproteína de baja densidad
- LRP2: Low density lipoprotein receptor-related protein 2 / Proteína 2 asociada al receptor de lipoproteína de baja densidad
- MCT1: Monocarboxylate transporter 1 / Transportador de monocarboxilatos 1
- MCT2: Monocarboxylate transporter 2 / Transportador de monocarboxilatos 2
- MAP: Mitogen-activated protein / Proteínas activadas por mitógeno
- MAPK: Mitogen-activated protein kinase / Proteína quinasa activada por mitógeno
- mTOR: Mammalian target of rapamycin
- NADPH: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate / Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
- PB: Tampón fosfato
- PBS: Tampón fosfato salino
- PFA: Paraformaldehído
- PI: Phosphoinositide / Fosfoinosítidos
- PI-3K: Phosphoinositide 3-kinase / Fosfatidil 3 quinasa inositol
- PKD: Protein kinase D / Proteína quinasa D
- SNC: Sistema nervioso central
- TTBS: Tampón tris salino con tween-20

INTRODUCCIÓN



Introducción

“Todo astrocito de la sustancia blanca o gris está provisto de un aparato chupador o pedículo perivascular. El aparato chupador constituye no sólo una disposición constante de los astrocitos de la sustancia blanca, sino uno de los factores neuróglícos más importantes de los centros. Semejante generalidad, junto con el hecho de que en los animales de pequeña talla (conejo, cobaya, etc.), y en los en curso de evolución (perro y gato de pocos días), el órgano chupador constituye la más espesa, y a veces la única expansión perceptible y bien coloreable del astrocito denotan que el susodicho apéndice debe desempeñar cometido fisiológico de primer orden.” (Ramon y Cajal, 1913) (Figura I1) Con estas palabras, ya en 1915, Santiago Ramón y Cajal había comprendido, a partir de la estructura y ubicación de los astrocitos, que envuelven la vasculatura cerebral, su vital importancia para el correcto funcionamiento del cerebro.

Teniendo en cuenta esto, se ha propuesto que la complejidad astrocitaria ha permitido el aumento de la capacidad funcional del cerebro (Oberheim et al., 2009; Oberheim, Wang, Goldman, y Nedergaard, 2006). De acuerdo con las ideas de Cajal, resaltando el papel astrocitario, es realmente llamativo que la proporción entre células gliales y neuronas se ve incrementada a lo largo de la escala filogenética de aproximadamente 0.1 en los nematodos a alrededor de 10 en los primates (Herculano-Houzel, 2012; Sherwood et al., 2006).

En este trabajo presentamos un nuevo mecanismo por el cual los astrocitos ayudan a satisfacer una de

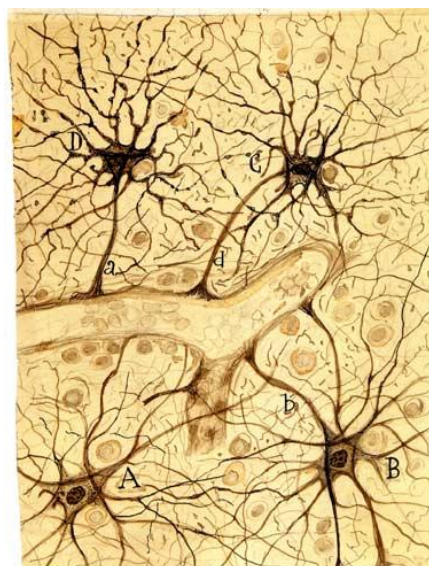


Figura I1. La unidad neurovascular de Santiago Ramón y Cajal. Dibujo de Santiago Ramón y Cajal donde muestra los procesos astrocitarios que envuelven un capilar cerebral a partir de una muestra tratado con el método de *oro-sublimado*. A Ramón y Cajal le llamaba profundamente la atención la rigidez estructural y la cantidad de procesos astrocitarios que envolvían el endotelio vascular.

las principales necesidades del sistema nervioso central, que no es otra que la regulación de la homeóstasis energética a través de su mediación en el transporte y metabolismo de la glucosa. Para ello utilizan una vía de señalización que en los tejidos periféricos es canónica, pero que hasta ahora se creía inoperante en el cerebro, el eje insulina/Igf-I.

Control del flujo sanguíneo cerebral

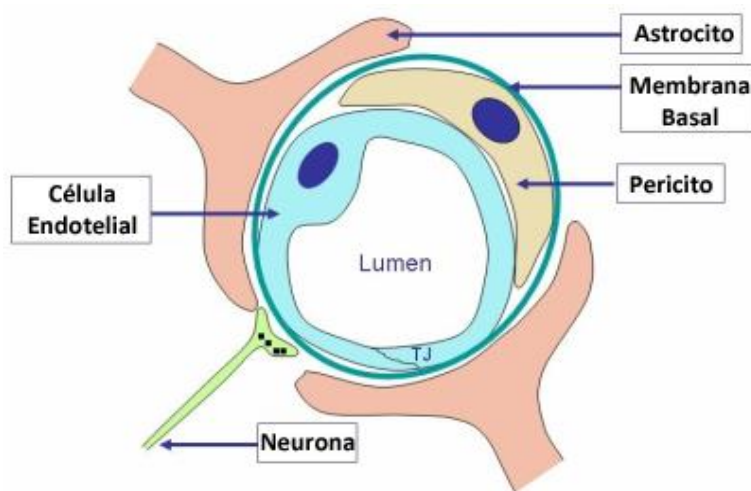


Figura 12. Estructura de la barrera hematoencefálica.

Sección transversal de un capilar sanguíneo que muestra la estructura de la barrera hematoencefálica. Esta no es un órgano en sí, sino que se encuentra definida como un concepto funcional. Es una estructura multicelular que sirve como interfase entre la sangre circulante y el sistema nervioso central. La base morfológica de la barrera son las células endoteliales cerebrales que envuelven los capilares cerebrales. Astrocitos, pericitos y neuronas completan la estructura.

Mientras que el cerebro humano solo representa el 2% de la masa corporal, es el responsable del consumo de cerca del 20% de la energía que se produce cuando se encuentra en reposo. Este alto nivel de consumo energético es esencial para el normal funcionamiento del cerebro, ya que se usa mayoritariamente en revertir los flujos de iones propios de la generación de los potenciales sinápticos y de acción (Attwell y Laughlin, 2001).

Si se produce una alteración que lleve a un inadecuado suministro de glucosa y oxígeno a alguna región del cerebro, se producirá lesiones y/o muerte tanto en las células neuronales como las células gliales. De hecho, diversas patologías, como la Isquemia cerebral o la parálisis cerebral producida por asfixia perinatal son algunos ejemplos de ello.

Con el fin de sustentar la función neuronal el cerebro ha desarrollado mecanismos de acoplamiento vascular para aumentar el flujo de sangre a las regiones “activas” del cerebro (Figura 12), una respuesta conocida como hiperemia funcional. De esta manera, diferentes necesidades funcionales requieren diferentes incrementos del flujo sanguíneo, dependiendo, principalmente del nivel de consumo energético. Es por esto, que la determinación de los mecanismos por los cuales se genera la hiperemia funcional es necesaria para desarrollar terapias encaminadas a corregir las deficiencias que aparecen en las diferentes patologías como el infarto cerebral (Leffler, Busija, Mirro, Armstead, y Beasley, 1989), la hipertensión (Girouard y Iadecola, 2006), la lesión de médula espinal (Baptiste y Fehlings, 2006), o el Alzheimer (Girouard y Iadecola, 2006).

En un principio, la idea era que el flujo sanguíneo era controlado localmente por un sistema de retroalimentación negativo en el cual la actividad neural era la que determinaba la demanda energética. Al ser necesario ATP que es usado para restablecer los gradientes de iones producidos durante la sinapsis y la generación de los potenciales de acción (Attwell y Laughlin, 2001), se pensaba que el uso de este ATP generaba señales metabólicas, como la disminución de oxígeno o glucosa, o el incremento de la producción de CO₂ (que es capaz de dilatar los capilares al ser transformado en H⁺ cuando reacciona con H₂O), que provocaban el incremento del flujo sanguíneo y por consiguiente, el aumento del suministro energético (Tian et al., 1995).

Sin embargo, la manipulación de los niveles de O₂ y de la concentración de glucosa (Lindauer et al., 2010; Mintun et al., 2001; Powers, Hirsch, y Cryer, 1996) ha mostrado que estos no son capaces de regular el flujo sanguíneo. Y, durante la activación neuronal, el pH se vuelve alcalino, en vez de ácido que era la situación que se esperaba al acumularse el CO₂, ya que este es lavado rápidamente por el incremento del flujo sanguíneo provocado por la actividad neuronal (Peterson, Wang, y Britz, 2011).

No obstante, otros derivados metabólicos si han demostrado la capacidad de incrementar el flujo sanguíneo. En este campo la adenosina, derivado de la hidrólisis del ATP, es capaz de contribuir a la hiperemia funcional, ya que, la inhibición de los receptores de adenosina es capaz de reducir el aumento del flujo sanguíneo causado por la actividad neuronal (Ko, Ngai, y Winn, 1990). Trabajos más recientes han mostrado que el control del suministro sanguíneo se encuentra regulado en mayor parte por mecanismos de pre-alimentación en donde las neuronas son capaces de señalar directamente sobre los vasos cerebrales o son capaces de activar los astrocitos para que secreten agentes vaso activos sobre la red vascular (Akgören, Fabricius, y Lauritzen, 1994; Chaigneau et al., 2007; Li y Iadecola, 1994; Norup Nielsen y Lauritzen, 2001; Zonta et al., 2003) estimulando el flujo sanguíneo cerebral.

Metabolismo en astrocitos

La glucosa como nutriente esencial

La glucosa está considerada como el principal nutriente para las células del sistema nervioso adulto (Clarke y Sokoloff, 1999; Wiesinger, Hamprecht, y Dringen, 1997). Cada tipo de célula nerviosa utiliza sus propios sustratos; además, algunas células nerviosas son capaces de producir compuestos que actúan como fuente de energía para otros tipos celulares. Con respecto a esto, los astrocitos desempeñan un papel fundamental en el flujo de sustratos energéticos a las neuronas debido tanto a su localización estratégica como a su versatilidad metabólica (Deitmer, 2000; P. J. Magistretti y Pellerin, 1991) (Figura I3). La particular morfología de los astrocitos, con sus terminaciones alrededor de los capilares del parénquima cerebral, en los cuales se encuentra la fuente de glucosa proveniente de la circulación, hace que los astrocitos sean la primera barrera celular que la glucosa ha de atravesar para penetrar en el cerebro. Esta situación privilegiada apoya el papel que desempeñan los astrocitos en la distribución de nutrientes desde la sangre hasta otras células cerebrales (P J Magistretti y Pellerin, 1999; P J. Magistretti y Pellerin, 1999) (Figura I3).

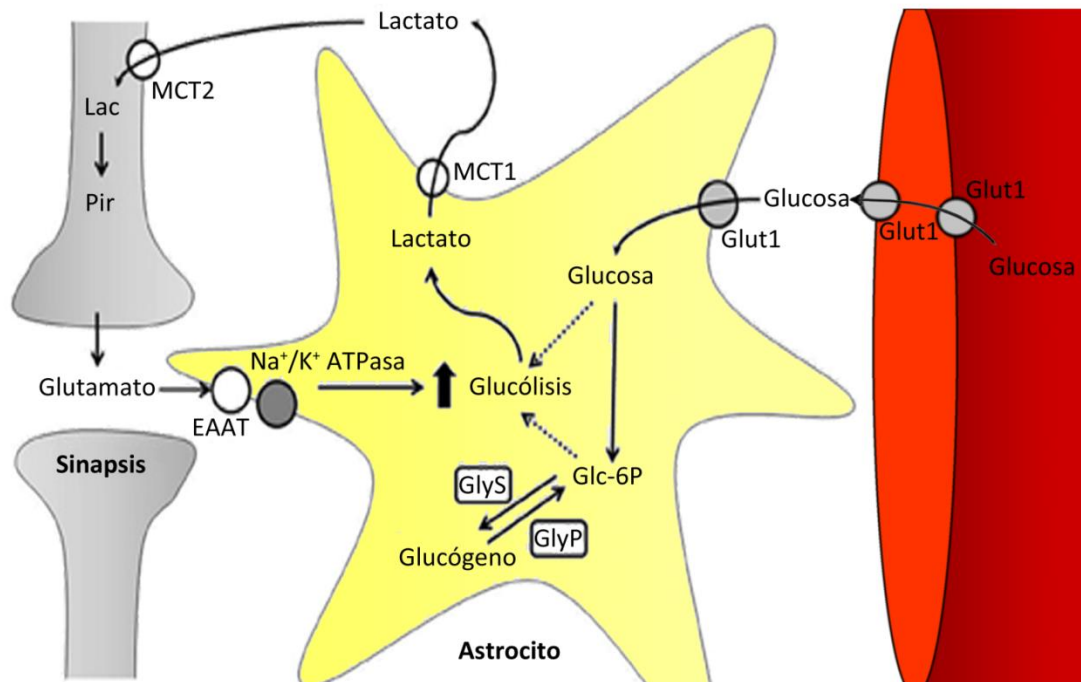


Figura 13. El sistema de transporte de glucosa cerebral. Una vez iniciado el estímulo glutamatérgico debido a la activación neuronal la glucólisis en el astrocito se ve estimulada permitiendo la entrada de la glucosa desde los capilares cerebrales a través de las células endoteliales utilizando principalmente GLUT1. Una vez dentro del astrocito la glucosa puede ser degradada directamente a través de la glucólisis o almacenada en forma de glucógeno. Un derivado del proceso glucolítico, el lactato puede ser transportado a través del MCT1 al exterior del astrocito de donde es captado por la neurona a través del MCT2. Una vez dentro de la neurona, el lactato servirá como sustrato energético para que ocurra la sinapsis.

La utilización de la glucosa por los astrocitos implica mayoritariamente la producción de lactato y piruvato, los cuales no tienen que ser necesariamente metabolizados a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, sino que, en su mayoría, son liberados al medio extracelular. La glucosa, además, puede incorporarse en lípidos, aminoácidos y glucógeno, y es precursor de algunos neurotransmisores como el GABA, el glutamato y la acetilcolina (Deitmer, 2000; Hertz, Dringen, Schousboe, y Robinson, 1999; Wiesinger et al., 1997). Ciertos intermediarios metabólicos, bajo circunstancias particulares, pueden sustituir a la glucosa y actuar como sustratos alternativos del metabolismo energético cerebral (P J Magistretti y Pellerin, 1996, 1999; P J. Magistretti y Pellerin, 1999). Así, el ayuno prolongado, la diabetes o la lactancia en neonatos producen un incremento en los niveles plasmáticos de los cuerpos cetónicos acetoacetato y 3-hidroxiacetato, que pueden ser utilizados por el cerebro como sustratos metabólicos y

pueden preservar la integridad y excitabilidad neuronal, particularmente en el desarrollo (Edmond, Auestad, Robbins, y Bergstrom, 1985; Yukitoshi Izumi, Benz, Katsuki, y Zorumski, 1997; A. M. Robinson y Williamson, 1980).

El primer paso en la entrada de glucosa al interior de los astrocitos es el transporte a través de la membrana plasmática, proceso que es llevado a cabo por el transportador GLUT1 (R. C. Vannucci y Vannucci, 2000; S. J. Vannucci, Maher, y Simpson, 1997). A continuación tiene lugar su fosforilación, siendo ésta a su vez una de las etapas limitantes en su metabolismo. Las células de astrogliá expresan (mayoritariamente en la mitocondria) hexoquinasa 1, que transforma la glucosa en glucosa 6-fosfato. Ésta puede entrar en la ruta glicolítica, en la ruta de las pentosas fosfato, en la ruta del sorbitol, o bien almacenarse en forma de glucógeno (Wiesinger et al., 1997). La cantidad de glucosa metabolizada por la ruta de las pentosas fosfato en células de astrogliá en cultivo es generalmente pequeña comparada con la metabolizada por la vía glicolítica. Además, la actividad glicolítica de células de astrogliá en cultivo es predominantemente anaerobia y se considera el lactato como el principal producto metabólico (P J Magistretti y Pellerin, 1999; P J. Magistretti y Pellerin, 1999; Wiesinger et al., 1997). De hecho, el lactato mantiene la función sináptica en ausencia de glucosa en cortes de hipocampo (A Schurr, West, y Rigor, 1988; Avital Schurr, Miller, Payne, y Rigor, 1999) y puede también mantener la función cognitiva en hipoglucemia (P J Magistretti y Pellerin, 1999; P J. Magistretti y Pellerin, 1999; Maran, Cranston, Lomas, Macdonald, y Amiel, 1994) e hipoxia (A Schurr y Rigor, 1998). El piruvato también mantiene la actividad sináptica y la morfología neuronal durante la carencia de glucosa o cuando se administra iodoacetato, un inhibidor de la glicolisis (Y Izumi, Benz, Zorumski, y Olney, 1994; Yukitoshi Izumi et al., 1997). Así, la astrogliá proporciona a las neuronas vecinas monocarboxilatos (lactato y piruvato) durante situaciones de elevado requerimiento energético o carencia de glucosa. La utilización de éstos como fuente de energía requiere metabolismo oxidativo, el cual queda comprometido en los casos de anoxia, pero puede tener lugar si la glicolisis está inhibida. Con bajos niveles de glucosa los astrocitos son capaces de mantener la actividad neuronal por un largo período de tiempo vía liberación de monocarboxilatos (Yukitoshi Izumi et al., 1997; A Schurr y Rigor, 1998).

Para poder ser utilizado como sustrato celular, el lactato ha de transportarse a través de las membranas mediante transportadores específicos. Se han identificado al menos dos transportadores de monocarboxilatos en cerebro con actividad frente a lactato, piruvato, y los cuerpos cetónicos 3-hidroxiacetato y acetoacetato: MCT1 (expresado en células endoteliales vasculares y astrocitos) y MCT2 (expresado fundamentalmente en neuronas de hipocampo y corticales) (Broer et al., 1997; Gerhart, Enerson, Zhbankina, Leino, y Drewes, 1997; Pellerin, Pellegrini, Martin, y Magistretti, 1998). A continuación, el lactato ha de convertirse en piruvato, constituyendo así una fuente metabólica eficiente de ATP, puesto que una molécula de piruvato proporciona 15 moléculas de ATP tras su oxidación a través de la piruvato deshidrogenasa y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos. La enzima responsable de esta conversión es la lactato deshidrogenasa (LDH), cuya expresión e isoformas varían en los distintos tejidos. Hay observaciones de que la isoforma LDH-5, la cual favorece la producción de lactato, se encuentra mayoritariamente en astroglia, mientras que la LDH-1, isoforma que favorece la utilización de lactato, se encuentra mayoritariamente en las neuronas (Bittar, Charnay, Pellerin, Bouras, y Magistretti, 1996). Estos datos apoyan la idea de que los astrocitos procesarían la glucosa vía glicolisis generando lactato, el cual, una vez liberado al medio y posteriormente capturado por las neuronas, sería transformado a piruvato, que tras entrar en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos proporcionaría la energía necesaria para la célula (P J Magistretti y Pellerin, 1999; P J. Magistretti y Pellerin, 1999).

En relación con este proceso, se ha observado que el glutamato, el principal neurotransmisor excitatorio del sistema nervioso central, estimula la captura de glucosa y la liberación de lactato por astrocitos (Loaiza, Porrás, y Barros, 2003; P J Magistretti y Pellerin, 1999). La captura del glutamato ocurre a través de transportadores, dos de los cuales son predominantemente, si no exclusivamente, específicos de células gliales. Se trata de los transportadores GLT-1 (=EAAT2) y GLAST (=EAAT1) (Araque, Sanzgiri, Párpura, y Haydon, 1999; M. B. Robinson y Dowd, 1997). Este transporte de glutamato en astrocitos está dirigido por un gradiente electroquímico de Na^+ : una molécula de glutamato es cotransportada con tres iones

Na⁺ hacia el interior celular y como consecuencia, un ión K⁺ sale al exterior. Esto conduce a un incremento de la concentración intracelular de Na⁺, que es equilibrado a través de la Na⁺/K⁺-ATPasa. Este proceso consume ATP e implica la activación de la glicolisis y la producción de lactato (P J Magistretti y Pellerin, 1999; P J. Magistretti y Pellerin, 1999; Pellerin y Magistretti, 1994, 1997; Takahashi, Driscoll, Law, y Sokoloff, 1995). Un gran número de evidencias experimentales apoya que este efecto del glutamato depende exclusivamente de sus transportadores y no de sus receptores (Pellerin y Magistretti, 1994, 1997; Takahashi et al., 1995).

De esta manera se consigue un acoplamiento entre actividad neuronal, liberación de glutamato, activación de la glicolisis en astrocitos y aporte de lactato como fuente energética para las neuronas (Figura I3).

Metabolismo del glucógeno

El glucógeno constituye la principal reserva energética del cerebro y está mayoritariamente localizado en los astrocitos, aunque también está presente en células del plexo coroideo y ependimal, así como en algunas neuronas del tallo cerebral. El cerebro puede considerarse como un órgano almacenador de glucógeno, cuya función podría ser proveer unidades de glucosa durante la actividad fisiológica. De hecho, el recambio de glucógeno es extremadamente rápido en los astrocitos y se correlaciona con la actividad de las neuronas vecinas (Choi, Tkác, Ugurbil, y Gruetter, 1999; Deitmer, 2000; P. J. Magistretti y Pellerin, 1991; Wender et al., 2000). La degradación de glucógeno astrogial resulta activada por diversos neurotransmisores (entre los que se encuentran el péptido intestinal vasoactivo, glutamato, noradrenalina, serotonina e histamina) vía cAMP y Ca²⁺ (Hamai, Minokoshi, y Shimazu, 1999; P. J. Magistretti y Pellerin, 1991; Pellerin y Magistretti, 1997). Una disminución de los niveles de glucosa del medio causa una pérdida en el glucógeno acumulado (Dringen y Hamprecht, 1992), mientras que la insulina y factores de crecimiento análogos incrementan los niveles de glucógeno almacenado en los astrocitos (Hamai et al., 1999; Pellerin y Magistretti, 1997).

El aspecto quizás más importante de la degradación del glucógeno es el destino de los residuos glicosílicos. Los residuos liberados no aparecen mayoritariamente como glucosa libre en el medio, sino que los astrocitos liberan principalmente ácido láctico (Dringen, Gebhardt, y Hamprecht, 1993; P. J. Magistretti y Pellerin, 1991). Alternativamente, la glucosa procedente de la degradación del glucógeno puede metabolizarse vía ruta de las pentosas fosfato para generar NADPH y proteger a los astrocitos frente al estrés oxidativo (Dringen, 2000; Rahman, Kussmaul, Hamprecht, y Dringen, 2000).

Gluconeogénesis

En los astrocitos también se da el proceso de gluconeogénesis hasta glucosa 6- fosfato, y de hecho se ha descrito la presencia de tres enzimas implicadas exclusivamente en la ruta (piruvato carboxilasa, fosfoenolpiruvato carboxiquinasa y fructosa 1,6-bisfosfatasa) en estas células (Wiesinger et al., 1997). La gluconeogénesis en astrocitos podría actuar como mecanismo tamponador, controlando la osmolaridad del fluido extracelular y reciclando el lactato generado por las células vecinas, derivándolo hacia rutas como la síntesis de glucógeno (Schmoll et al., 1995; Wiesinger et al., 1997; Jitrapakdee y Wallace, 1999).

Insulina, IGF-I y el sistema nervioso central

Insulina en el sistema nervioso central

Inicialmente, los estudios acerca del efecto de la Insulina en el sistema nervioso central estaban encaminados a observar su relación con el metabolismo de la glucosa. Hasta mediados de los años 50 se asumía que la insulina no tenía un efecto sobre la absorción o la degradación de la glucosa, sin embargo, a finales de la década de los 50 del siglo pasado, estudios *in vitro* mostraban que la insulina era capaz de incrementar la captura de glucosa en tejido proveniente de la médula espinal (Rafaelsen, 1958). La investigación de las zonas del cerebro en las cuales la insulina podría alterar el

metabolismo de la glucosa mediante el uso de fosforo radioactivo mostraron una alta concentración de este en la hipófisis, plexo coroideo y la epífisis después de la administración de insulina, y como el fosforo participa en el metabolismo de la glucosa, se infirió indirectamente que el metabolismo de la glucosa podría ser dependiente de insulina(Borrel y Örström, 1945).

A inicios de los años 60, se reportó que la inyección de Insulina inducía una disminución significativa de los niveles de glucosa tanto en sangre como en el líquido cefalorraquídeo (LCR); luego, mediante la inyección de insulina marcada con I¹³¹ se demostró que esta no pasa del LCR a la sangre, por lo cual, la reducción de los niveles de glucosa en el LCR se da por un efecto directo sobre el SNC (Chowers, Lavy, y Halpern, 1961). Además, en perros vagotomizados, inyecciones de insulina en la cisterna magna provocaron una caída de los niveles de glucosa en el LCR, mientras que la disminución en la sangre no era apreciable(Chowers, Lavy, y Halpern, 1966).

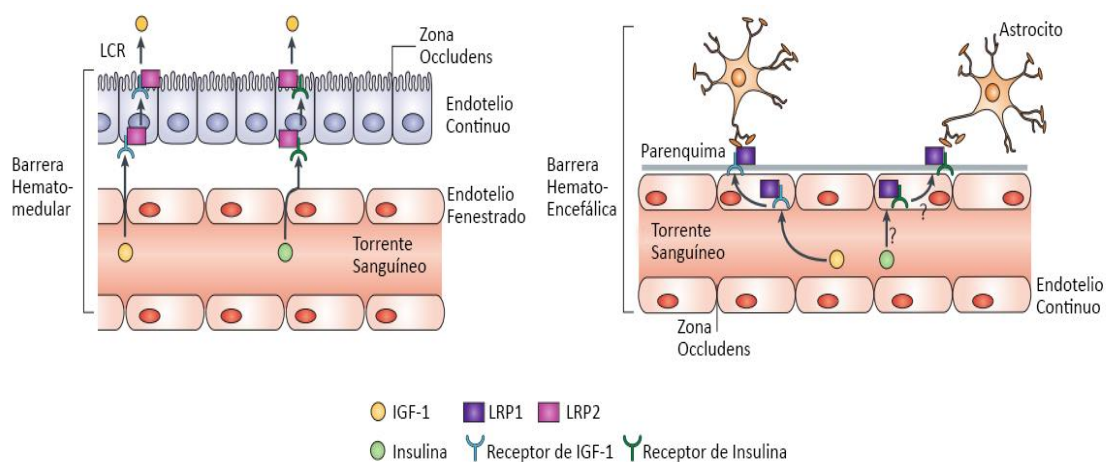


Figura I4. Mecanismos de entrada de la Insulina e IGF-I al cerebro. El primer mecanismo, a la izquierda, presenta un transporte constitutivo de IGF-I a través del plexo coroideo hacia el líquido cefalorraquídeo a través de un proceso de transcitosis que requiere de la Proteína 2 asociada al receptor de lipoproteína de baja densidad (LRP2, por sus siglas en inglés) y del receptor de IGF-I. Probablemente, la insulina es transportada a través de un proceso similar que involucre LRP2 y el receptor de insulina. A través de este proceso, la insulina e IGF-I presentes en la sangre acceden al líquido cefalorraquídeo en proporción directa con los niveles presentes en la sangre. El segundo mecanismo, a la izquierda presenta el paso de IGF-I e insulina a través de la barrera hematoencefálica, aquí, la entrada de IGF-I al parénquima cerebral requiere de LRP1 y el receptor de IGF-I y parece ser independiente de los niveles de IGF-I presentes en la sangre. La entrada de insulina a través de la barrera hematoencefálica esta mediada por un mecanismo desconocido que requiere del receptor de insulina.

Teniendo en cuenta estos resultados, se establecieron los niveles de insulina presentes en el SNS de ratas, reportando niveles 25 veces superiores en el cerebro con respecto a la sangre y qué, además, esta concentración podía variar de acuerdo a las región del cerebro, fluctuando entre 10 y 100 veces más que la concentración sanguínea(Havrankova, Schmechel, Roth, y Brownstein, 1978). Sin embargo, otros estudios reportaron que la concentración de Insulina en el cerebro no era tan apreciable en otros modelos de experimentación en animales como el perro o el conejo(Eng y Yalow, 1981). Es también reseñable el hecho que durante el desarrollo, los niveles de insulina fluctúan, encontrando su pico justo después de nacimiento y estabilizándose a la llegada de la etapa adulta, mientras que los niveles de insulina en LCR y sangre permanecen inalterados en el tiempo (Schechter et al., 1992).

Estas evidencias llevaron a plantear la cuestión acerca de dónde provenía la insulina cerebral, en donde se han propuesto dos posibles fuentes, que esta provenga de una fuente periférica, posiblemente de origen pancreático, o que sea producida de manera autocrina en el cerebro. Para respaldar el origen periférico, la capacidad de la Insulina de pasar a través de la barrera hematoencefálica fue reportada previamente (Banks, Jaskan, Huang, y Kastin, 1997; Margolis y Altszuler, 1967; Woods y Porte, 1977), sin embargo, la correlación entre los niveles de Insulina en plasma y en el LCR no era lineal, encontrando siempre menos niveles en el LCR cuando la insulina era administrada periféricamente. Esta observación evidenciaba un sistema de transporte saturable a través de la barrera hematoencefálica (Baura et al., 1993) inclusive a niveles euglicémicos (Banks et al., 1997). Se ha descrito que el transporte de la insulina desde la sangre hasta SNC es a través de los receptores de insulina presentes tanto en micro, como macrovasculatura cerebral (Baura et al., 1993; Frank y Pardridge, 1981; Pardridge, Eisenberg, y Yang, 1985), además de demostrarse que durante condiciones que llevan a una resistencia a la insulina se altera el transporte de insulina a través de la barrera hematoencefálica debido a una disminución de los receptores presentes en esta (Heni et al., 2013). Los sistemas de transporte de la insulina descritos en la actualidad se resumen en la figura I4.

IGF-I en el sistema nervioso central

Al contrario que la Insulina, el IGF-I es un péptido que es producido por el SNC, de hecho, todas las células del sistema nervioso central lo producen en alguna fase u otra de la ontogenia. Aunque su expresión es más alta perinatalmente, sobretodo en la corteza, tronco del encéfalo, el hipotálamo, y la médula espinal, la expresión en el adulto se mantiene, pero de una manera reducida (C A Bondy y Lee, 1993). La manera en la cual está regulado el IGF-I en el SNC no ha sido estudiada en profundidad, pero existen indicios que bajo condiciones patológicas los cambios en los niveles de IGF-I responden para mantener la homeostasis del sistema, así, la microglia parece ser la principal fuente de producción local de IGF-I (Lee, Wang, Seaman, y Vannucci, 1996; Walter, Berry, Hill, y Logan, 1997). Una característica del sistema del IGF, es la regulación de su biodisponibilidad a través de la unión del IGF-I a las proteínas de unión de IGF. De estas, seis unen con alta afinidad IGF-I, pero no insulina, además de unas diez proteínas similares a las IGFBP que unen IGF-I con menor afinidad (Hwa, Oh, y Rosenfeld, 1999). Estas regulan la disponibilidad del IGF-I al presentar una mayor afinidad por este, que su receptor. En el cerebro, la IGFBP2 es la más abundante del grupo, sin embargo, todas están presentes en el SNC, pero cada una presenta un patrón de distribución diferente (Ocrant, Fay, y Parmelee, 1990).

Además del IGF-I producido localmente, se ha demostrado que el IGF-I es capaz de pasar a través de la barrera hematoencefálica mediante un mecanismo mediado por la translocación activa de receptores (Nishijima et al., 2010). La mayor parte del IGF-I periférico proviene de la producción en los hepatocitos a pesar que prácticamente todos los tejidos expresan IGF-I. A diferencia de lo ocurrido con la Insulina, el papel endocrino del IGF-I en el cerebro no ha sido estudiado a profundidad, sin embargo, los bajos niveles de ARNm de IGF-I en el cerebro adulto y la alta expresión de receptores del sistema en el cerebro adulto sugiere un papel en el mismo (E Carro, Trejo, Busiguina, y Torres-Aleman, 2001; Trejo, Carro, y Torres-Aleman, 2001). Los sistemas de transporte del IGF-I a través de la barrera hematoencefálica se resumen en la figura 14.

Receptores de Insulina e IGF-I en el cerebro

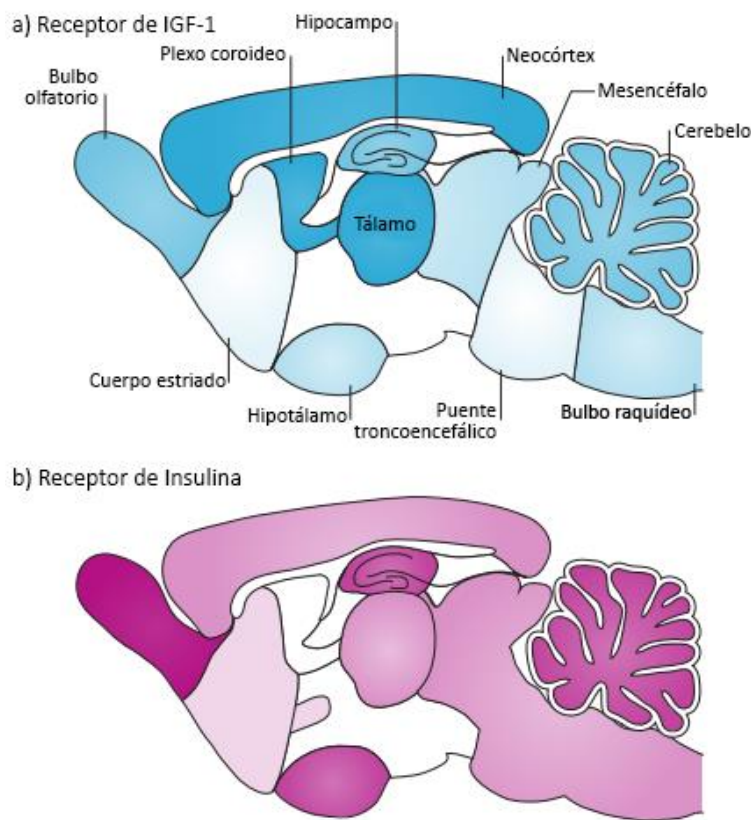


Figura 15. Distribución de los receptores de IGF-I e insulina en el cerebro. **A**, La expresión del receptor de IGF-I se encuentra aumentada en el neocórtex, tálamo y plexo coroideo. **B**, Los niveles más altos del receptor de insulina en el cerebro se encuentran en el bulbo olfatorio. La superposición relativa de la expresión de los receptores en el córtex, hipocampo, cerebelo, plexo coroideo e hipotálamo permitiría la formación de receptores híbridos. Las intensidades en el color muestran la abundancia relativa de cada receptor.

El sistema IGF1-1 Insulina se caracteriza por la capacidad de los ligandos de unir cada uno de sus receptores específicos con una afinidad entre 100 y 1000 veces mayor que para otro ligando del sistema, sin embargo, el receptor de insulina y el de IGF-I pueden formar híbridos funcionales que son capaces de unir a los ligandos con afinidades similares (Benyoucef,

Surinya, Hadaschik, y Siddle, 2007). En mamíferos, los receptores del sistema IGF-I / Insulina son expresados ampliamente en el SNC, sobre todo durante el desarrollo (Baron-Van Evercooren, Olichon-Berthe,

Kowalski, Visciano, y Van Obberghen, 1991; Chiu y Cline, 2010; García-de Lacoba, Alarcón, de La Rosa, y de Pablo, 1999; Schechter et al., 1992), sin embargo, a pesar que durante el periodo adulto ven reducida su expresión, los receptores del sistema mantienen su patrón de expresión (Adamo, Raizada, y LeRoith, 1989) (Figura 15). Además, en el adulto, los receptores del sistema, sobre todo el de IGF-I, ven aumentada su expresión en respuesta a daño (Torres Aleman, 2012).

Señalización de Insulina e IGF-I

La unión de la Insulina y/o IGF-I a la subunidad alfa de sus receptores activa la actividad tirosina-quinasa de la subunidad beta, y esta activación hace que la subunidad beta se autofosfore en sus residuos tirosina, provocando la fosforilación del residuo tirosina de una proteína de acoplamiento conocida como substrato del receptor de Insulina (IRS, por sus siglas en inglés)(Taha y Klip, 1999). Hasta ahora, la familia de las IRS se compone de seis proteínas, mientras que IRS-1 a IRS-4 presentan un dominio C terminal capaz de reclutar ciertas proteínas específicas que presentan dominios SH2, IRS-5 e IRS-6 son pobremente fosforiladas en respuesta a los ligandos (Brummer, Schmitz-Peiffer, y Daly, 2010). De la familia de las IRS, IRS-1 e IRS-2 son las

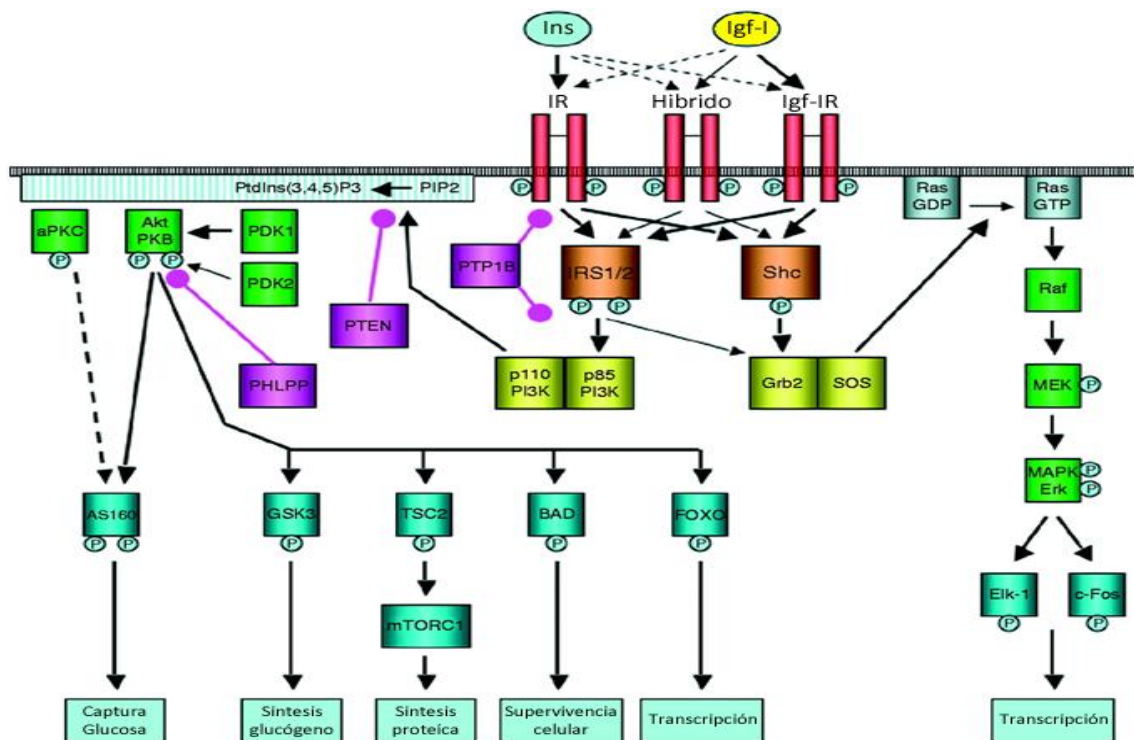


Figura 16. Vías de señalización del sistema Insulina / IGF-I. Los péptidos similares a la insulina actúan a través de varios receptores. La insulina y el IGF-I presentan receptores estructuralmente similares que pertenecen a la familia de los receptores tirosina-quinasa. Están formados por dos subunidades α y dos β . Una subunidad α - β es capaz de homodimerizar con otra, pero también es capaz de heterodimerizar, formando receptores híbridos. Estos receptores también pueden unir IGF-II. La señalización canónica de la insulina e IGF-I ocurre a través de las vías de las MAPK y de PI3K-AKT. Adicional a esto, el receptor de IGF-I unido a su ligando puede dirigirse al núcleo para actuar como un modulador transcripcional.

responsables de la mayoría de los efectos pleiotrópicos de la señalización de Insulina e IGF-I (Boura-Halfon y Zick, 2009).

La transmisión de la señalización del Sistema IGF-I / Insulina se da mayoritariamente a través de dos cascadas paralelas que incluyen la ruta de fosfoinositol 3-quinasa/proteína quinasa B (PI3K/Akt por sus siglas en inglés) y ruta de la proteína quinasa mitógeno activada (MAPK por sus siglas en inglés). Ambas vías son las encargadas de modular la transcripción génica y activar una serie de vías quinasas-fosfatasas que afectan procesos celulares importantes como la síntesis proteica, autofagia, mitosis, resistencia a estrés oxidativo o regulación metabólica entre otras (Figura I6). La vía de PI3K es una de las activadas por las IRS mejor estudiadas (Boura-Halfon y Zick, 2009). La activación de PI3K lleva a la formación de fosfatidilinositol 3-4-5 trifosfato y eventualmente, a la estimulación de la quinasa fosfoinositido dependiente (PDK-1 por sus siglas en inglés). PDK-1 inicia la activación de varios efectores de la cascada de señalización como Akt, mTOR, la quinasa P70s6 y la isoforma atípica de PKC (PKC μ o PKD) (Boura-Halfon y Zick, 2009). La otra vía de señalización, la de las proteínas activadas por mitógeno (MAP, por sus siglas en inglés), que pertenecen a la familia de las quinasas serina/treonina, son activadas por diversos estímulos incluidos el del IGF1R e IR (Cobb y Goldsmith, 1995; Dews et al., 2000). Esta vía se encuentra principalmente implicada en procesos de mitogénesis y diferenciación celular (Avruch, 1998) y también está relacionada con la regulación de la apoptosis (Huang et al., 2007). Sin embargo, como ocurre con todas las rutas de señalización, el papel de esta ruta en definitiva depende del contexto celular y el tipo de célula. En conjunto, estas vías de señalización son esenciales para el metabolismo de la glucosa, lípidos y proteínas en el hígado, músculo y tejido adiposo (Bell, Pilkis, Weber, y Polonsky, 1996; A R Saltiel y Kahn, 2001; Alan R. Saltiel, 2001; Withers y White, 2000).

Glucosa y el sistema Insulina / IGF1 en el cerebro

La mayor parte de la evidencia que existe actualmente en referencia al consumo y regulación de la glucosa en el sistema nervioso central proviene de la estrecha relación encontrada entre la señalización alterada del sistema insulina/IGF-I presente en la

diabetes tipo II y la enfermedad de Alzheimer (Bomfim et al., 2012; N. Zhao et al., 2008; W.-Q. Zhao et al., 2008). De esta forma, como la insulina y el IGF-I son factores importantes en la modulación de la disponibilidad de glucosa y la homeóstasis energética, tanto en los tejidos periféricos como en el SNC, la alteración de los niveles de insulina presente en el líquido cefalorraquídeo, de su proporción con respecto a los niveles de insulina plasmática, de los receptores de insulina y del aumento de los niveles de insulina en ayunas que se presenta en la enfermedad de Alzheimer (Moloney et al., 2010), han sido asociados a una alteración de la señalización mediada por insulina e IGF-I cerebral que produce alteraciones en la disponibilidad de glucosa y la homeostasis energética. Así, una alteración del balance energético contribuye a la disfunción cognitiva (Kann y Kovács, 2007).

De la misma manera se ha reportado que, al igual que con la observada disminución en la expresión de insulina, la expresión de los receptores de IGF-I y II se encuentra considerablemente alterada en los cerebros de pacientes con enfermedad de Alzheimer (Steen et al., 2005; Talbot et al., 2012). Más aún, ha sido demostrada una deficiencia en la expresión de genes que codifican para la Insulina, IGF-I, IGF-II y sus receptores en pacientes con la enfermedad de alzhéimer, pero no con diabetes tipo II (Rivera et al., 2005).

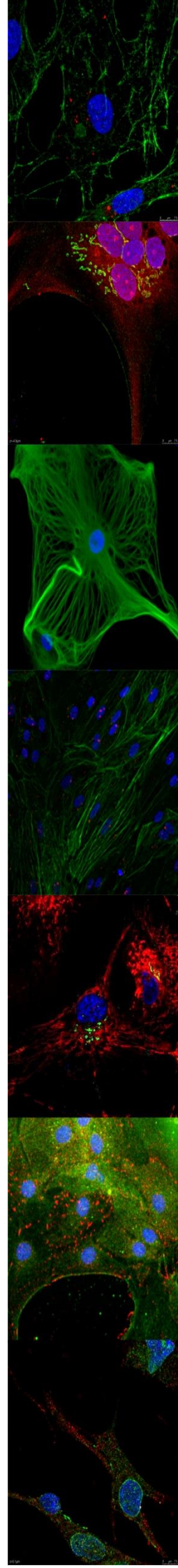
Esta serie de deficiencias normalmente conllevan defectos en la señalización de PI3K/AKT, produciendo alteraciones en el metabolismo de la glucosa (Liu, Liu, Grundke-Iqbal, Iqbal, y Gong, 2011). De esta manera se ha propuesto que la disminución de la expresión y función de la vía PI3K/AKT puede alterar la función de los transportadores facilitativos de la glucosa derivando en un hipometabolismo de la glucosa y la subsecuente disminución de la producción de ATP mitocondrial (Bosco, Fava, Plastino, Montalcini, y Pujia, 2011).

Además, han sido reportadas alteraciones de la otra vía de señalización canónica, MAPK, que se encuentra notablemente activada durante el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer (Bosco et al., 2011), lo cual podría estar relacionado con un aumento de la actividad de GSK3 β (Eva Carro y Torres-Aleman, 2004) y que ha sido relacionada con un aumento de la fosforilación de Tau (De La Monte, 2009) pero que

también conlleva a un aumento de la fosforilación de la glucógeno sintasa y la subsecuente disminución de actividad de la misma, alterando por ello una de las vías de metabolismo de la glucosa.

En su conjunto, estas evidencias sugieren que la insulina y el IGF-I presentan un papel importante a la hora de mantener la homeóstasis cerebral, razón por la cual, en el presente trabajo buscamos establecer el papel del sistema IGF-I/insulina en la regulación de la captura de glucosa en el cerebro. A continuación se describe un Nuevo mecanismo por el cuál, la cooperación entre insulina e IGF-I estimulan la captación de glucosa en los astrocitos. El efecto cooperativo de la insulina y el IGF-I podrían explicar los cambios en los niveles de captación de glucosa cerebral durante la activación neuronal sin alterar los niveles de insulina cerebral ya que la entrada dependiente de la actividad cerebral de IGF-I es requerida para estimular la captura de glucosa localmente. Llama a su vez la atención la actividad independiente de ligando mostrada por el receptor de IGF-I, inhibiendo la captura de glucosa antagonizando la acción conjunta de la insulina y el IGF-I.

OBJETIVOS



Objetivos

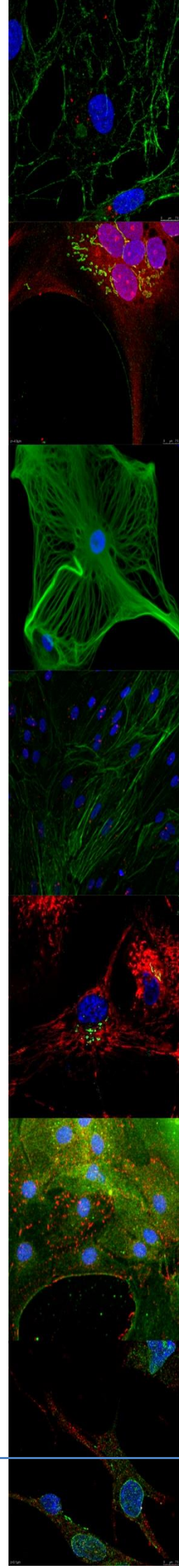
1. Establecer el papel el papel del sistema IGF-I/Insulina en la captura de glucosa cerebral

- a. Establecer el efecto de la Insulina y el IGF-I sobre los distintos componentes del sistema nerviosos central.
- b. Establecer el efecto de la falta de Insulina e IGF-I sobre la captura de glucosa cerebral
- c. Establecer el papel de la señalización del sistema IGF-I / Insulina en la captura de glucosa cerebral

2. Establecer los mecanismos por los cuales el sistema regula la captura de glucosa cerebral

- a. Establecer la ruta de señalización por la cual el sistema IGF-I/Insulina regula la captación de glucosa cerebral
- b. Determinar el efecto que produce las alteraciones de la vía de señalización por la que se regula la captación de glucosas cerebral
- c. Establecer los componentes que se ven regulados por la activación del sistema IGF-I/Insulina en la captura de glucosa cerebral

MATERIALES Y **MÉTODOS**



Materiales y Métodos

Animales utilizados

Todos los protocolos experimentales se realizaron según la normativa estipulada por el sub-comité de bio-ética del CSIC (Código de proyecto SAF2010-1703) conforme a la regulación Europea y Española (86/609/CEE). Todos los animales provinieron del animalario del Instituto Cajal.

Ratas Wistar

Se utilizaron ratas Wistar para obtener el material para los cultivos de neuronas, usando neonatos de entre 6-9 días de edad. Para obtener cultivos de glía se utilizaron neonatos de entre 1 y 4 días de edad.

Ratones C57BL6

Ratones C57BL6 adultos, de entre 3 y 4 meses de edad y con pesos comprendidos entre 25 y 35 g fueron utilizados para los experimentos *In Vivo*.

Cultivos Primarios

Astroцитos de corteza cerebral

Ratas de entre 0 y 4 días después del parto fueron sacrificadas por decapitación. Se procedió a extraer el cerebro y luego de ser brevemente sumergido en etanol al 70% se procedió a la disección de la corteza cerebral teniendo siempre el tejido sumergido en EBSS (Gibco, Life Technologies, Alcobendas, España). Después de limpiar las meninges, se procedió a homogenizar mecánicamente el tejido y re-suspenderlo en un volumen de 2 ml de EBSS por cada animal.

Tras centrifugar a 1000 rpm, el homogenizado es resuspendido en medio DMEM-F12 y puesto a crecer en frascos de cultivo de 75 cm² (Falcon, Amsterdam, Holanda) previamente tratados con Poli-L-Lisina.

Después, 7-10 días de incubación a 37 °C con atmosfera humificada y con un 5% de CO₂. Cuando el cultivo ha alcanzado total confluencia, los frascos son puestos en agitación O/N a 280 rpm en un agitador orbital manteniendo siempre la temperatura del cultivo a 37 °C. Después de lavar con PBS con el fin de eliminar la microglía, el cultivo es incubado con 1 ml de Tripsina-EDTA durante 5 minutos. Tras asegurar que la mayoría de las células se han despegado de la matriz, las células son resuspendidas, contadas usando una cámara de Neubauer y sembradas en los distintos soportes de cultivos según necesidad.

Neuronas granulares de cerebelo

Ratas de entre 6 y 8 días después del parto fueron sacrificadas por decapitación. Se procedió a extraer el cerebelo y luego de ser brevemente sumergido en etanol al 70% se procedió a la disección teniendo siempre el tejido sumergido en DMEM-F12 con DNAsa y papaína, que será el medio de digestión. Después de quitar las meninges se procedió a la disección mecánica del tejido.

El tejido es resuspendido en 5 ml de medio de disección y puesto en un Tubo Falcon de 50 ml. La atmosfera de incubación de la muestra es cambiada por Carbógeno y la muestra es incubada durante 1 hora a 37 °C con agitación constante de 180 rpm.

El tejido disgregado es centrifugado a 100 rpm durante 5 minutos y resuspendido en medio Neurobasal (Gibco, Life Technologies) suplementado con anti-anti (Life Technologies). Las células fueron contadas usando una cámara de Neubauer y sembradas en los distintos soportes de cultivos según necesidad.

Al día siguiente, el medio es cambiado por medio Neurobasal suplementado con B27 (Gibco).

Endotelio de micro vasculatura cerebral

Ratas de entre 6 y 8 días después del parto fueron sacrificadas por decapitación. Se procedió a extraer el cerebro y luego de ser brevemente sumergido en etanol al 70% se procedió a la disección teniendo siempre el tejido sumergido en DMEM-F12 con Tripsina, que será el medio de digestión. Se separó la corteza cerebral y después de quitar las meninges se procedió a la disección mecánica del tejido.

El tejido es resuspendido en 5 ml de medio de disección y puesto en un Tubo Falcon de 50 ml. La muestra es incubada durante 1 hora a 37 °C con agitación constante de 180 rpm.

El tejido disgregado es sometido a una nueva disgregación mecánica y después centrifugado a 1000 rpm durante 5 minutos y resuspendido en medio HUMEK (Gibco) suplementado con Puromicina (Life Technologies). Las células fueron sembradas en Placas de 6 pocillos (Falcon, Amsterdam, Holanda) previamente tratadas con colágeno Tipo IV (Life Technologies) y fibronectina (Life Technologies) e incubadas durante 3 días a 37 °C con atmosfera humificada y con un 5% de CO₂, cambiando el medio todos los días.

Después, 7-10 días de incubación a 37 °C con atmosfera humificada y con un 5% de CO₂. Cuando el cultivo ha alcanzado total confluencia, es incubado con 1 ml de Tripsina-EDTA durante 5 minutos. Después de asegurar que la mayoría de las células se han despegado de la matriz, las células son resuspendidas, contadas usando una cámara de Neubauer y sembradas en los distintos soportes de cultivos según necesidad.

Construcciones plasmídicas y producción de partículas virales

Se obtuvo el DNA mediante transformación de bacterias E. coli competentes de la estirpe DH5α, según Sambrook, 1989. Produjimos los plásmidos creciendo las bacterias en cultivo de Luria Bertani (LB) con antibiótico para seleccionarlas

(Ampicilina o Kanamicina). La purificación del DNA plasmídico se realizó usando “Illustra plasmidPrep Midi Flow Kit” (GE Healthcare, Madrid) o “QIAfilter plasmid maxi kit” (QIAGEN, Germantown, MD, Estados Unidos).

Los plásmidos transfectados fueron: IGF1-KR, una forma del receptor de IGF1 incapaz de unir ATP, inhibiendo de esta forma su autofosforilación (Fernandez, Fernandez, Carrero, Garcia-Garcia, y Torres-Aleman, 2007), HIR-K1030R4 (Jacob, Whittaker, y Stanley, 2002), una forma del receptor de Insulina basada en la misma estrategia de la construcción anterior adquirida a través de Addgene (Cambridge, MA, USA) y Glut1-Exo Flag que fue ~~un~~ suministrado por el Dr. Jeffrey C. Rathmell (Wieman, Wofford, y Rathmell, 2007).

Con el fin de lograr una inhibición de la transcripción de una proteína específica, usamos el sistema del ARN horquillado corto (ARNhc), que es una molécula de ARN monocatenario que adopta la forma de una horquilla debido a apareamientos intracatenarios. Este es sustrato de la endorribonucleasa Dícer, que al escindirlo libera un ARN monocatenario de unos 22 nucleótidos denominado «ARN temporal pequeño». Este ARN es capaz de complementar el ARN mensajero (ARNm) producido a partir del gen que quiere inhibirse lo que desencadena un proceso que termina con la completa degradación del complejo.

Para el proceso de transfección transitoria de las diferentes construcciones se utilizó el Amaxa basic glial cell nucleofactor kit (Lonza, Basilea, Suiza) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para el proceso de transducción viral usamos el sistema de tres plásmidos previamente descrito (Dull et al., 1998). El sistema de co-transfección consiste en un plásmido que contiene el gen que quiere transducirse, en nuestro caso un ARNhc, la construcción de empaquetamiento (pCMV-dR8.2 Δvpr) y la proteína G de la cubierta del virus de la estomatitis vesicular (pMD2.G, Addgene, Cambridge, MA, USA). Los ARNhc contra Glut-1, IGF1-R e IR, además de un control con una secuencia aleatoria que no reconoce ningún gen descrito y un plásmido control que permite la expresión de la proteína verde

fluorescente mejorada (PVFM) fueron adquiridos de Origene (HuSH-29, Origene, Rockville, MD, USA), El ARNhc dirigido contra GIPC fue construido siguiendo el método previamente descrito (Addgene, n.d.) usando los oligonucleotidos

5'CCGGA CTCA CCGAACCTCGGAAGGCCTCGAGGCCTCCGAGGTTCCGGTGAGTTTT
TG3' y

5'AATTCAAAAACTCA CCGAACCTCGGAAGGCCTCGAGGCCTCCGAGGTTCCGGTGA
GT3' que reconocen el fragmento comprendido entre los nucleótidos 684-704 del ARNm de GIPC. El vector de transferencia (5 µg), el de cubierta (2 µg), y los plásmidos de empaquetamiento (5 µg) fueron transfectados usando fosfato cálcico en células de riñón embrionarias humanas de la línea 293T (6 × 10⁶ células por placa) cultivadas en medio DMEM con 10% de suero fetal bovino y 1% de penicilina/estreptomicina. La función lisosomal fue inhibida previamente utilizando cloroquina. El sobrenadante que contenía las partículas virales fue recolectado, filtrado y almacenado a -80°C. La concentración viral fue titulada por citometría de flujo. (FACS Aria cytometer, BD Biosciences, San Diego, CA, USA). La eficiencia de infección fue de aproximadamente el 80% usando partículas virales que transducían el gen de la PVFM.

Ensayo de captura de glucosa

Para establecer el consumo de glucosa en las diferentes poblaciones celulares cerebrales utilizamos el análogo fluorescente de la glucosa 6-(N-(7-Nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol-4-il)amino)-6-Desoxiglucosa (6-NBDG, Setareh biotech, Eugene, OR, USA) cuya cinética de captura por parte de los astrocitos cerebrales ha sido previamente validada (Barros et al., 2009). En el caso de la evaluación de la captura en cultivos celulares, las células eran ayunadas en medio sin suero fetal bovino por tres horas. En el caso en el que se utilizaran inhibidores farmacológicos, se añadían una hora antes del inicio de los tratamientos. A continuación se añadía insulina (INS; Sigma-Aldrich, Madrid, España), IGF-I (ProSpec-Tany Technogene, Rehovot, Israel) o ambas moléculas a la vez como tratamiento junto el 6-NBDG a una concentración final de 30 µM.

Los cultivos se mantuvieron a 37°C durante tres horas y entonces el medio fue reemplazado con PBS enfriado en hielo para detener el metabolismo celular. Las células fueron levantadas de la placa donde habían crecido usando tripsina-EDTA, PBS y se añadió SFB a cada muestra. La intensidad de fluorescencia fue medida usando citometría de flujo (FACSAria cytometer, BD Biosciences, San Diego, CA).

Los inhibidores farmacológicos utilizados fueron: Picropodofilina 120nM, un inhibidor específico del receptor de IGF1 (PPP, Merck Chemicals, Nottingham, Reino Unido), S961 10nM, un inhibidor específico del receptor de Insulina recientemente descrito (Schäffer et al., 2008) (Novo Nordisk, Bagsvaerd, Dinamarca) y CID755673 (Sigma-Aldrich) un inhibidor específico de PKD.

Inmunoensayos

Los ensayos inmunocitoquímicos fueron hechos como según procedimientos descritos anteriormente (Nishijima et al., 2010). Los niveles de proteína se normalizaron con respecto a la proteína total cargada. Diferentes exposiciones de cada ensayo fueron adquiridas para garantizar la linealidad y para que coincidiesen los niveles de control de carga a efectos de la cuantificación. Los anticuerpos y las diluciones utilizadas se encuentran referenciados en la tabla 1.

Anticuerpo	Referencia	Dilución WB	Dilución IF	Empresa
IGF-I α	sc-463	1:500	1:100	Santa Cruz Biotechnology
IGF-IR β	sc-713 AC	1:200		Santa Cruz Biotechnology
Insulin R β	sc-711	1:1000		Santa Cruz Biotechnology
IGF-I Receptor β	9750	1:2000		Cell Signaling
Glut1	sc-7903	1:1000	1:100	Santa Cruz Biotechnology
GIPC	sc-9648	1:1000	1:200	Santa Cruz Biotechnology
β -Actin	A5316	1:10000		Sigma-Aldrich

AKT	Sc-8312	1:1000		Santa Cruz Biotechnology
pAKT (Ser473)	9271	1:1000		Cell Signaling
pERK 42/44 (Thr202/Tyr204)	9101	1:2000		Cell Signaling
ERK 42/44	9102	1:2000		Cell Signaling
PKD	ab 17096	1:1000		Abcam
p-PKD	ab 74105	1:1000		Abcam

Tabla 1. Anticuerpos usados en los diferentes inmunoensayos.

Para el análisis densitométrico se utilizó el programa informático Quantity One acoplado a un densitómetro GS800 (Bio-Rad, Hercules, CA, EU).

Ensayo de translocación de proteína

Con el fin de cuantificar la translocación de Glut1 y de IGF-IR usamos un enfoque previamente descrito (Koshy, Alizadeh, Timchenko, y Beeton, 2010), brevemente, con la ayuda de un anticuerpo que reconoce la cadena alfa del IGF-IR (SC-463, 1:50, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EU) y de una construcción en la cual, en la primera horquilla extracelular de la secuencia de Glut1 se añadió un epítipo FLAG (Wieman et al., 2007) que, al ser reconocido por un anticuerpo específico (anti Flag M2, F1804, 1:1000, Sigma-Aldrich), permite el reconocimiento del dominio extracelular de Glut1. La construcción plasmídica es transfectada en las células de la forma descrita previamente.

Después que las células son incubadas con los distintos tratamientos son incubadas con los anticuerpos primarios descritos anteriormente y posteriormente fijadas con una solución de paraformaldehído al 1% ; luego de lavar, el anticuerpo secundario es añadido (Alexa Fluor 488, A-11008, 1:1000, Life Technologies). La intensidad de fluorescencia es medida por citometría de flujo (FACSaria cytometer, BD Biosciences, San Diego, CA)

Experimentos *in vivo*

Administración de partículas lentivirales

Los animales fueron anestesiados utilizando una mezcla de isoflurano/oxígeno (5% para la inducción de la anestesia, 2% para mantenimiento). Después de eliminar la *duramadre*, la punta de una pipeta de vidrio fue puesta sobre la superficie del cerebro. Las partículas lentivirales (2 μ l) con el ARNhc contra el receptor de IGF-I, contra el receptor de INS o con la secuencia aleatoria inespecífica fueron administradas a cada ratón. La administración se hizo a través de la pipeta de vidrio conectada a una jeringa Hamilton (Hamilton, Reno, NV, EU). La tasa de infusión fue de 1 μ l cada 10 minutos. La coordenadas estereotáxicas fueron: -1.06mm a partir de bregma y -1mm lateral.

Medición de la captación de glucosa en astrocitos

Procedimiento quirúrgico

El método para determinar la captación de glucosa en astrocitos ha sido previamente descrito (Chuquet, Quilichini, Nimchinsky, y Buzsáki, 2010; Pérez-Alvarez, Araque, y Martín, 2013). Para marcar los astrocitos usamos Sulforodamina 101 (100mg/kg, i.p. SR101; Sigma-Aldrich, Madrid, España), un compuesto que marca solo los astrocitos, permitiendo su distinción de neurona y células epiteliales (Nimmerjahn, Kirchhoff, Kerr, y Helmchen, 2004). Los ratones fueron anestesiados utilizando uretano (1.7g/kg, i.p. Sigma-Aldrich, Madrid, España). La arteria femoral fue canulada. Luego, una craneotomía de 4 mm de diámetro alrededor del área de interés fue hecha. En determinados experimentos se añadió PPP (10 μ M) o solución vehículo (NaCl 140mM, KCl

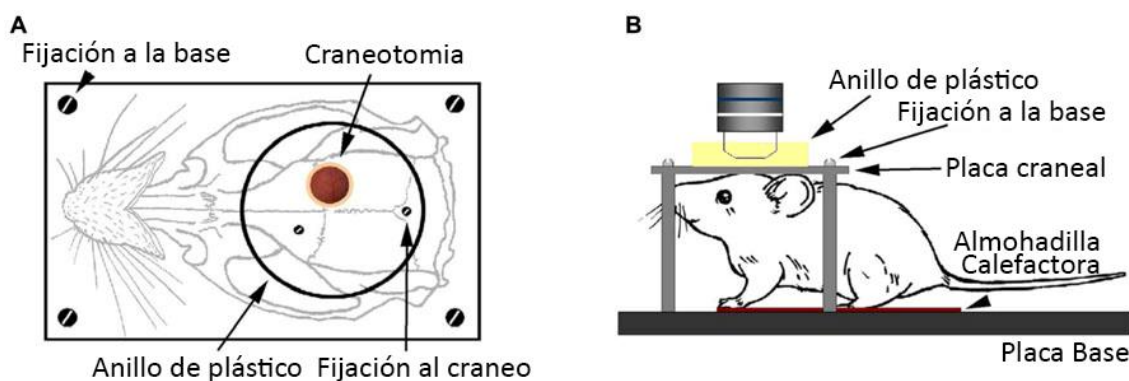


Figura M1. A, Vista dorsal esquemática del sistema de sujeción del cráneo del ratón B, Vista lateral esquemática de la disposición del animal en la estación de adquisición de imágenes.

5mM, MgCl₂ 1mM, CaCl₂ 2mM, EDTA 1mM, HEPES potasio 8.6mM, glucosa 10mM) al cerebro expuesto, aplicándose con una micropipeta. Después de dejar actuar 5 minutos, la corteza fue lavada y una gota de agarosa de bajo punto de fusión (1% en solución tamponada con HEPES) se depositó; luego un cubreobjetos de cristal fue puesto sobre el cerebro expuesto, luego, cemento dental (Fortex, Facident, Barcelona, España) fue aplicado para fijarlo en su sitio. Una placa de aluminio liviana (2x3.5cm) que tiene un hoyo en el centro (10mm de diámetro) fue unida al cráneo centrada en el área de la craneotomía y fijada con cemento dental. La placa de aluminio fue fijada a otra de aluminio grueso que sirve de base, la disposición del animal puede verse en la figura M1. La base fue movida a la estación de adquisición. La temperatura del animal fue monitorizada todo el tiempo utilizando una sonda rectal (Technomed Europe, Maastricht, Holanda) y la temperatura regulada con una placa de calefacción (RS Amidata, Madrid, España) controlada con un termostato (Cibertec, Madrid, España) y fijada a 37°C.

Administración del 6-NBDG

El 6-NBDG (Setareh biotech, Eugene, OR, EU) fue disuelto en una solución de 55% de solución tamponada con HEPES y 45% de DMSO, pH 7.42, a una concentración de 5mg/ml. Una jeringa Hamilton de 300µl rellena de la solución de 6-NBDG fue conectada a través de la cánula de la arteria femoral y conectada a una bomba de micro-inyección (Harvard Apparatus, MA, EU). La solución fue bombeada a una velocidad de 20µl/min/100g.

Protocolo de estimulación

Los bigotes de los animales fueron estimulados con impulsos de aire de 100 ms de amplitud cada 5Hz durante 30s con un inyector de presión (Dagan, MN, EU) controlados con un Axon Digidata 1322A y un software pClamp (Molecular Devices, CA, EU). El aire fue expulsado a una presión de 1 bar a través de un capilar de vidrio unido a un capilar de plástico, ubicado aproximadamente a 1 cm lateral y anterior a la nariz del animal para estimular toda la almohadilla de bigotes.

A la vez, la cola fue pinzada a 2 Hz con fórceps, generando así un protocolo pareado de estimulación.

Microscopía de escaneo laser confocal

La adquisición de imágenes se realizó con un microscopio laser (CVI Melles Griot, Cambridge, Reino Unido) confocal de escaneo basado en un sistema Olympus FV30 confocal, acoplado a un microscopio directo Olympus BX61WI (Olympus, Tokyo, Japon) y un objetivo Olympus LUMPLFL 60XW/IR de inmersión en agua.

Análisis de datos

Los astrocitos son identificados gracias a la señal roja emitida por la SR-101. Los astrocitos concentran SR-101 en su soma haciéndolos fluorescentes (Nimmerjahn et al., 2004). Cada secuencia de imágenes fue alineada sobre la imagen previa con la función *Align Slice* (ImageJ, National Institutes of Health) para corregir la desviación x-y causada por la posible desviación producida por el movimiento del tejido. La intensidad de fluorescencia fue medida en cada región de interés, limitándolas a los somas de las células marcadas con SR-101. Las señales fueron expresadas como los cambios en la fluorescencia relativa ($\Delta F/F_0$), donde F_0 es la media del periodo de control.

Imágenes PET de ^{18}F -FDG

El Análisis de tomografía de emisión de positrones de 18 Fluorodesoxiglucosa (^{18}F -FDG) se realizó para medir el metabolismo cerebral en las instalaciones del Instituto Pluridisciplinar de la UCM por técnicos especializados. Los animales fueron sometidos a un ayuno de 12 horas, luego, el trazador fue inyectado intraperitonealmente (18.5 MBq in 0.2 ml of 0.9% NaCl, Instituto Tecnológico PET, Madrid, España) y se dejaron en reposo durante 45 minutos en sus cubetas, luego se anestesiaron con una mezcla de isoflurano y oxígeno (5% para la inducción de la anestesia y 2% para el mantenimiento) y puesto en el soporte de tomógrafo. Se realizó una adquisición durante 20 minutos. El escáner utilizado fue un tomógrafo híbrido PET-CT de pequeños animales (Balcerzyk et al., 2009) (Albira ARS, Oncovision, Valencia, España). Tras la

adquisición, las imágenes PET fueron reconstruidas usando un algoritmo ordenado de maximización expectativa (OSEM) con correcciones para la dispersión, atenuación, tiempo de extinción y decaimiento del radio elemento. Para realizar la cuantificación de la actividad metabólica, la imagen de la tomografía computarizada del cráneo de cada animal se adquirió a la vez que la imagen de resonancia magnética en donde las ROIs fueron previamente delineadas en una plantilla. Después de la adquisición de ambas imágenes la transformación matemática espacial fue almacenada y aplicada a la imagen PET adquirida y a la plantilla de la resonancia magnética lo que permite el correcto alineamiento entre la imagen PET y la plantilla de la imagen de resonancia magnética. Una vez que la captura de ^{18}F -FDG en las diferentes regiones cerebrales fue calculada (kBq/cc), la actividad de cada región del hemisferio izquierdo, en donde se habían inyectado partículas lentivirales que promovían la expresión de los ARNhc para el receptor de IGF-I y receptor de insulina fue normalizada contra su homóloga en el hemisferio derecho, infectada con partículas lentivirales que promueven la expresión de un ARNhc de secuencia aleatoria, y expresada como captura proporcional. Todos los procesos de visualización, registro y cuantificación fueron realizados usando el programa PMOD 3.0 (PMOD Technologies Ltd., Zúrich, Suiza).

Ensayos de producción de glucógeno y lactato

La producción astrocitaria de glucógeno y lactato fue realizada empleando kits comerciales (Glycogen Assay Kit, MAK016, LActate Assay Kit, MAK064, Sigma-Aldrich) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células tratadas de forma similar a la descrita anteriormente fueron mantenidas por 6 horas a 37 °C, entonces, las células fueron lavadas usando PBS a 4°C y homogenizadas en agua destilada fría para el ensayo de glucógeno o en el tampón del ensayo de lactato. El protocolo del fabricante fue seguido para realizar la detección fluorimétrica. La fluorescencia de las muestras fue detectada usando un lector de microplacas (Fluostar Optima, BMG labtech, Ortenberg, Alemania).

PCR cuantitativa

La extracción del ARN total a partir de lisados celulares se realizó mediante el uso de TRIzol (Life Technologies). 1 µg de ARN fue retro transcrito usando un kit comercial (High Capacity cDNA Reverse Transcription kit, Life Technologies) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para cuantificar genes específicos 62.5 ng de ADNc fueron amplificados usando sondas Taqman (Life Technologies) para Glut1, Glut4, IGF-IR e IR, así como para la unidad ribosomal 18S como control endógeno. Cada muestra fue testada por triplicado en 20 µl de reacción usando un kit de PCR comercial (TaqMan Universal PCR Master Mix) siguiendo las instrucciones del fabricante. Todas las reacciones fueron hechas en un termociclador para PCR en tiempo real (7500 Real Time PCR system, Life Technologies). El análisis cuantitativo fue realizado de acuerdo al procedimiento descrito previamente (Pfaffl, 2001). Los resultados están expresados como proporciones relativas a la expresión al transcrito de referencia 18S.

Ensayo de ligación por proximidad *In Situ*

Las interacciones entre Glut1 e IGF-Ir fueron detectadas en astrocitos cultivados en cubre objetos de vidrio cubiertos de polilisina usando un kit comercial mediante la técnica de ligación por proximidad (Duolink II in situ PLA detection kit, Olink Bioscience, Uppsala, Suecia) (Figura M2). Los astrocitos fueron fijados en 4% de paraformaldehído por 10 minutos, lavados con 20mM de glicina en PBS para desactivar la fluorescencia de los grupos aldehído y permeabilizados con la misma solución tampón con un 0.05% de Tritón X-100 durante 5 minutos y a continuación lavados con PBS. Después de 1h de incubación con la solución de bloqueo a 37°C en una cámara húmeda, los astrocitos fueron incubados durante la noche con los anticuerpos primarios diluidos para Glut1 e IGF-IR en solución diluyente de anticuerpos y fueron procesados siguiendo las instrucciones del fabricante usando las sondas PLA que detectan anticuerpos de conejo o ratón (Duolink II PLA probe anti-Rabbit plus, Duolink II PLA probe anti-Mouse minus, 1:5 en solución diluyente de

anticuerpos, Olink Bioscience). Un medio que contiene DAPI fue utilizado para el montaje de las muestras. Las muestras fueron observadas en un microscopio confocal Leica SP2 (Leica microsystems, Manheim, Alemania) equipado con un objetivo apocromático 63X de inmersión de aceite. Se adquirió una proyección máxima para cada campo compuesta de entre 6 y 12 capturas en el eje Z con una distancia de 1 μm . La cuantificación de las células que contienen uno o más señales rojas, el número de número total de células (núcleos azules) y su razón r (número de señales rojas / número de células que presentan señal) fue determinada estimando entre 230 a 350 células de entre 5 a 8 diferentes campos usando el programa FIJI (Schindelin et al., 2012). Los núcleos y señales rojas fueron estimados en base a las proyecciones máximas de cada grupo de imágenes para cada campo procesando individualmente cada canal. Los núcleos fueron segmentados aplicando un filtro de media, restando el fondo, aumentando el contraste y finalmente aplicando un rango de intensidad para obtener las imágenes binarias y los ROIs alrededor de cada núcleo. Las señales rojas también fueron filtradas y los rangos de intensidad establecidos para obtener las imágenes binarias. Las señales rojas fueron contadas en cada uno de los ROI obtenidos en las imágenes de los núcleos.

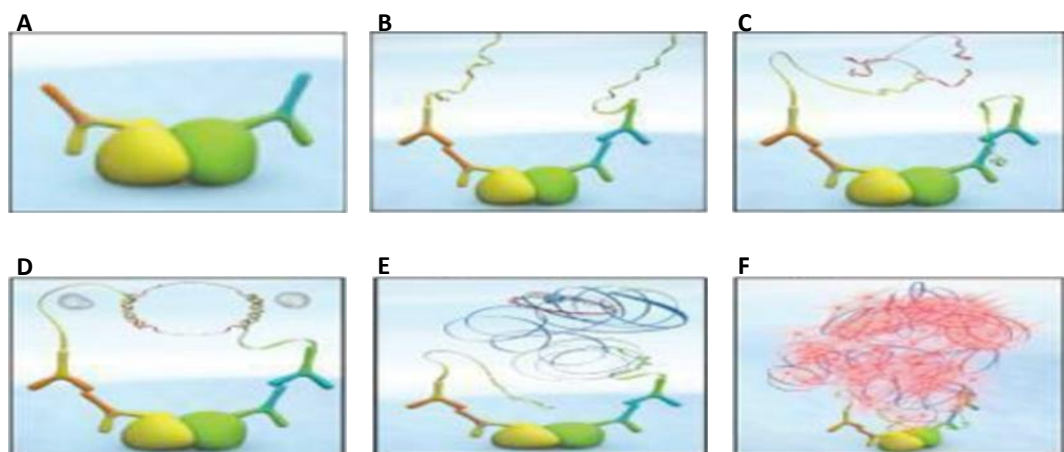


Figura M2. Representación esquemática del ensayo de ligación por proximidad (PLA). **A**, La muestra es incubada con anticuerpos desarrollados en diferentes especies. **B**, Una vez los anticuerpos primarios han reconocido las proteínas, la muestra es incubada con las sondas específicas, + y -, para cada especie. **C**, Las sondas hibridan los oligonucleótidos complementarios de cada una de ellas. **D**, Posteriormente un ciclo de ligación permite formar un ADN circular. **E**, La muestra es sometida a un ciclo de amplificación formando una nube de ADN. **F**, Por último, se añade la sonda fluorescente que permite detectar la interacción.

Co-localización de partículas inmunoreactivas

La inmunocitoquímica se realizó de la forma descrita anteriormente (Stadler et al., 2013). Las imágenes fueron obtenidas usando un microscopio confocal Leica TCS-SP5 equipado con un objetivo 63X de inmersión de aceite (HCX PL APO CS:63X/1.40-0.60, Leica Microsystems). Para cada campo, una serie de entre 8 a 12 imágenes (una para cada canal) en el eje Z con una distancia de 0.25 μm entre cada una de ellas fue adquirida. Una vez adquiridas, las imágenes fueron procesadas usando una deconvolución en 3 dimensiones utilizando un método ciego para la generación de PSF utilizando el software LAS-AF (Leica Microsystems). Una vez pre-procesadas, la cuantificación de las vesículas en cada campo se realizó aumentando el contraste y calculando un rango de intensidad con el fin de obtener las imágenes binarias e identificar los ROI alrededor de cada partícula. El número de partículas que co-localizan entre los diferentes canales fue determinada teniendo en cuenta entre 20-34 células en 5 diferentes campos usando el software FIJI (Schindelin et al., 2012).

Electrofisiología

Preparación de las rodajas

Las rodajas corticales se realizaron a partir de ratones C57BL/6 de entre 12 y 16 semanas de edad. Los animales fueron anestesiados y decapitados. El cerebro fue extraído rápidamente y sumergido en fluido cerebroespinal artificial (ACSF por sus siglas en inglés). Las rodajas de 400 μm fueron incubadas durante tiempos superiores a 1 hora a temperatura ambiente en ACSF que contiene: NaCl 124, KCl 2.69, KH₂PO₄ 1.25, MgSO₄ 2, NaHCO₃ 26, CaCl₂ 2, and glucose 10 (todas las concentraciones en mM) y fueron gaseadas con 95% O₂ / 5% CO₂ (osmolaridad: 290/300 mOsm/l; ph=7.35). Las rodajas se sumergieron en una cámara de registro y perfundidas continuamente con ACSF gaseado, estableciendo el flujo entre 1-2 ml/min a 30-34°C. El área de registro fue visualizada usando un microscopio Olympus BX50WI (Olympus Optical, Tokyo, Japon)

Registros electrofisiológicos

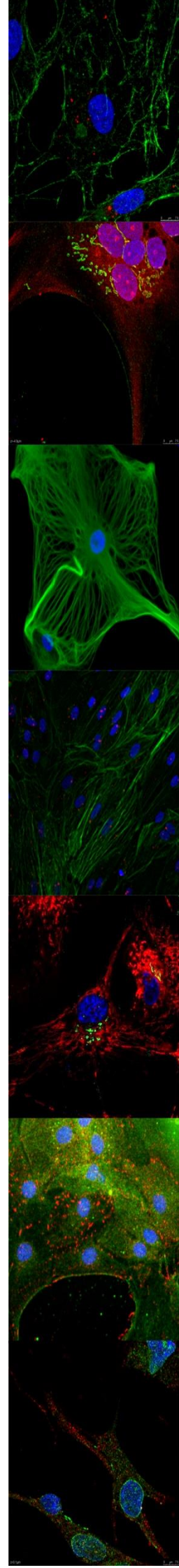
Se ubicaron electrodos bipolares de platino/iridio de 50 μm en la capa 4 de la corteza somatosensorial. Para registrar la actividad excitatoria sináptica, microelectrodos de vidrio de 3-5 $\text{M}\Omega$ que contienen NaCl 1 mM se ubicaron en la capa 2 y las rodajas fueron perfundidas con ACSF con picrotoxina 50 μM y CPG55845 5 μM para bloquear los receptores GABAA y GABAB respectivamente. En la solución ACSF sin glucosa, la concentración de NaCl se ajustó para tener una osmolaridad entre 290-300 mOsm. Se utilizó una intensidad de estímulo que evocara la mitad de la amplitud máxima de potencial excitatorio postsináptico de campo (fEPSPs por sus siglas en inglés). Los registros basales corresponden a el registro de por lo menos 10 minutos del estímulo a una frecuencia de 0.1 Hz. Las pendientes de las respuestas basales fueron tomadas como el 100% y las pendientes de los registros durante los experimentos fueron expresadas como porcentajes de la pendiente basal. Los receptores de IGF-I e Insulina fueron bloqueados específicamente utilizando PPP (10 μM) y S961 (10 nM) respectivamente, añadiéndolos al ACSF.

Estadística

Todos los datos se presentan como la media \pm la desviación estándar. Las diferencias entre los grupos se analizaron mediante ANOVA de una vía seguida de un análisis de comparaciones múltiples de Tukey. Las comparaciones de medias se realizaron mediante la prueba T-Student de dos colas.

Todo el procesamiento estadístico se realizó utilizando el software Excel junto con el plugin de análisis de datos real-statistics.

RESULTADOS



Resultados

Insulina e IGF-I presentan un efecto sinérgico cooperativo sobre el metabolismo de los astrocitos

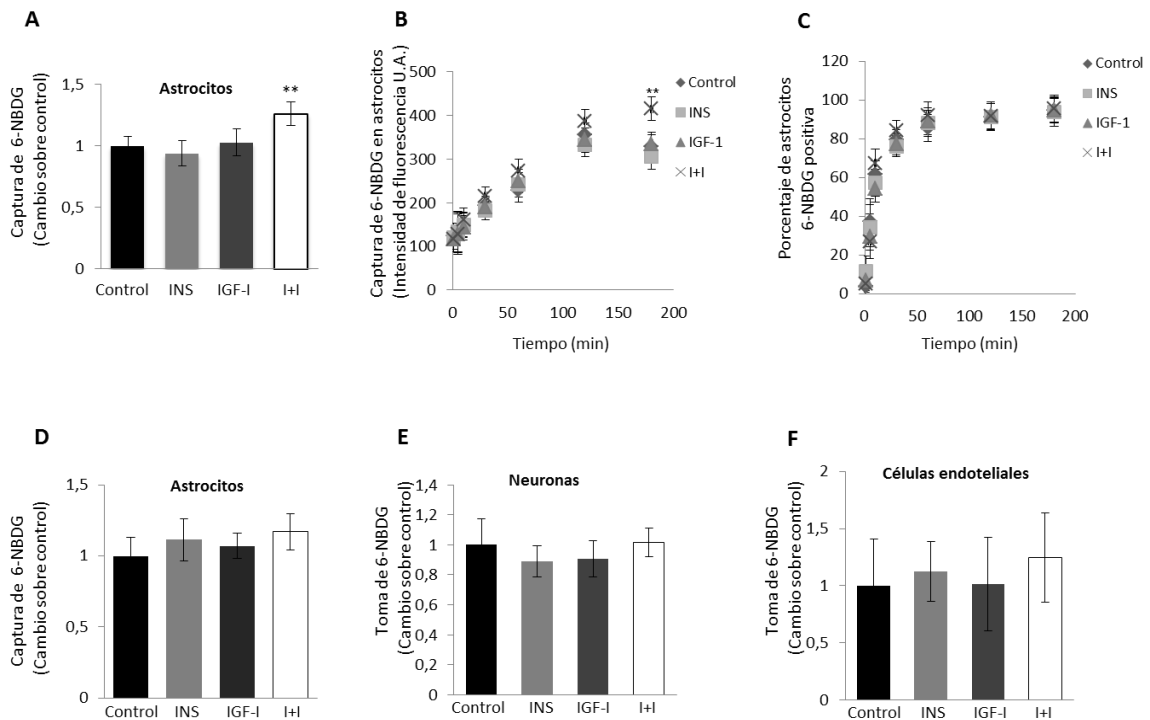


Figura R1: La cooperatividad entre la Insulina y el IGF-I incrementa la captura de glucosa en Astrocitos. A, Astrocitos tratados con Insulina e IGF-I 1 nM muestran un incremento en la acumulación del análogo fluorescente de la glucosa 6-NBDG. **B,** Astrocitos tratados con Insulina e IGF-I muestran el máximo de captura de 6-NBDG después de 3 horas de tratamiento (n=6; **p<0.01 contra los niveles basales control). **C,** Después de una hora de tratamiento, casi la totalidad de las células analizadas presentan un marcaje positivo para el 6NBDG que no se ve alterado durante la progresión de los diferentes tratamientos. **D,** Los astrocitos tratados con Insulina y/o IGF-I 100 nM no ven alterada la captura de del análogo fluorescente de la glucosa 6NBDG. **E y F,** Ni las neuronas ni las células endoteliales respectivamente ven alterada la captura del 6-NBDG al ser tratadas con Insulina y/o IGF-I 1 nM. (En todos los casos n=6; **p<0.01 contra los niveles basales control)

Hace más de un siglo se ha descrito que un aumento en la presión sanguínea conlleva un aumento en la cantidad de sangre en el cerebro (Roy y Sherrington, 1890), así, la glucosa que alcanza el cerebro entra a través de la barrera hematoencefálica a través del sistema de acoplamiento neurovascular que en respuesta a la activación neuronal,

se produce un aumento del flujo sanguíneo, es por esto que nos preguntamos qué elementos de la barrera hematoencefálica, células endoteliales o astrocitos, son capaces de responder a la insulina e IGF-I, péptidos que, a través de la sangre son capaces de llegar al cerebro para ejercer sus diferentes funciones. De esta manera evaluamos el efecto en la captura de glucosa en estos tipos celulares usando 6-NBDG (Kim, Lee, Jung, y Williams, 2012). De forma similar a lo reportado previamente (Barros et al., 2009), usando cultivos primarios, encontramos que la captura del análogo fluorescente de la glucosa presenta una cinética de incorporación mucho más lenta, y que además, cerca del total de la población evaluada presenta marcaje positivo (Figura R1 B y C). Evaluando el efecto de la Insulina e IGF-I a 10 nM, ni la Insulina o el IGF-I son capaces de estimular la captura de glucosa en los astrocitos, sin embargo, la acción combinada de estas dos hormonas es capaz de estimular la captación en los astrocitos pero no en las células endoteliales cerebrales (Figura R1 A y F). A pesar que las neuronas, que son las principales consumidoras de glucosa, ningún efecto apreciable es inducido por la Insulina o el IGF-I ni en combinación (Figura R1 E). Este efecto solo es apreciable cuando utilizamos dosis fisiológicas de Insulina e IGF-I en los cultivos astrocitarios, pues a dosis mayores (100 nM) el efecto de la estimulación desaparece (Figura R1 D).

Como algún tipo de cooperación entre la Insulina e IGF-I parece probable, examinamos los componentes de la vía de señalización en astrocitos, los receptores de la vía de señalización se encuentran ampliamente expresados por todo el cerebro, así que al establecer los niveles de los receptores en astrocitos encontramos que el receptor de IGF-I se expresa casi tres veces más que el de insulina (Figura R2 A). La inhibición de la señalización mediante inhibidores específicos del receptor de Insulina y del IGF-I produce un bloqueo del efecto cooperativo sobre la captación de glucosa en ambos casos (Figura R2 B y C). De la misma manera, la expresión en astrocitos de formas mutantes en donde se ha inhibido la capacidad de unir ATP en el dominio Tirosina quinasa logra abolir el efector cooperativo (Figura R2 D y E).

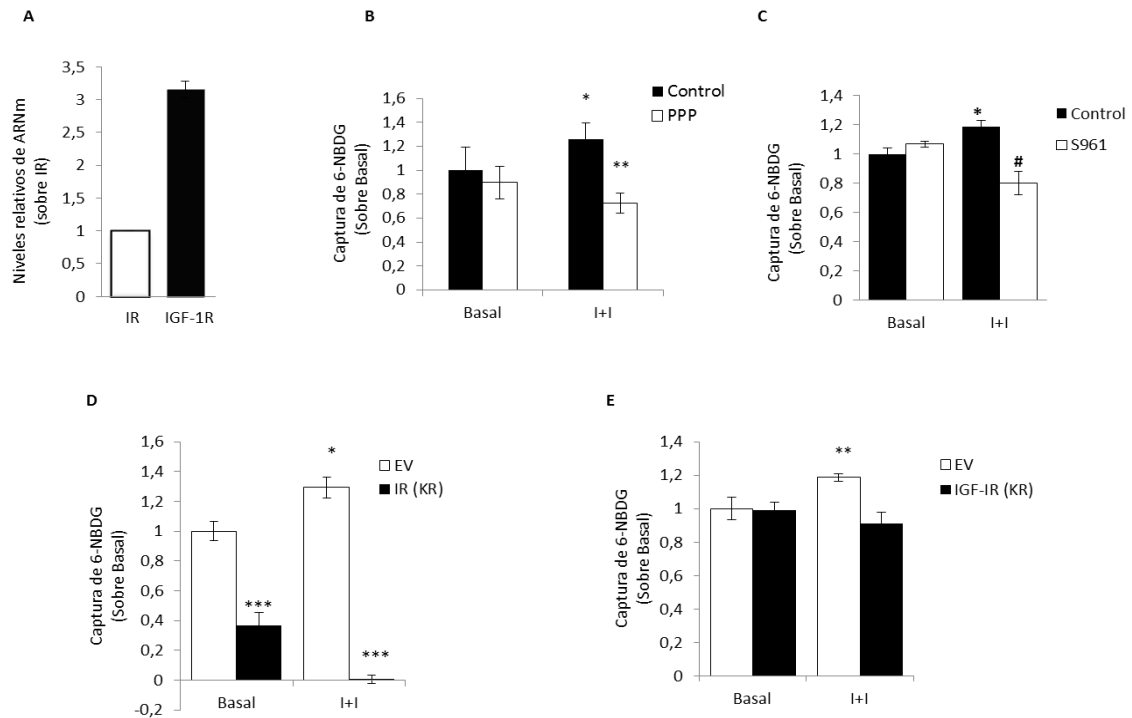


Figura R2. IR e IGF-IR regulan la captura de glucosa en astrocitos. **A**, Los astrocitos expresan tanto el receptor de Insulina (IR) como el receptor de IGF-I (IGF-IR) determinado por PCR cuantitativa (n=3). **B y C**, La captación de 6-NBDG estimulada por I+I se ve abolida por los antagonistas específicos de IGF-IR (PPP, B) ó IR (S961, C) (n=3 ; *p<0.05 vs control, **p<0.01 vs I+I and #p<0.05 vs I+I). **D y E**, El incremento en la captura de 6-NBDG se ve bloqueado en astrcitos que expresan la forma dominante negativa de IR (D, IR(KR)) ó de IGF-IR (E, IGF-IR(KR)) (n=6 *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

Como se ha reportado que el miembro 1 de la familia de transportadores de glucosa (GLUT1) es el principal transportador en las células que forman la barrera hematoencefálica, evaluamos si la acción de este estaba regulada por el efecto sinérgico de Insulina e IGF, así, utilizando un mutante de GLUT1 que presenta una secuencia Flag en la primera horquilla extra celular que permite su reconocimiento mediante anticuerpos específicos, utilizando citometría de flujo identificamos cuando este está presente en la membrana celular, observamos un aumento significativo de los niveles de GLUT1 en membrana solo cuando los astrocitos eran tratados con insulina e IGF-I (Figura R3 A). Así, cuando transfectamos un ARNhc para disminuir los niveles de GLUT1 en los astrocitos (Figura R3 B), vemos que el consumo de glucosa medido por la captación de 6-NBDG cae a niveles mínimos, confirmando que GLUT1 es el principal responsable de la captura de glucosa en los astrocitos (Figura R3 C).

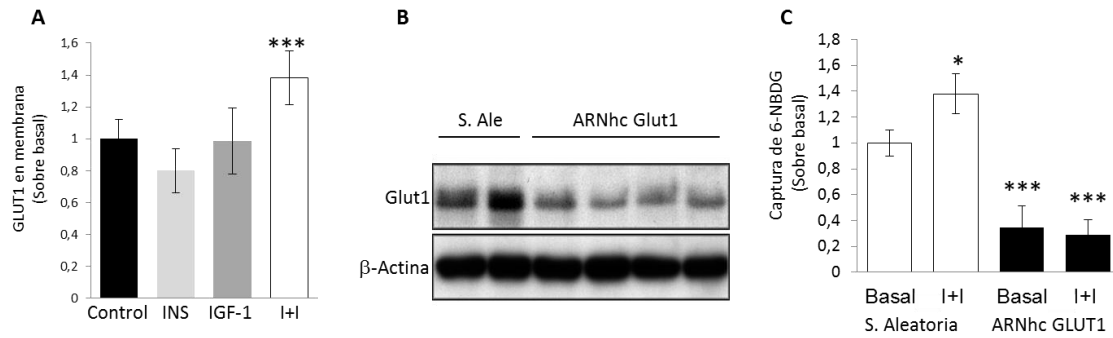


Figure R3: El transportador de glucosa 1 (Glut1) está involucrado en la acción cooperativa de insulina e IGF-I. **A**, La cantidad de Glut1 en membrana se ve aumentada significativamente en astrocitos por la acción combinada de I+I, pero no presentan efecto cada uno individualmente, determinado por citometría de flujo del Glut-1 exo-Tag. (n=6; ***p<0.001 vs control). **B**, Reducción de Glut1 por la interferencia con ARNhc determinada por western blot. **C**, La disminución de la expresión de Glut1 por ARNhc reduce drásticamente la acumulación de 6-NBDG en astrocitos e imposibilita los efectos estimulatorios de I+I (n=4 ; *p<0.05 and ***p<0.001 vs niveles basales control).

Como la glucosa que es captada por los astrocitos puede ser metabolizada de diferentes maneras, tanto para la producción de energía por parte de las células, como para la producción de otros metabolitos secundarios como lactato o glucógeno examinamos si el tratamiento con insulina e IGF-I de los astrocitos afecta la producción de estos metabolitos. Los niveles de lactato producido por los astrocitos parecen estar inalterados en las condiciones evaluadas, mientras que si probamos un estímulo del metabolismo astrocitario, como el glutamato que está reportado que es capaz de incrementar la producción del lactato (Heni et al., 2011) continúa haciéndolo en los astrocitos (Figura R4 A). Sin embargo, el glucógeno si se ve afectado, tanto por insulina, como se ha reportado previamente (Heni et al., 2011), y aún más cuando se administra tanto insulina como IGF-I (Figura R4 B).

Al evaluar las vías de señalización canónicas del eje Insulina / IGF-I, midiendo la fosforilación de AKT y MAPK, como indicadores de su activación ya que estas dos quinasas forman parte de estas, encontramos que fosfo-MAPK se encontraba aumentada sinérgicamente con el tratamiento de insulina e IGF-I (Figura R5 A) mientras que fosfo-AKT se mantenía en los niveles de activación inducida por cada ligando independientemente (Figura R5 B). Encontramos también que PKD, una isoforma atípica de PKC que puede actuar mediante su activación por MAPK regulando la translocación de Glut1 (Chen et al., 2002; Venge et al., 2003), se encuentra activada

sinérgicamente cuando se usa I+I (Figura R5 C) y cuya activación se encuentra mediada por la activación de MAPK (Figura R5 D). En adición a esto, cuando usamos un inhibidor específico de PKD, CID755673, la respuesta mediada por I+I que produce un aumento en el consumo de glucosa se encuentra bloqueada (Figura R5 E).

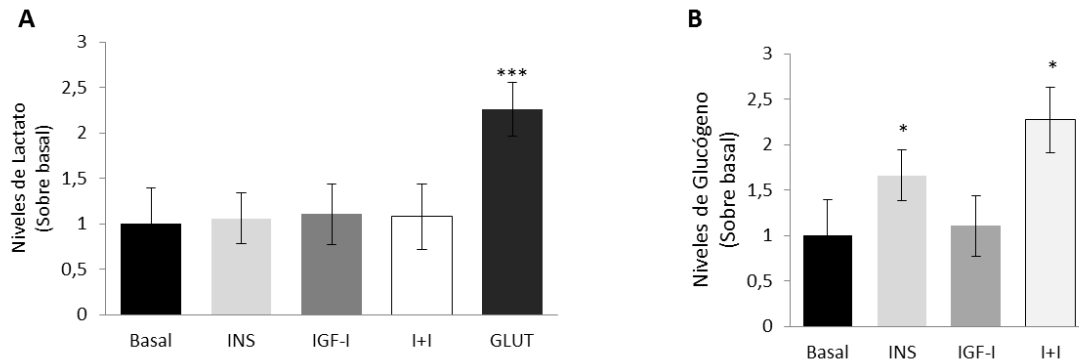


Figura R4. Regulación de productos metabólicos de la glucosa por Insulina e IGF-I. **A,** Los niveles de lactato en cultivos primarios de astrocitos no se ven alterados por insulina o IGF-I. Un control positivo usando astrocitos estimulados con glutamato se muestra (GLUT) (n=6, ***p<0.001 vs el control basal). **B,** Los niveles de glucógeno en astrocitos son estimulados por insulina e I+I (n=6; *p<0.05 vs control basal)

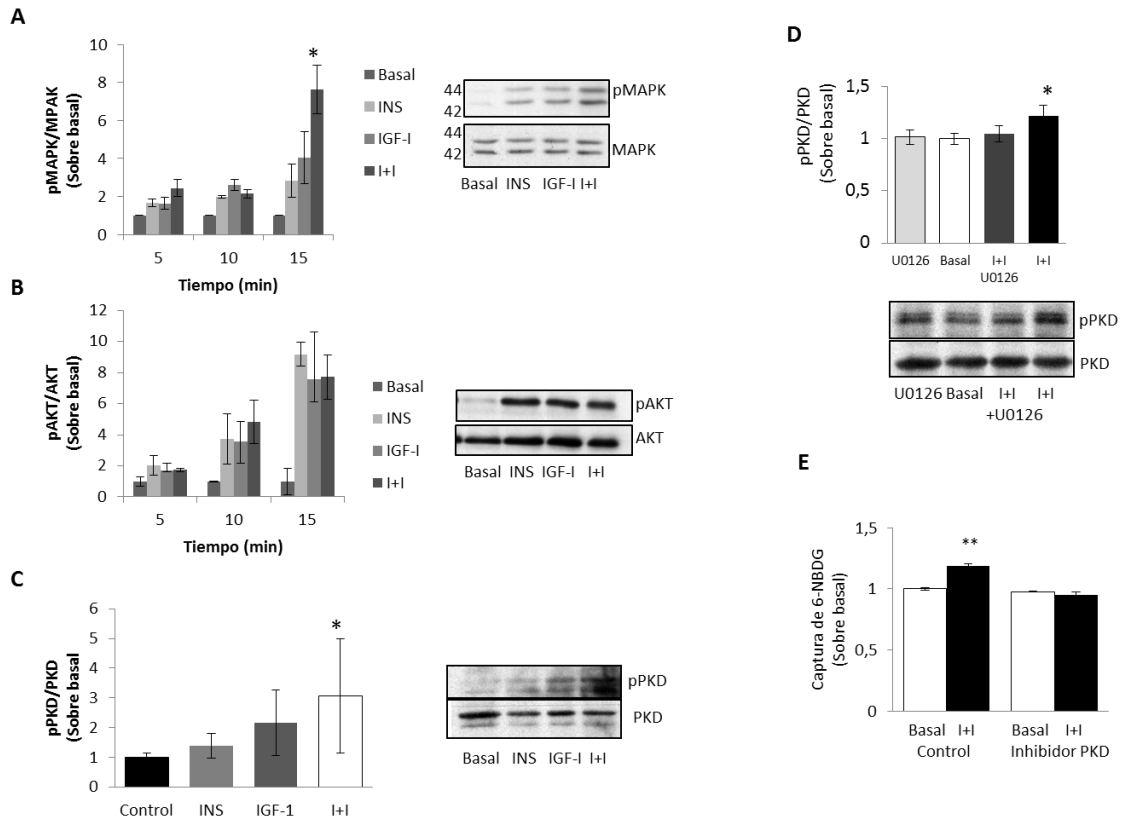


Figura R5. La cooperatividad entre Insulina e IGF-1 requiere la señalización mediada por MAPK/PKD, pero no por AKT. **A**, Niveles de fosforilación de MAPK₄₂₋₄₄ (pMAPK) que se encuentran aumentados solo cuando se añade Insulina e IGF-1 en astrocitos. Los niveles de pMAPK fueron normalizados utilizando los niveles de MAPK₄₂₋₄₄ total. Western blot representativo mostrando la estimulación tras 15 minutos de la fosforilación de MAPK₄₂₋₄₄ con insulina, IGF-1 o las dos. Los histogramas muestran la cuantificación la proporción de fosforilación de MAPK₄₂₋₄₄ contra la cantidad total de la proteína después de 5, 10 y 15 minutos de estimulación. (*p< 0.05 vs niveles basales). **B**, Niveles de fosforilación de AKT (pAKT) que no se ven afectados cuando se estimula con insulina, IGF-1 o las dos hormonas al mismo tiempo. Los niveles de pAKT fueron normalizados utilizando los niveles de AKT total. Western blot representativo mostrando la estimulación tras 15 minutos de la fosforilación de AKT con insulina, IGF-1 o las dos. Los histogramas muestran la cuantificación la proporción de fosforilación de MAPK₄₂₋₄₄ contra la cantidad total de la proteína después de 5, 10 y 15 minutos de estimulación. **C**, Los niveles de fosforilación de PKD se ven sinérgicamente aumentados con la adición de I+I. Western blot representativo después de 15 minutos de estimulación con Insulina, IGF-1 o los dos. El histograma presenta la cuantificación de la proporción entre pPKD y PKD total (*p<0.05 vs basal; n=3). **D**, El aumento en la fosforilación de PKD mediada por I+I depende de MAPK ya que, en la presencia del inhibidor de MAPK U0126 no se aprecia el incremento de actividad. Western Blot representativo después de 15 minutos de estimulación con I+I y con o sin el inhibidor U0126. El histograma muestra la cuantificación de la proporción entre la señal de pPKD y PKD total (*p<0.05 vs basal; n=3). **E**, El incremento en la captura de glucosa astrocitaria inducida por el tratamiento con I+I se ve bloqueado al tratar las células con el inhibidor de la activación de PKD CID 755673 (10 μM) (*p<0.05 vs basal control; n=6).

Regulación antagónica de la captación de glucosa en astrocitos por parte de los receptores del sistema IGF-I/Insulina

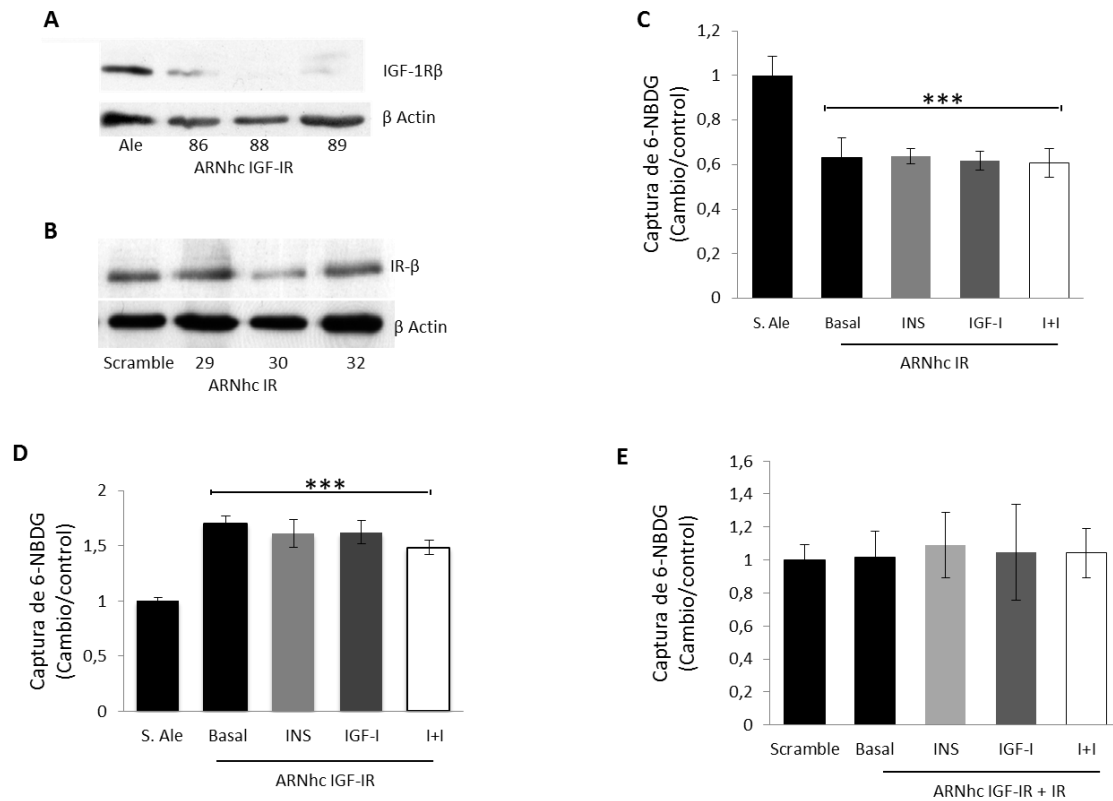


Figura R6. Regulación de la captación de glucosa en astrocitos por IR e IGF-IR. **A y B,** ARNhc de IR ó IGF-IR reduce sus niveles de expresión en astrocitos en cultivo. **C,** Disminución de los niveles de IR utilizando ARNhc en astrocitos inhibe la captación basal de glucosa e inhibe el efecto provocado por I+I (n=6; ***p<0.001 vs astrocitos tratados con ARNhc aleatorio). **D,** Disminución de los niveles de IGF-IR utilizando ARNhc en astrocitos provoca un aumento basal de la captación de 6-NBDG y evitando el efecto provocado por I+I (n=6; p<0.001 vs astrocitos tratados con ARNhc aleatorio). **E,** Interferencia de la expresión conjunta de IR e IGF-IR provoca la inhibición de los efectos provocados por I+I (n=6)

Al ver que la inhibición de la actividad tirosina quinasa provocaba efectos diferentes sobre la captación basal de glucosa en los astrocitos y ya que previamente se ha reportado que los receptores del sistema IGF-I/Insulina presentan actividad quinasa independiente de ligando (Boucher et al., 2010) decidimos inhibir la transcripción de los receptores del sistema utilizando ARNhc, se probaron tres diferentes secuencias que estaban dirigidas contra el ARNm del receptor de insulina y tres contra el ARNm del receptor de IGF-I, escogiéndose aquella que mostraba una mayor capacidad de

inhibición de la transcripción de los ARNm de los respectivos receptores (Figura R6 A y B).

Cuando medimos la captación de glucosa en astrocitos donde la transcripción del receptor de insulina estaba inhibida, encontramos una reducción de la captura, incluso a niveles basales (Figura R6 C), mientras que, en astrocitos donde los niveles del receptor de IGF-I están disminuidos, la captura de glucosa está aumentada considerablemente incluso sin estímulo de los ligandos insulina e IGF-I (Figura R6 D). Los efectos opuestos de los receptores sobre la captura de glucosa se evidencian cuando se inhibe la expresión de ambos receptores en astrocitos, cancelando los efectos producidos por la inhibición individual, pero a su vez, inhibiendo los efectos cooperativos de la acción de los dos ligandos igualando los consumos de glucosa a los niveles basales (Figura R6 E).

Los efectos independientes de ligando previamente sugeridos por otros (Boucher et al., 2010) pueden estar regulando esta respuesta, es así como al inhibir la expresión del receptor de insulina, encontramos una reducción de la expresión del ARNm del transportador de glucosa GLUT1 (Figura R7 A), a la vez que los niveles de GLUT1 en membrana se ven reducidos posiblemente como consecuencia de la disminución de la expresión del mismo (Figura R7 B). Esta observación es acorde a observaciones previas hechas en otras estirpes celulares donde la insulina es capaz de aumentar los niveles de expresión de GLUT1 (Barthel et al., 1999; Ding, Fehsenfeld, Murphy, Permert, y Adrian, 2000). Aunque la inhibición de la expresión del receptor de IGF-I no altera los niveles de expresión de GLUT1, si se aprecia un aumento de la cantidad de transportadores ubicados en membrana (Figura R7 B). Estos datos en conjunto sugieren un efecto inhibitorio sobre la captura de glucosa del receptor de IGF-I, reduciendo el número de transportadores de glucosa GLUT1 en membrana, mientras que el receptor de insulina muestra un efecto que favorece la captura de glucosa aumentando la expresión de GLUT1.

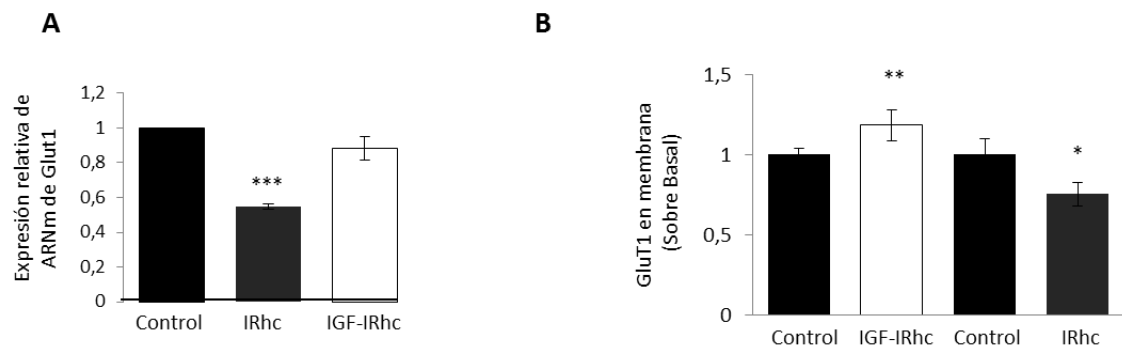


Figura R7. Regulación de la expresión y funcionamiento de Glut1 por parte de IGF-IR e IR. A, La inhibición de la expresión de IR, pero no de IGF-IR provoca una reducción en la expresión del ARNm de Glut1 determinado por PCR cuantitativa (n=3; ***p<0.001 vs astrocitos tratados con ARNhc aleatorio). **B,** De esta manera, la inhibición de la expresión del receptor de IGF-IR provoca un aumento del Glut1 en membrana, mientras que la inhibición de la expresión de IR provoca una reducción del Glut1 translocado en membrana determinado por citometría de flujo de Glut1 exo-flag. (n=5 ; *p<0.05, **p<0.01 vs astrocitos tratados con ARNhc aleatorio).

Efectos reguladores del sistema IGF-I/Insulina sobre la captación de glucosa *In Vivo*

Para comprobar la significancia biológica de las observaciones previamente descritas realizamos una serie de experimentos *In Vivo*. Primero establecimos si un aumento de los niveles de IGF-I o de Insulina eran capaces de aumentar los niveles de activación de sus receptores, medido esto como los niveles de fosforilación del receptor, para esto inyectamos ratones con Insulina o IGF-I. En estas condiciones detectamos que efectivamente, en la corteza somatosensorial tanto IGF-I como Insulina eran capaces de aumentar la fosforilación de sus respectivos receptores. (Figura R8 A y B). De forma similar, evaluamos si un protocolo de estimulación somatosensorial a través de la estimulación de las vibrisas es capaz de producir un aumento de los niveles de IGF-I o Insulina en la corteza y por ende aumentar los niveles de activación de los receptores. Así, tras un protocolo de estimulación unilateral encontramos una mayor activación en la corteza somatosensorial del hemisferio contralateral de ambos receptores (Figura R9 A y B).

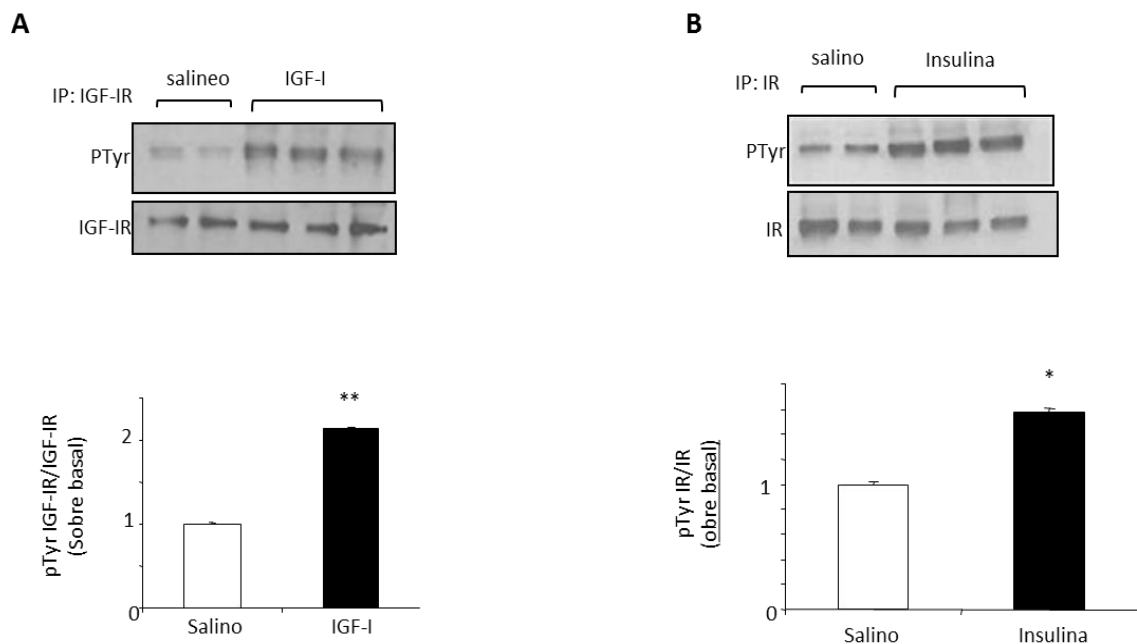


Figura R8. Estimulación de la actividad de los receptores de IGF-I e Insulina en la corteza somatosensorial mediada por sus ligandos. A. Ratones silvestres fueron inyectados con IGF-I (30µg/ml) o salino. Después de la extracción, las cortezas somatosensoriales fueron lisadas e inmunoprecipitadas con en anti IGF-IR conjugado a agarosa. Los niveles de fosforilación fueron medidos usando el anticuerpo monoclonal anti pTyr 4G10. En los histogramas se muestra el aumento de los niveles de fosforilación en la corteza tras la inyección de IGF-I (n=8, **p<0.01). **B.** Similar al caso anterior, animales silvestres fueron inyectados con Insulina (5U/ml) o salino. En este caso se inmunoprecipitó el receptor de insulina usando el anticuerpo sin conjugar. El histograma muestra el aumento en la activación del receptor de insulina después de la inyección de esta (n=8, *p<0.05).

Después, teniendo en cuenta que tras la estimulación somatosensorial, la captura de glucosa se encuentra principalmente mediada por los astrocitos (Chuquet et al., 2010), inyectamos ratones con partículas lentivirales que expresan tanto el ARNhc contra el IGF-IR, así como contra IR en un hemisferio mientras en el lado contralateral inyectamos ARNhc aleatorio (Figura R10A), controlando la infección con partículas lentivirales que expresan EGFP (Figura R10B), usando imágenes tomografía de emisión de positrones de ¹⁸F-FDG, con el objetivo de establecer el consumo de glucosa cerebral (Figura R10C). Bajo condiciones de no estimulación, los dos hemisferios no muestran una diferencia apreciable, mientras que, bajo condiciones de estimulación somatosensorial, mediante la estimulación bilateral de las vibras, la región de la corteza donde se inyectado el IGF-IRhc presentaba un consumo mayor comparado con

el lado en el que se han inyectado partículas lentivirales de ARNhc aleatorio, Sin embargo, este comportamiento no se ve en la corteza somatosensorial de los hemisferios comportamiento que no se ve en cortezas donde se ha inyectado IRhc Co-localización de partículas inmunoreactivas (Figura R10D).

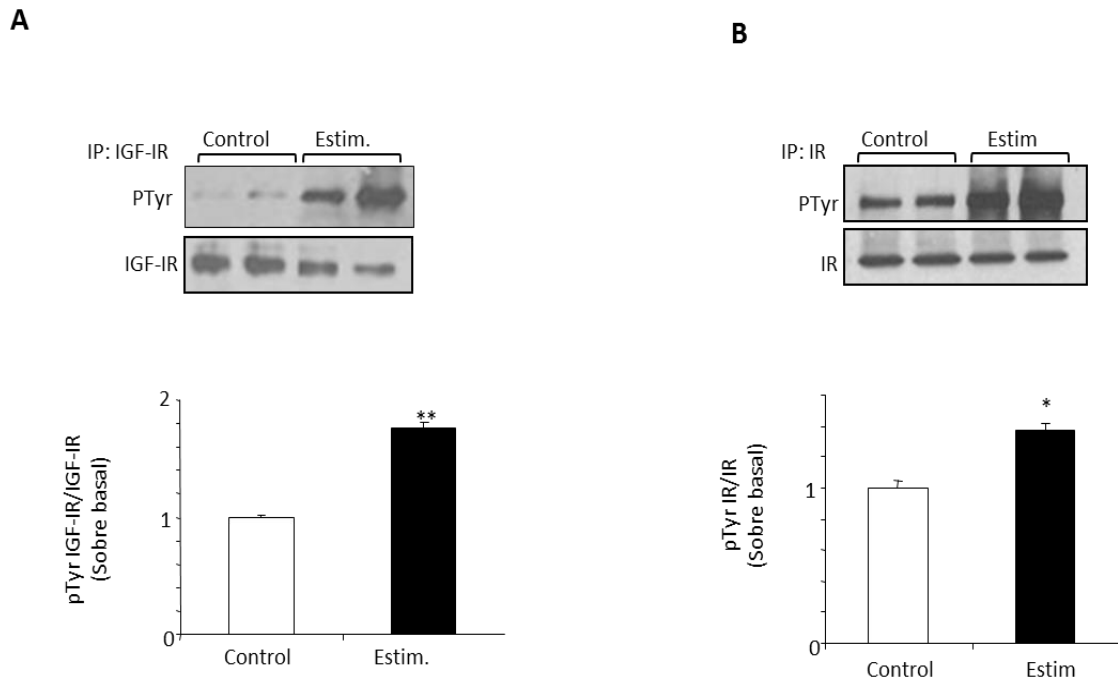


Figura R9. Estimulación de la actividad de los receptores de IGF-I e Insulina tras la estimulación de las vibrisas. **A.** Ratones silvestres fueron estimulados unilateralmente con impulsos de 50 μ A con una frecuencia de 5 Hz. Después de la extracción, las cortezas somatosensoriales fueron lisadas e inmunoprecipitadas con en anti IGF-IR conjugado a agarosa. Los niveles de fosforilación fueron medidos usando el anticuerpo monoclonal anti pTyr 4G10. En los histogramas se muestra el aumento de los niveles de fosforilación en la corteza tras la estimulación (n=10, **p<0.01). **B.** Similar al caso anterior, animales silvestres fueron estimulados con el mismo protocolo. En este caso se inmunoprecipitó el receptor de insulina usando el anticuerpo sin conjugar. El histograma muestra el aumento en la activación del receptor de insulina después de la estimulación (n=10, *p<0.05).

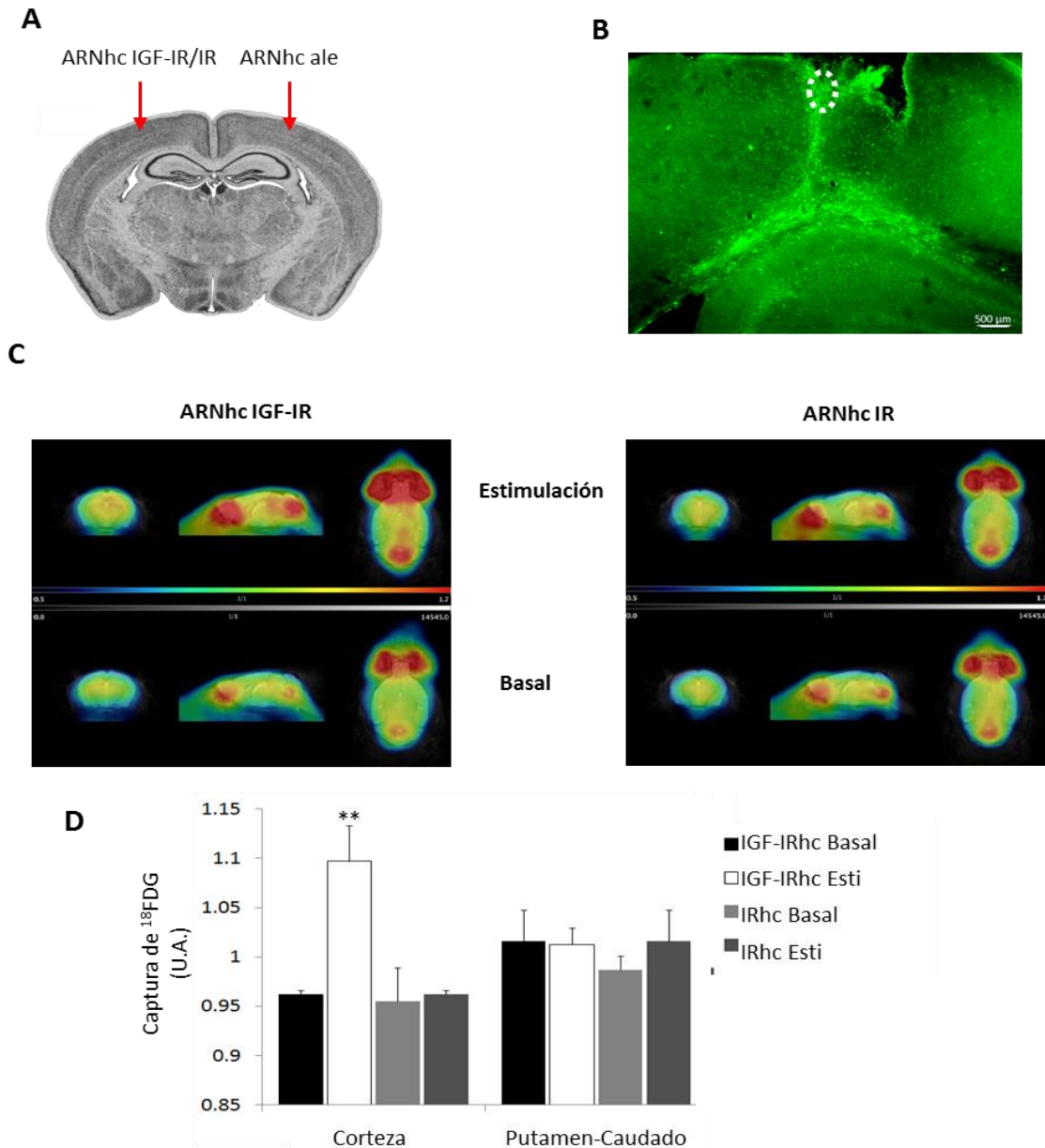


Figura R10. Análisis de la contribución de IGF-IR e IR a la captura cerebral de glucosa usando PET. **A** Ratones adultos fueron inyectados con partículas lentivirales que inducían la expresión de ARNhc contra IGF-IR ó IR en un hemisferio cerebral mientras que partículas que inducían la expresión de ARNhc aleatorio fueron inyectadas en el lado contralateral. **B**, Imagen representativa de un cerebro control donde se han inyectado partículas lentivirales que inducen la expresión de GFP para mostrar la difusión de la infección. El área demarcada denota el lugar seleccionado para hacer el análisis microscópico. **C**, Imágenes representativas de los ensayos PET realizados en animales inyectados con ARNhc contra el IR o IGF-IR bajo condiciones basales y durante la estimulación somatosensorial. **D**, Animales que han sido inyectados con partículas lentivirales que inducen la expresión de ARNhc contra el IGF-IR muestran un aumento en la captura de glucosa después de ser sometidos a la estimulación somatosensorial bilateral que se ve abolida en animales inyectados con partículas contra IR. Se muestra la captación en un área no afectada por la estimulación somatosensorial para mostrar la especificidad del estímulo. (** $p < 0.05$ vs basal $n=3$)

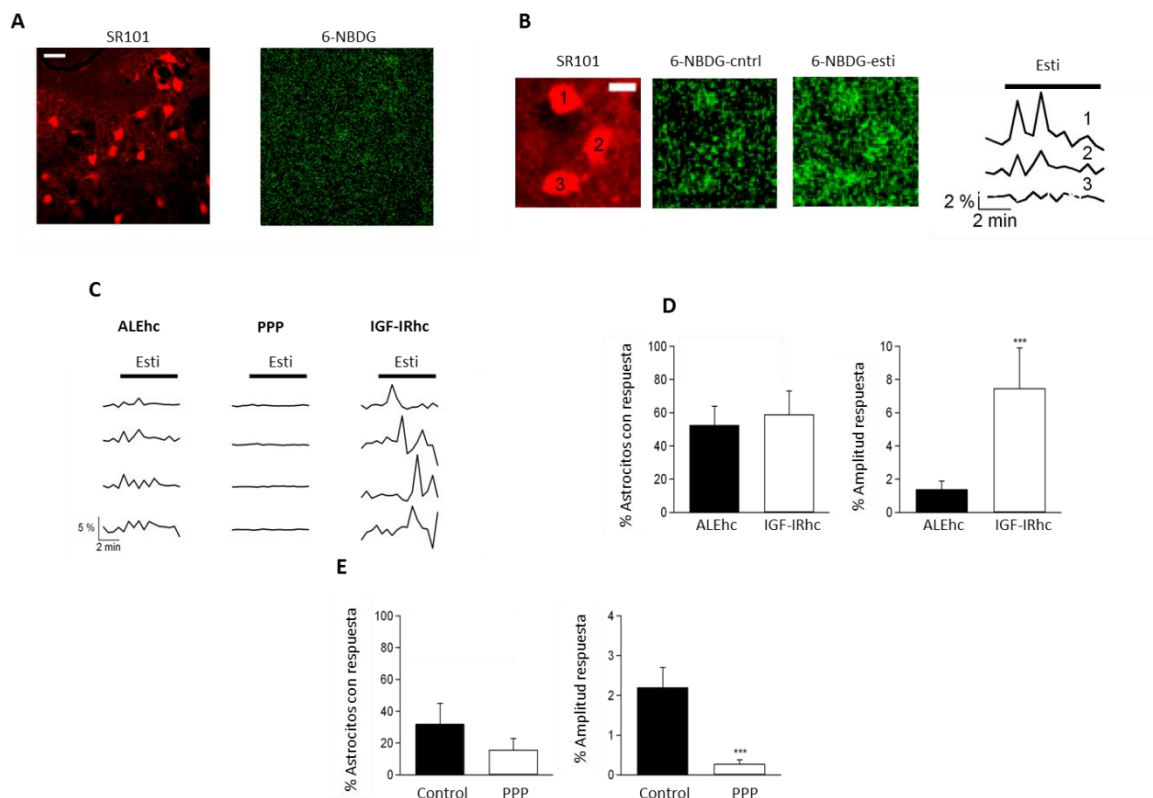


Figura R11. Modulación de la captura de glucosa cerebral por el IGF-IR. **A**, En rojo, imagen representativa de los astrocitos de la corteza somatosensorial marcados con SR101, en verde, captura de 6-NBDG en el mismo campo de la izquierda en condiciones basales. **B**, Mediciones representativas de tres astrocitos marcados con SR101 (1,2 y 3 en la imagen izquierda) acumulando 6-NBDG antes (imagen del medio) y después de la estimulación de las vibrisas (imagen de la derecha). Los perfiles de estimulación de cada astrocito son mostrados a la derecha. **C**, Mediciones representativas de diferentes astrocitos en animales inyectados con partículas lentivirales de ARNhc aleatorio, con infusión del inhibidor específico de IGF-IR, PPP o con inyección de partículas lentivirales de IGF-IRhc. **D**, Los ratones inyectados con IGF-IRhc no muestran cambios en el número de astrocitos que responden al estímulo (histograma de la izquierda, pero si un incremento considerable en la captura de 6-NBDG (histogramas de la derecha, *** $p < 0.001$ vs ARNhc aleatorio). **E**, La cantidad astrocitos corticales tratados con PPP no se diferencia de un tratamiento con vehículo (histogramas de la izquierda), sin embargo, la captura de 6-NBDG se ve ampliamente disminuida (histogramas de la derecha, *** $p < 0.001$)

Estos datos sugieren que la reducción de los niveles de IGF-IR aumentan la captación de glucosa mientras que la disminución de los niveles de IR no presenta un cambio aparente, es por esto que, y para solventar las limitaciones espaciales de los estudios PET (Prieto et al., 2011) , realizamos un análisis “in vivo”, usando microscopía de escaneo laser confocal, usando el marcador vital sulforodamina 101, que presenta la particularidad de ser capturado específicamente por los astrocitos (Nimmerjahn et al.,

2004) (Figura R11A); así, una vez administrado el 6-NBDG seguido de la estimulación de las vibrisas, animales inyectados con el IGF-IRhc muestran una captura de glucosa aumentada comparados con animales donde se ha inyectado ARNhc aleatorio (Figura R11 C y D). A su vez, el papel dual del receptor de IGF-I se demuestra al bloquear farmacológicamente la activación de este, mediante la administración del análogo específico PPP, en este caso, no se evidencia un cambio significativo en la captación de 6-NBDG en los astrocitos después del protocolo de estimulación somatosensorial. (Figura R11 C y E) lo que demuestra el papel dependiente de ligando del IGF-IR en la captación de glucosa.

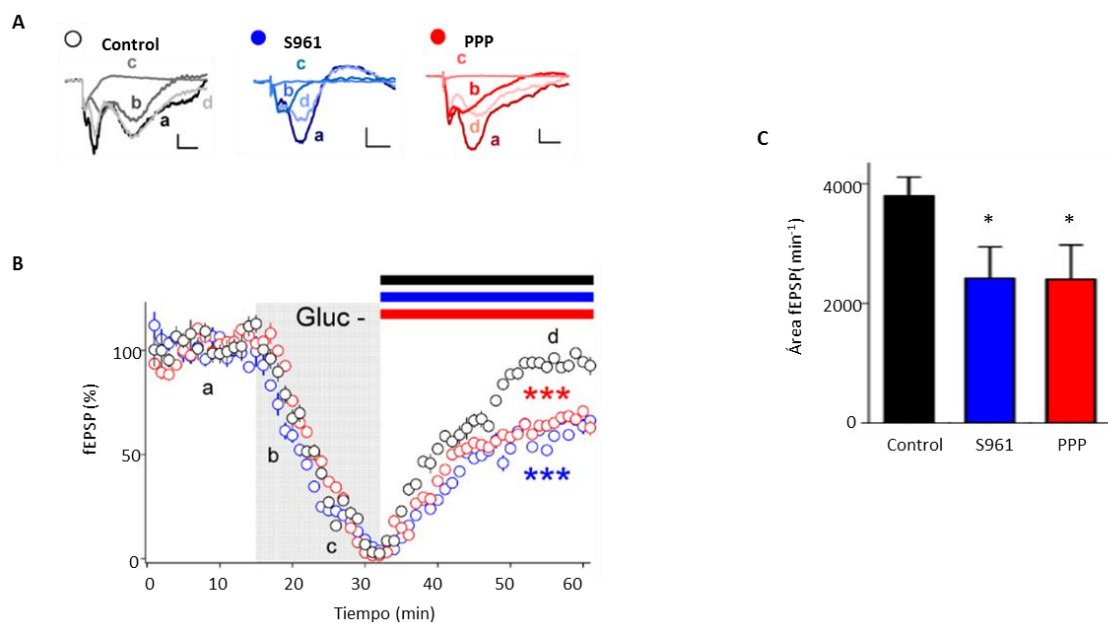


Figura R12. La activación del receptor de Insulina y de IGF-I regula la depression de la transmisión sináptica producida por la hipoglicemia. A. Perfiles representativos de fEPSP en respuesta a la remoción de la glucosa en el control (negro), en presencia de S961 (azul) o PPP (rojo). Se muestran perfiles antes de la remoción de glucosa (basal, a), durante el efecto hipoglucémico (b), durante el plató hipoglucémico (c), y durante la fase de recuperación con la adición de glucosa al ACSF (d). **B.** Evolución temporal de los cambios de pendiente de los fEPSP bajo condiciones de hipoglicemia (sombreado gris) en el control (puntos blancos), en presencia de PPP 10 μ M (puntos rojos) ó de S961 10 nM (puntos azules) (***) $p < 0.001$ $n = 10, 10$ y 12 rodajas para control, PPP y S961 respectivamente). **C.** Cambios relativos de área bajo las curvas de los fEPSP durante la recuperación con ACSF con glucosa (barra negra, control) más PPP (barra roja) o más S961 (barra azul) (* $p < 0.05$).

Como se ha descrito que durante periodos de actividad neuronal continuada, donde la demanda energética es superior a la capacidad de captación de glucosa por parte de las neuronas, son los astrocitos los principales proveedores energéticos de las

neuronas (Nagase, Takahashi, Watabe, Kubo, y Kato, 2014), utilizamos rodajas corticales que son sometidas a hipoglicemia en la presencia de inhibidores farmacológicos de la activación de IGF-IR e IR (Figura R12 A y B). En este caso, los potenciales excitatorios postsinápticos (fEPSP) decaen después de retirar el suplemento de glucosa, sin embargo, mientras que una vez que se suplementa nuevamente el ACSF con glucosa el fEPSP se recupera en la condición control, cuando se añaden los inhibidores específicos de los receptores de insulina o de IGF-I, S961 o PPP respectivamente, la recuperación de los fEPSP se mostró significativamente reducida (Figura R12 B). Estas observaciones concuerdan con los hallazgos en cultivos y apoyan el argumento que la activación de ambos receptores es requerida para el correcto funcionamiento astrocitario con el fin de proveer eficientemente a las neuronas durante el incremento de sus requerimientos energéticos.

Mecanismos de regulación de la captura de glucosa en el sistema Insulina/IGF-I/Glut1

Ya que la translocación de GLUT1 es promovida por I+I, buscamos establecer en mayor detalle los mecanismos por los cuales sucede esto. En este sentido es llamativo para nosotros la proteína GIPC (GAIP-interacting protein, C terminus), también conocida como synectina o GLUT1CBP (Glut1 C terminal binding protein), que ha sido reportada previamente como interactuante con IGF-IR, pero no con IR (Ligensa et al., 2001). GIPC es una proteína de andamiaje, que participa principalmente en el tráfico de proteínas y que es capaz de unirse a varias de estas a través de su dominio PDZ, por lo cual, la interacción simultánea entre GIPC, GLUT1 e IGF-IR es posible debido a la capacidad de oligomerización de GIPC (Katoh, 2013). Así, encontramos que GIPC es capaz de interactuar con IGF-IR y GLUT1 como estaba previamente descrito a través de ensayos de co-inmunoprecipitación, y más aún, se demuestra la interacción de IGF-IR y GLUT1 (Figura R13 A). Es igualmente notable el hecho que GIPC y GLUT1 no interactúan con IR. El ensayo de ligación por proximidad confirma la interacción entre Glut1 e IGF-IR en astrocitos en cultivo (Figura R13 B), principalmente en áreas cercanas al núcleo.

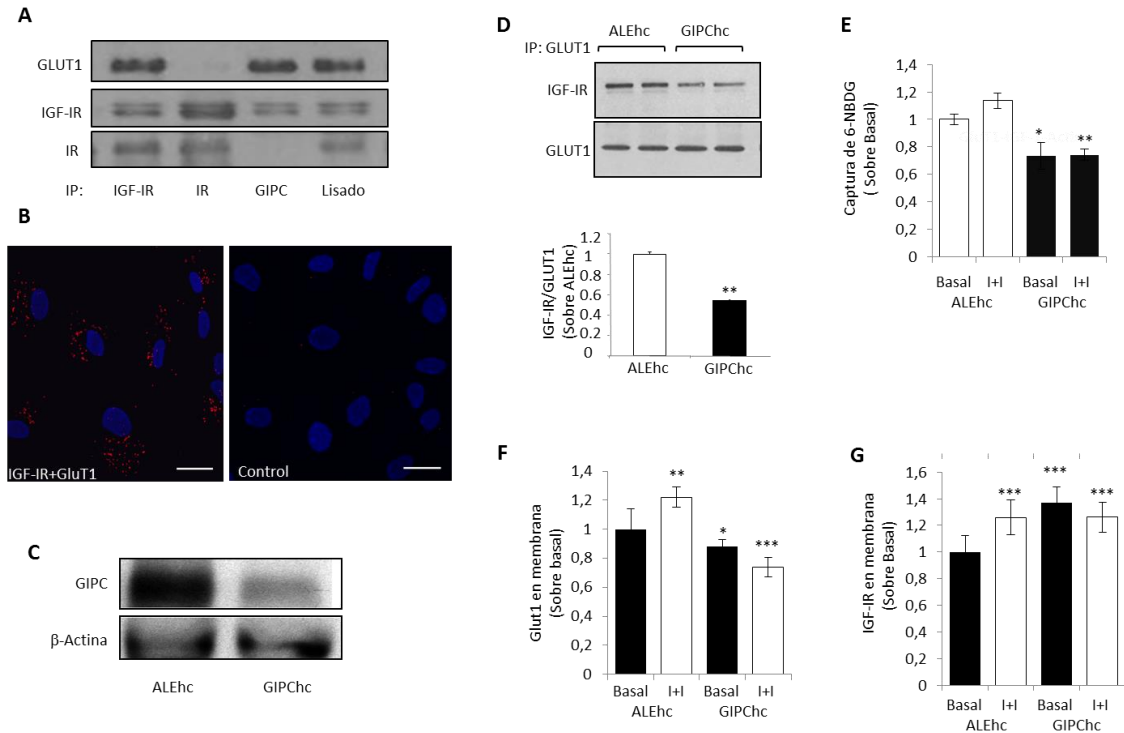


Figura R13. Interacción entre IGF-IR y GLUT1 a través de GIPC. **A**, Ensayos de co-inmunoprecipitación que muestran la interacción entre IGF-IR, GLUT1 y GIPC, mientras que IR solamente interactúa con IGF-IR. **B**, Ensayo de ligación por proximidad que muestra la interacción entre IGF-IR y GLUT1, puntos rojos en la imagen que no se presenta cuando en el control se omite el anticuerpo contra IGF-IR. La tinción de los núcleos con DAPI es mostrada en azul. **C**, Reducción en la expresión de GIPC en astrocitos tratados con ARNhc contra GIPC. **D**, La reducción de los niveles de GIPC mediante el uso de un ARNhc produce una disminución de los niveles de interacción en astrocitos mostrado por co-inmunoprecipitación, el histograma muestra la cuantificación de la disminución de la interacción expresada como la razón entre la señal de IGF-IR contra la señal de GLUT1 medidas mediante análisis densitométrico. (n=4; **p<0.01vs razón en astrocitos tratados con ALEhc). **E**, La reducción de la expresión de GIPC reduce la captura de 6-NBDG y bloquea el efecto de I+I en astrocitos de rata, medida por citometría de flujo (n=6; *p<0.05 y **p<0.01) **F**, La reducción de GIPC también produce unos niveles menores de translocación de GLUT1 a membrana medido mediante citometría de flujo inhibiendo el efecto de I+I (n=6; *p<0.05, **p<0.01 y ***p<0.001 vs niveles basales). **G**, La reducción de GIPC también produce un efecto sobre el IGF-IR en membrana, aumentando su nivel en condiciones basales sin ningún incremento posterior al tratamiento con I+I (n=6; ***p<0.001)

Así, para determinar el papel de GIPC en la interacción entre IGF-IR y GLUT1, utilizamos un ARNhc contra GIPC que reduce sus niveles de expresión en astrocitos transfectados (Figura R13 C). En estos astrocitos, la cantidad de IGF-IR que se une a GLUT1, evaluada por co-inmunoprecipitación, se ve notablemente reducida (Figura R13 D). De igual

manera, y como GIPC es requerido para la eficiente translocación de GLUT1 a membrana (Reed et al., 2005), la reducción de la expresión de GIPC disminuye los niveles de GLUT1 en membrana, establecido por citometría de flujo, inhibiendo a su vez los efectos en la translocación provocados con el tratamiento de I+I (Figura R13 E) y por consiguiente, la captura de glucosa también se ve reducida en estos astrocitos inclusive cuando son tratados con I+I (Figura R13 F). De otro lado, en estos astrocitos, los niveles de IGF-IR movilizados hacia la membrana se ven incrementados y estos niveles no se ven alterados por el tratamiento con I+I (Figura R13 G) llegando a niveles similares a los provocados por el tratamiento de I+I en astrocitos transfectados con un ARNhc aleatorio. Estas observaciones opuestas en el comportamiento de la localización en membrana, tanto de GLUT1 como de IGF-IR cuando los niveles de GIPC se ven disminuidos soportan la hipótesis por la cual GIPC participa en el tráfico de estas proteínas de manera inversa (Ligensa et al., 2001; Reed et al., 2005).

Por último, con el fin de examinar como se establece la dinámica de tráfico de la proteínas cuando se produce la estimulación por I+I, realizamos un análisis cuantitativo de las partículas de IGF-IR, GIPC y GLUT1 inmunopositivas presentes en los astrocitos (Figura R14 A y B). Con estas imágenes se realizó a su vez un estudio de co-localización de partículas (Figura R14 A y B). Al hacer esto detectamos una serie de cambios en los números de partículas después del tratamiento con I+I con respecto al tratamiento con Insulina o IGF-I solamente. La adición de insulina llamativamente reduce todo tipo de partículas con respecto a los astrocitos sin tratar, mientras que la adición de IGF-I modifica ligeramente algunas de ellas, sin embargo, la adición de I+I aumenta las partículas de IGF-IR y el número de partículas que co-localizan entre IGF-IR/GLUT1, IGF-IR/GIPC e IGF-IR/GLUT1/GIPC (Figura R14 B). De acuerdo a lo establecido anteriormente y con el fin de ver el papel de la señalización de MAPK/PKD con la adición de I+I inhibimos la activación de PKD con el inhibidor CID755673, en este caso, junto con la adición de I+I, se produce una drástica alteración de la movilización de partículas que se da con la adición de I+I (Figura R14 B). Conjuntamente, estas observaciones son compatibles con el concepto que la activación de los receptores de insulina e IGF-I aumenta la captura de glucosa en astrocitos a través de la activación de la vía de señalización MAPK/PKD que a su vez estimula el reciclaje del receptor de IGF-I

y la translocación de GLUT1 hacia la membrana plasmática, modulando de esta forma la interacción entre GIPC e IGF-IR a través der GIPC.

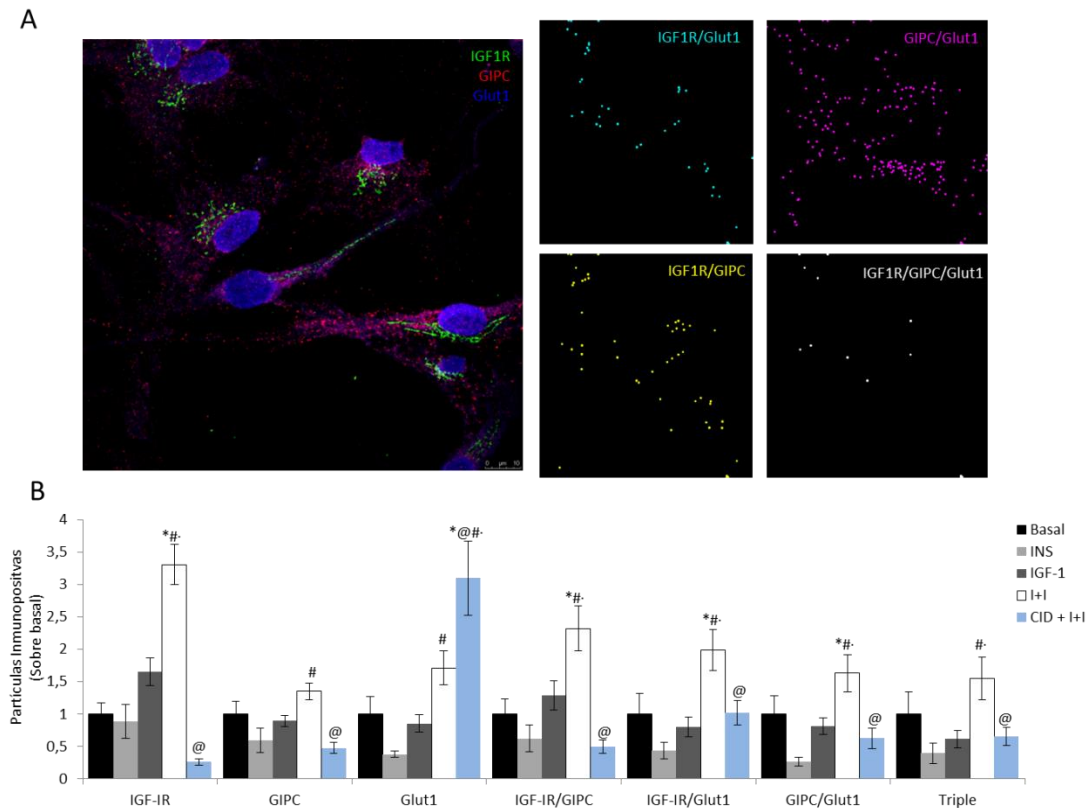
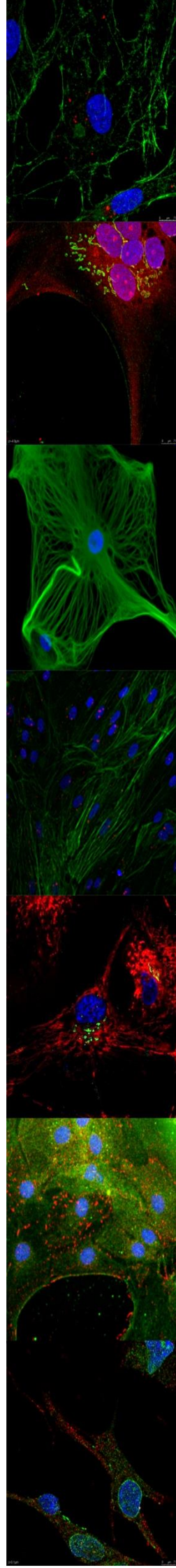


Figura R14. I+I Modula la translocación de GLUT1, GIPC e IGF-IR en astrocitos. A, A la izquierda, proyección máxima de 12 imágenes de microscopía confocal mostrando una tinción para IGF-IR (verde), GIPC (rojo) y GLUT1 (Azul) en astrocitos cultivados bajo condiciones basales, llama la atención el marcaje perinuclear de GLUT1, así como de IGF-IR, mientras que GIPC muestra un marcaje principalmente citoplasmático. La partículas con tinción única, doble o triple fueron cuantificadas, a la derecha, imágenes de las partículas con doble o triple tinción en un solo plano de la imagen anterior, codificadas en diferentes colores y ampliadas 1 pixel cuadrado con el fin de facilitar su visualización. B, Histogramas que muestran la cuantificación de partículas inmunopositivas. La adición de I+I estimula la cantidad relativa de partículas de IGF-IR, , IGF-IR/GIPC, IGF-IR/GLUT1 y las triples colocalizaciones comparado con el tratamiento basal o con insulina o IGF-I solamente, mientras que el tratamiento con CID 755673, inhibidor de PKD, produce una alteración de la movilización de partículas provocada por I+I. El número de células analizadas fué de 22 células para el control, 28 para insulina, 33 para IGF-I, 20 para I+I y 32 para CID + I+I. (*, #, · y @, $p < 0.05$ Vs Basal, Insulina, IGF-I y I+I respectivamente)

DISCUSIÓN



Discusión

Históricamente, la insulina ha recibido mayor atención por la capacidad de esta de regular la homeostasis periférica de glucosa y la aparente captura independiente de insulina de glucosa por parte del cerebro ha llevado a considerar que el cerebro es un sensible a la glucosa. Sin embargo, la alta concentración de receptores de insulina presentes a través de todo el tejido cerebral (Havrankova, Roth, y Brownstein, 1978; Sara et al., 1982) además del hallazgo de altos niveles de insulina en el cerebro (Dorn et al., 1983; Havrankova, Schmechel, Roth, y Brownstein, 1978) han llevado a replantear esta idea por lo que numerosos estudios se han llevado a cabo con el fin de encontrar el origen de la insulina presente en el SNC (de la Monte, Tong, Bowling, y Moskal, 2011; Schechter et al., 1992). Aunque el papel de la insulina en el cerebro no se encuentra claramente definido, es obvio que la insulina es una hormona que se encuentra involucrada en un amplio rango de condiciones fisiológicas y patofisiológicas, entre las que se encuentran efectos en la reproducción, la ingesta de comida, la capacidad cognitiva a su vez que efectos neuromodulatorios y neuroprotectivos (Figura D1) (Ghasemi, Haeri, Dargahi, Mohamed, y Ahmadiani, 2013).

A pesar que IGF-I es una hormona que tiene propiedades neuroprotectoras que afectan a muchas células del cerebro (Carro y Torres-Alemán, 2006; Russo et al, 2005; Dudek et al, 1997), y que es muy abundante en el cerebelo durante la etapa adulta, pocos trabajos se han realizado en busca de las funciones fisiológicas del IGF-I en el SNC. Sin embargo, se ha visto que disfunciones en el sistema IGF-I se encuentran relacionadas con patologías en las cuales se presenta una alteración del metabolismo de la glucosa cerebral A su vez, en varias ocasiones se ha reportado un efecto en la regulación de la glucosa cerebral por parte del IGF-I (Bondy y Cheng, 2002; Cheng et al., 2000; Gutiérrez-Ospina et al., 1997), sin embargo, los mecanismos por los cuales se evidenciaba este efecto se encontraban casi sin explicación. Todas estas consideraciones plantean que el sistema IGF-I podría estar implicado en el metabolismo de la glucosa cerebral.

Este trabajo se centra en encontrar el papel de IGF-I y la insulina en el metabolismo de la glucosa cerebral. La entrada de la glucosa al SNS se da principalmente a través de los transportadores de glucosa GLUT1, presentes tanto en las células del endotelio vascular cerebral, como en los astrocitos y debido a esto, es esperable algún tipo de modulación de este si existiese alguna regulación por parte del eje IGF-I/insulina, más teniendo en cuenta la regulación clásica de las vesículas de GLUT4 en los sistemas periféricos por parte de la insulina (Rivera et al., 2005) o la evidencia de la regulación del GLUT1 por parte del IGF-I en algunos tumores (Barthel et al., 1999). En esta tesis se presentan resultados que ayudan a aclarar el mecanismo por el cuál insulina y el IGF-I actúan simultáneamente sobre los astrocitos, promoviendo así la captura de glucosa cerebral.

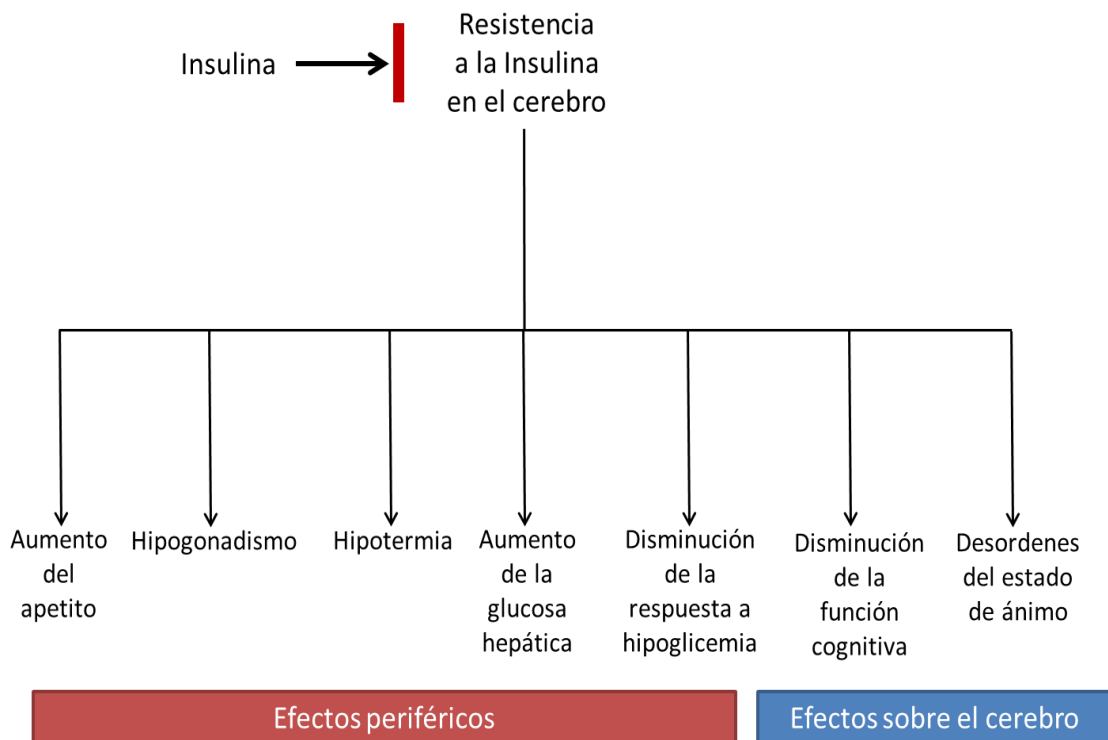


Figura D1. Efectos de la insulina cerebral. Efectos de la señalización de en el cerebro sobre las funciones centrales y periféricas, La resistencia cerebral a insulina resulta en un aumento de consumo de comida, hipogonadismo hipotalámico, hipotermia, disminución del tejido adiposo blanco aumento de la producción de glucosa hepática, alteraciones en la respuesta a hipoglicemia además de alteraciones de la función neuronal.

Insulina e IGF-I conjuntamente promueven la captación de glucosa astrocitaria

Como se ha demostrado, la acción conjunta de la insulina y el IGF-I promueven la captación de glucosa en cultivos primarios de astrocitos, sin embargo, los niveles de insulina no varían notablemente en el tiempo en SNS (Laron, 2009) por lo que se carecería de una explicación para las variaciones en el estímulo provocado por el sistema, sin embargo, el acoplamiento cerebro-vascular permite a la Insulina e IGF-I alcanzar el cerebro desde el fluido sanguíneo en circulación (Nishijima et al., 2010), para una vez allí, cooperar proveyendo un mecanismo para el correcto aprovisionamiento de glucosa de acuerdo a la actividad neuronal. Así, el IGF-I accede al cerebro bajo demanda (Nishijima et al., 2010) y junto a la insulina que atraviesa la barrera hematoencefálica (Baura et al., 1993) de acuerdo al nivel de perfusión cerebral (Hom, Egleton, Huber, y Davis, 2001), promoverían la captura de glucosa astrocitaria, manteniendo los niveles de glucosa almacenada en el cerebro. De esta forma, los niveles fisiológicos de insulina pueden regular el metabolismo de glucosa cerebral.

Los efectos específicos sobre los astrocitos de I+I son compatibles con las observaciones en neuronas carentes de receptor de insulina (Schubert et al., 2004), en las cuales no se evidencia un efecto sobre la captura de glucosa ya que la activación cruzada del receptor de insulina por IGF-I (Denley et al., 2007) no podría explicar el efecto cooperativo existente ya que el receptor de IGF-I es requerido para la acción mostrada por I+I (Figura D2).

Notablemente importante también es el hecho que se promueva la síntesis de glucógeno en astrocitos tratados con (Hamai, Minokoshi, y Shimazu, 1999), el tratamiento con I+I hace más pronunciado este aumento, indicando que, posiblemente, el destino del aumento de la captación de glucosa provocada por I+I este destinado a reestablecer los depósitos de glucógeno que se han gastado en consecuencia de la activación neuronal (Nagase, Takahashi, Watabe, Kubo, y Kato, 2014). Esta apreciación se ve reforzada por el hecho que el bloqueo de la señalización del eje insulina/IGF-I muestre una disminución de la capacidad de disparo de la

neuronas después de haber sido sometidas a hipoglicemias, impidiendo la correcta re adecuación energética por parte del sistema.

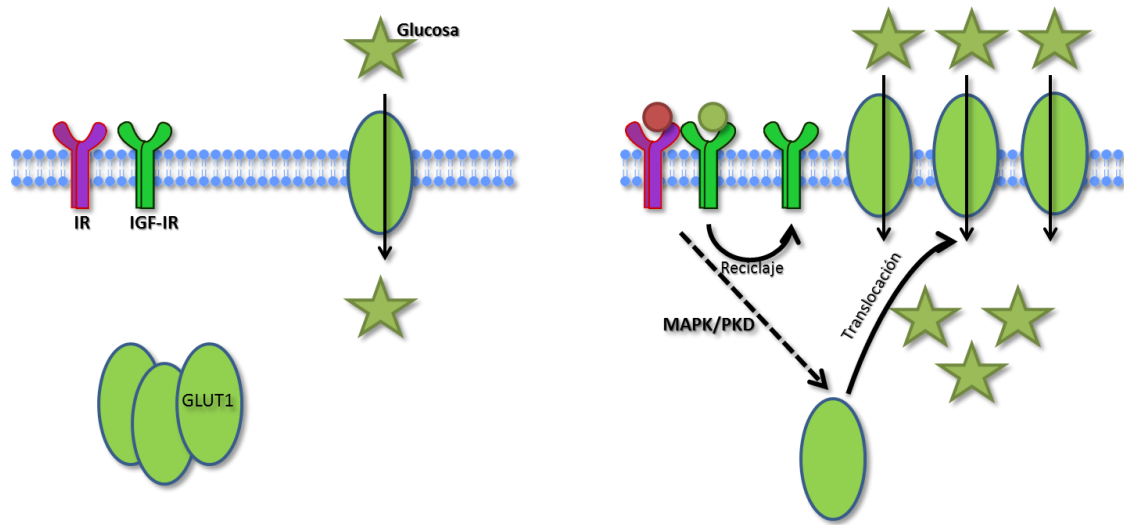


Figura D2. Modelo de acción de IGF-I e insulina sobre la translocación de GLUT1. En el modelo propuesto en estados basales, a la izquierda, el suministro de glucosa a los astrocitos viene dado por el GLUT1 independiente de I+I, una vez ocurre un evento estimulador, a la derecha, la unión de IGF-I e insulina a sus receptores provoca la activación de la vía de MAPK/PKD que aumenta la localización de GLUT1 a membrana y un aumento del reciclaje de IGF-IR, provocando un aumento en la captación de glucosa.

De esta forma se establecería un mecanismo por el cual el astrocito se convierte en el distribuidor de energía, en forma de lactato, producido a partir de la degradación del glucógeno y que estaría de acuerdo con las múltiples observaciones que respaldan la hipótesis de la lanzadera de lactato desde el astrocito hacia la neurona (Loaiza, Porras, y Barros, 2003; Magistretti y Pellerin, 1999; Stobart y Anderson, 2013; Wender et al., 2000).

Los receptores del sistema IGF-I / insulina regulan el funcionamiento y expresión de GLUT1

Un aspecto importante para resaltar es el hecho que en el presente trabajo se demuestra un efecto constitutivo e independiente de ligando tanto del receptor de insulina, como del receptor de IGF-I en la captación de glucosa en astrocitos. Esta observación amplía el espectro de efectos independientes de ligando observados previamente en ambos receptores (Boucher et al., 2010). Se estableció que el IGF-IR es

capaz de regular la translocación de GLUT1 a la membrana plasmática, mientras que IR lo aumenta, regulando la síntesis de GLUT1. Esta acción es de vital importancia si se tiene en cuenta que la aparición de resistencia a insulina o IGF-I se encuentra acompañada de variaciones en la expresión de los receptores (Bosco, Fava, Plastino, Montalcini, y Pujia, 2011; De La Monte, 2009; Moloney et al., 2010; Suzanne y Monte, 2012), lo que permitiría explicar las observaciones en donde alteraciones de la expresión los receptores conlleva una afectación importante del metabolismo de la glucosa cerebral.

Es también importante resaltar el papel del reciclado del receptor de IGF-I, ya que, de acuerdo a los datos presentados, la interacción de este al interior del astrocito con GLUT1 a través de GIPC juega un papel importante en la translocación del transportador de glucosa a membrana, estableciendo un punto de control adicional del sistema IGF-I/insulina sobre la captura de glucosa cerebral.

También hay que tener en cuenta la existencia de formas híbridas heterodiméricas de los receptores (Belfiore, Frasca, Pandini, Sciacca, y Vigneri, 2009), estas formas podrían estar jugando un papel en la regulación de estos efectos opuestos, teniendo en cuenta que IR no es capaz de interactuar con GLUT1 o GIPC y que la formación de híbridos IR/IGF-IR está regulada por los niveles de glucosa (Federici et al., 1999). Sin embargo, la demostración de esta hipótesis escapa al alcance del presente trabajo y requieren otro tipo de experimentos. Estos datos sugieren, en su conjunto, que los mecanismos implicados en la regulación de los niveles de IR e IGF-IR influyen el manejo de la captura de glucosa en el cerebro, tanto en condiciones normales como en condiciones patológicas.

Mecanismo de acción del efecto de Insulina e IGF-I sobre la captura de glucosa

El efecto cooperativo de la insulina e IGF-I requiere de sus respectivos receptores y está involucrado en la modulación de las interacciones entre IGF-IR, GLUT1 y GIPC, que a la postre regulan la capacidad de GLUT1 de transportarse hacia la membrana plasmática. Teniendo en cuenta las observaciones antes presentadas, se propone que

la activación sinérgica de la ruta MAPK/PKD por parte de Insulina e IGF-I lleva a una movilización de las vesículas que tienen IGF-IR lo que contribuye a un aumento de las interacciones entre IGF-IR y GLUT1 y de IGF-IR y GIPC. Estas vesículas pueden fusionarse para permitir la interacción simultánea de IGF-IR con GIPC y GLUT1. Así, estas vesículas de clasificación permitirían la movilización de GLUT1 hacia la membrana (Figura D3). Los mecanismos por los cuales las vesículas de GLUT1 se movilizan hacia la membrana desde el citoplasma celular pueden ser similares a aquellos descritos para las vesículas de GLUT4 que son inducidas por insulina (He, Liu, Liu, Chang, y Fang, 2007), sin embargo este aspecto requiere un análisis ulterior.

Los resultados aquí mostrados brindan una vía para aclarar los aparentemente contradictorios reportes sobre la acción neuroprotectora del IGF-I o la no expresión del receptor de IGF-I (Cohen y Dillin, 2008). Así, el efecto inhibitorio del receptor de IGF-I sobre la captura de glucosa cerebral es equilibrado fisiológicamente por el efecto cooperativo entre la insulina y el IGF-I. Con este enfoque se reconcilian ambas tipos de observaciones ya que, en términos funcionales, la adición de IGF-I, en un contexto de niveles normales de insulina, o la disminución de la expresión de IGF-IR produce efectos similares sobre la captura de glucosa astrocitaria.

Es así como los datos presentados, en su conjunto, indican que las vías de señalización de los péptidos similares a la insulina y sus receptores participan en la forma en la que el cerebro regula sus almacenes de glucosa en los astrocitos, ya que son los astrocitos el principal reservorio de glucógeno cerebral. Esto sugiere que tras la activación neuronal continuada, y acorde a lo datos previamente reportados (Chuquet, Quilichini, Nimchinsky, y Buzsáki, 2010), los depósitos de glucógeno son gastados con el fin de soportar el elevado gasto energético de las neuronas a través del envío de lactato como sustrato energético a la neurona (Magistretti y Pellerin, 1999). A su vez, el estímulo proveniente de la Insulina e IGF-I permite el aumento de la captura de glucosa por parte del astrocito que será usada para sintetizar glucógeno nuevamente.

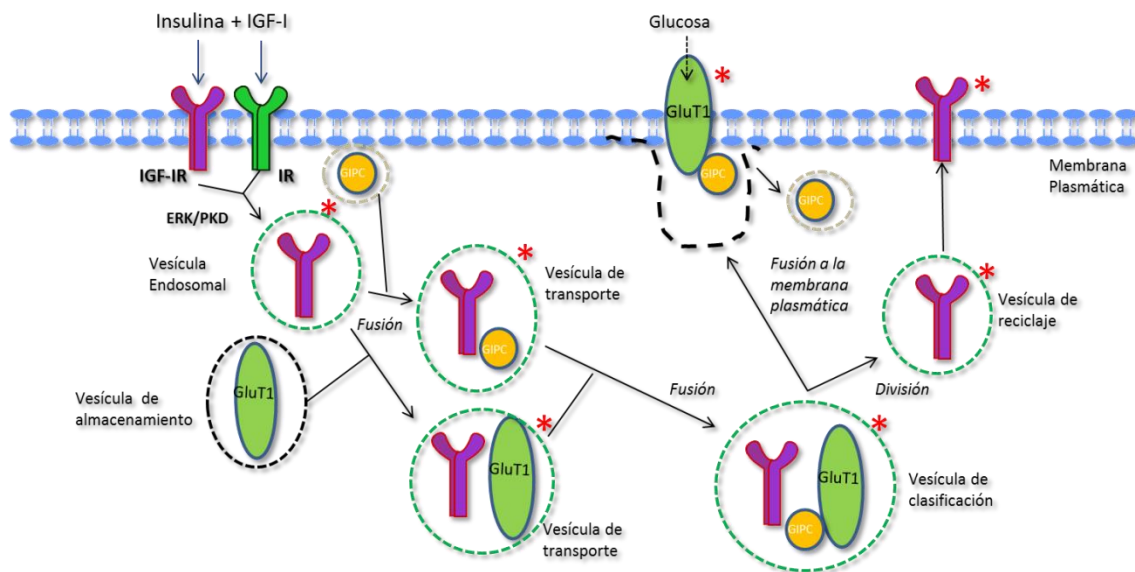


Figura D3. Modelo de mecanismo cooperativo de IGF-I e insulina que produce un aumento en la captura de glucosa por parte de los astrocitos cerebrales. Con base en las observaciones mostradas, se propone un nuevo mecanismo por el cuál, la cooperación de IGF-I e insulina produce el reciclado de IGF-IR y la translocación de GLUT1 desde vesículas internas de almacenamiento hacia la membrana plasmática. Este efecto cooperativo involucra la interacción de IGF-IR con GIPC en varios tipos de vesículas de transporte y reciclaje. Ya que la interacción entre GIPC e IGF-IR o GLUT1 se da a través de su único dominio PDZ, un complejo es probable debido la capacidad de GIPC de oligomerizar (Cita). Este complejo transitorio puede ser un evento de selección para permitir el direccionamiento de vesículas de con GLUT1 hacia la membrana y de IGF-IR para permitir su reciclaje. Con asterisco se marcan los eventos que se ven estimulados por el tratamiento de los astrocitos con I+I.

Implicaciones del efecto de I+I sobre la captura de glucosa cerebral

Estas observaciones abren nuevas perspectivas sobre el análisis del comportamiento del consumo de glucosa en diferentes patologías, como la enfermedad de Alzheimer (Jagust et al., 1993), donde la desregulación del sistema IGF-I-Insulina ha sido documentada (Talbot et al., 2012) a su vez que explican la aparente contradicción de los efectos opuestos del IGF-I y su receptor en la senescencia y las patologías asociadas, ayudando a reducir las controversias sobre los efectos de estos péptidos hormonales en las enfermedades neurológicas.

De hecho, son particularmente llamativos los efectos de la administración de insulina intranasal. Usada principalmente por la capacidad de conducir la insulina hacia el SNC sin afectar los niveles periféricos, efecto altamente indeseable por la hipoglicemia que provoca (Born et al., 2002). Varios estudios, con diferentes diseños han ahondado en los efectos de la insulina intranasal en la función cognitiva con efectos contradictorios. En personas sanas no se aprecia una mejoría de la memoria declarativa con una dosis aguda de insulina intranasal (Benedict et al., 2007) o usando igualmente una dosis aguda en pacientes con esquizofrenia no se encontró una mejoría de la memoria explícita o en la capacidad de atención (Fan et al., 2011). En contraste, otros estudios han mostrado la capacidad de mejora de la memoria verbal de un tratamiento agudo con insulina intranasal en pacientes con la enfermedad de Alzheimer y personas con deterioro cognitivo leve amnésico (Reger et al., 2006).

En cambio, los efectos de la administración crónica han mostrado resultados más acordes, así, la administración continuada de insulina durante 8 semanas mostró mejoras en la mejora y el estado de ánimo en personas sanas (Benedict et al., 2004), de la misma forma que ocurría en personas obesas (Hallschmid, Benedict, Schultes, Born, y Kern, 2008). Adicional a esto, se ha mostrado la mejora debido a la administración repetida de insulina intranasal en pacientes con enfermedad de Alzheimer o que presentan un deterioro cognitivo leve (Reger et al., 2006).

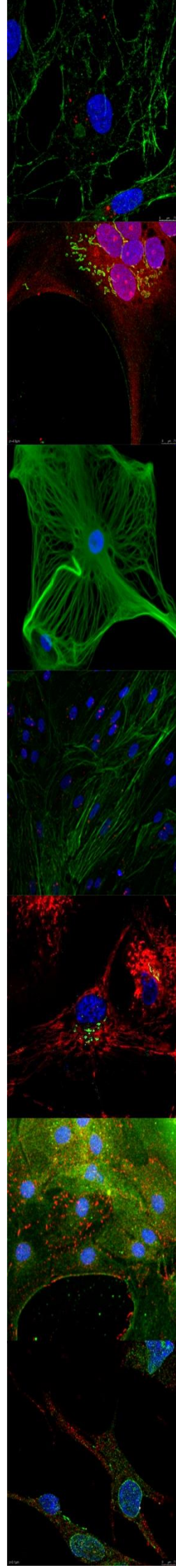
Es llamativa la poca existencia de estudios donde se estudian los efectos del IGF-I intranasal, encontrándose limitados al tratamiento de animales con lesión isquémica, en estos, los efectos de la administración de IGF-I no se encuentran limitados a una sola zona, reduciendo el tamaño de la lesión y mejorando la recuperación tanto en animales adultos, como en neonatos (Fletcher et al., 2009; Lin, Rhodes, y Cai, 2011).

Aunque hasta ahora se ha pensado que los efectos beneficiosos de la insulina se encuentran restringidos a la memoria dependiente del hipocampo (Ghasemi et al., 2013), o que los del IGF-I tienen que ver con su papel neuroprotector o estimulador de la reparación de los diferentes tipos de insultos cerebrales (Fernandez y Torres-Alemán, 2012), es notable el efecto que en todos estos casos ambas hormonas han presentado sobre la captura de glucosa cerebral, aumentando el consumo no solo en

las áreas afectadas, sino sobre amplias regiones del cerebro, tanto en el caso de la insulina (Craft et al., 2012; Novak et al., 2014), como en el del IGF-I (Guan, 2011).

Así, los datos presentados en el presente trabajo permiten explicar los efectos mostrados anteriormente, a través directamente de la insulina y el IGF-I estimulando la captación de glucosa astrocitaria, así como el papel de los receptores, regulando la función de GLUT1 por el IGF-IR, como la expresión del mismo, en el caso del receptor de insulina, abriendo una nueva perspectiva que podrá, en un futuro, mejorar los tratamiento con ambas hormonas en las diferentes alteraciones metabólicas que se producen en las patologías que afectan el sistema nervioso central, pudiendo mejorar los síntomas y retrasando su progresión.

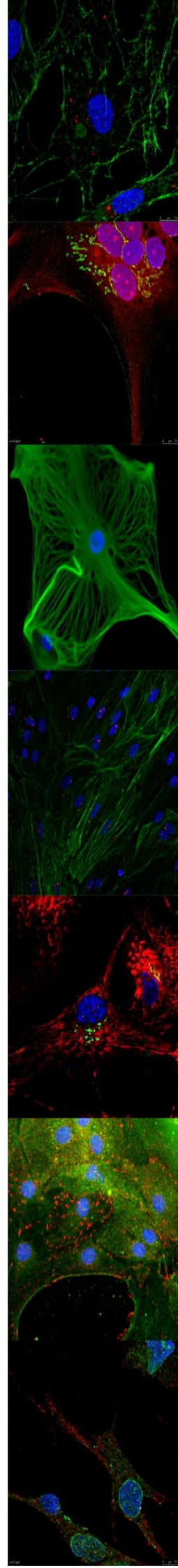
CONCLUSIONES



Conclusiones

1. La insulina y el IGF-I actúan cooperativamente para estimular la captura de glucosa en los astrocitos, este efecto no ocurre ni en neuronas ni células del endotelio cerebral.
2. Esta sinergia sobre la captura de glucosa astrocitaria causada por IGF-I e insulina ocurre a través de la activación de sus receptores.
3. Los efectos de Insulina e IGF-I en la captura de glucosa astrocitaria están mediados por el transportador de glucosa 1 (GLUT1).
4. IGF-IR e IR presentan un papel independiente de ligando, IGF-IR regulando la translocación de GLUT1 e IR regulando su expresión.
5. Los papeles de IR e IGF-IR, debido a su efector sobre GLUT1, son antagónicos.
6. La activación de la vía MAPK/PKD es esencial para el efecto de Insulina e IGF-I sobre la captación de glucosa en astrocitos.
7. Alteraciones del sistema IGF-I/Insulina en el cerebro producen alteraciones en la captura de glucosa.
8. GIPC es esencial para la capturan de glucosa, proveyendo andamiaje para la translocación de GLUT1 a membrana y permitiendo el reciclaje de IGF-IR
9. GIPC media la interacción entre IGF-IR y GLUT1
10. La regulación de la glucosa por IGF-I e Insulina en astrocitos produce un efecto en la captación global del cerebro.

BIBLIOGRAFÍA



Bibliografía

- Adamo, M., Raizada, M. K., & LeRoith, D. (1989). Insulin and insulin-like growth factor receptors in the nervous system. *Molecular Neurobiology*, 3(1-2), 71–100. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2553069>
- Addgene. (n.d.). Addgene: pLKO.1 - TRC Cloning Vector. Retrieved April 20, 2014, from <http://www.addgene.org/tools/protocols/plko/>
- Akgören, N., Fabricius, M., & Lauritzen, M. (1994). Importance of nitric oxide for local increases of blood flow in rat cerebellar cortex during electrical stimulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 5903–5907.
- Araque, A., Sanzgiri, R. P., Parpura, V., & Haydon, P. G. (1999). Astrocyte-induced modulation of synaptic transmission. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 77(9), 699–706. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10566947>
- Attwell, D., & Laughlin, S. B. (2001). An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 21, 1133–1145. doi:10.1097/00004647-200110000-00001
- Avruch, J. (1998). Insulin signal transduction through protein kinase cascades. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 182(1-2), 31–48. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9609112>
- Balcerzyk, M., Kontaxakis, G., Delgado, M., Garcia-Garcia, L., Correcher, C., Gonzalez, A. J., ... Pozo, M. A. (2009). Initial performance evaluation of a high resolution Albira small animal positron emission tomography scanner with monolithic crystals and depth-of-interaction encoding from a user's perspective. *Measurement Science and Technology*, 20(10), 104011. doi:10.1088/0957-0233/20/10/104011
- Banks, W. A., Jaspan, J. B., Huang, W., & Kastin, A. J. (1997). Transport of insulin across the blood-brain barrier: saturability at euglycemic doses of insulin. *Peptides*, 18(9), 1423–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9392846>
- Baptiste, D. C., & Fehlings, M. G. (2006). Pharmacological Approaches To Repair the Injured Spinal Cord. *Journal of Neurotrauma*. doi:10.1089/neu.2006.23.318
- Baron-Van Evercooren, A., Olichon-Berthe, C., Kowalski, A., Visciano, G., & Van Obberghen, E. (1991). Expression of IGF-I and insulin receptor genes in the rat

central nervous system: a developmental, regional, and cellular analysis. *Journal of Neuroscience Research*, 28(2), 244–53. doi:10.1002/jnr.490280212

- Barros, L. F., Bittner, C. X., Loaiza, A., Ruminot, I., Larenas, V., Moldenhauer, H., ... Alvarez, M. (2009). Kinetic validation of 6-NBDG as a probe for the glucose transporter GLUT1 in astrocytes. *Journal of Neurochemistry*, 109 Suppl , 94–100. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.05885.x
- Barthel, A., Okino, S. T., Liao, J., Nakatani, K., Li, J., Whitlock, J. P., & Roth, R. A. (1999). Regulation of GLUT1 gene transcription by the serine/threonine kinase Akt1. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(29), 20281–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10400647>
- Baura, G. D., Foster, D. M., Porte, D., Kahn, S. E., Bergman, R. N., Cobelli, C., & Schwartz, M. W. (1993). Saturable transport of insulin from plasma into the central nervous system of dogs in vivo. A mechanism for regulated insulin delivery to the brain. *The Journal of Clinical Investigation*, 92(4), 1824–30. doi:10.1172/JCI116773
- Belfiore, A., Frasca, F., Pandini, G., Sciacca, L., & Vigneri, R. (2009). Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease. *Endocrine Reviews*, 30(6), 586–623. doi:10.1210/er.2008-0047
- Bell, G. I., Pilkis, S. J., Weber, I. T., & Polonsky, K. S. (1996). Glucokinase mutations, insulin secretion, and diabetes mellitus. *Annual Review of Physiology*, 58, 171–86. doi:10.1146/annurev.ph.58.030196.001131
- Benedict, C., Hallschmid, M., Hatke, A., Schultes, B., Fehm, H. L., Born, J., & Kern, W. (2004). Intranasal insulin improves memory in humans. *Psychoneuroendocrinology*, 29(10), 1326–34. doi:10.1016/j.psyneuen.2004.04.003
- Benedict, C., Hallschmid, M., Schmitz, K., Schultes, B., Ratter, F., Fehm, H. L., ... Kern, W. (2007). Intranasal insulin improves memory in humans: superiority of insulin aspart. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 32(1), 239–43. doi:10.1038/sj.npp.1301193
- Benyoucef, S., Surinya, K. H., Hadaschik, D., & Siddle, K. (2007). Characterization of insulin/IGF hybrid receptors: contributions of the insulin receptor L2 and Fn1 domains and the alternatively spliced exon 11 sequence to ligand binding and receptor activation. *The Biochemical Journal*, 403(3), 603–13. doi:10.1042/BJ20061709
- Bittar, P. G., Charnay, Y., Pellerin, L., Bouras, C., & Magistretti, P. J. (1996). Selective distribution of lactate dehydrogenase isoenzymes in neurons and astrocytes of human brain. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of*

the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 16(6), 1079–89.
doi:10.1097/00004647-199611000-00001

Bomfim, T. R., Forny-Germano, L., Sathler, L. B., Brito-Moreira, J., Houzel, J.-C., Decker, H., ... De Felice, F. G. (2012). An anti-diabetes agent protects the mouse brain from defective insulin signaling caused by Alzheimer's disease-associated A β oligomers. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(4), 1339–53.
doi:10.1172/JCI57256

Bondy, C. A., & Cheng, C. M. (2002). Insulin-like growth factor-1 promotes neuronal glucose utilization during brain development and repair processes. *International Review of Neurobiology*, 51, 189–217. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12420360>

Bondy, C. A., & Lee, W. H. (1993). Patterns of insulin-like growth factor and IGF receptor gene expression in the brain. Functional implications. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 692, 33–43. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8215043>

Born, J., Lange, T., Kern, W., McGregor, G. P., Bickel, U., & Fehm, H. L. (2002). Sniffing neuropeptides: a transnasal approach to the human brain. *Nature Neuroscience*, 5(6), 514–516. doi:10.1038/nn0602-849

Borrel, U., & Örström, A. (1945). Metabolism in Different Parts of the Brain, Especially in the Epiphysis, Measured with Radioactive Phosphorus. *Acta Physiologica Scandinavica*, 10(3-4), 231–242. doi:10.1111/j.1748-1716.1945.tb00308.x

Bosco, D., Fava, A., Plastino, M., Montalcini, T., & Pujia, A. (2011). Possible implications of insulin resistance and glucose metabolism in Alzheimer's disease pathogenesis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 15(9), 1807–21. doi:10.1111/j.1582-4934.2011.01318.x

Boucher, J., Macotela, Y., Bezy, O., Mori, M. A., December, C. R. K., Kriauciunas, K., & Kahn, C. R. (2010). A kinase-independent role for unoccupied insulin and IGF-1 receptors in the control of apoptosis. *Science Signaling*, 3(151), ra87.
doi:10.1126/scisignal.2001173

Boura-Halfon, S., & Zick, Y. (2009). Serine kinases of insulin receptor substrate proteins. In *Vitamins and hormones* (Vol. 80, pp. 313–49). doi:10.1016/S0083-6729(08)00612-2

Broer, S., Rahman, B., Pellegrini, G., Pellerin, L., Martin, J.-L., Verleysdonk, S., ... Magistretti, P. J. (1997). Comparison of Lactate Transport in Astroglial Cells and Monocarboxylate Transporter 1 (MCT 1) Expressing *Xenopus laevis* Oocytes: EXPRESSION OF TWO DIFFERENT MONOCARBOXYLATE TRANSPORTERS IN ASTROGLIAL CELLS AND NEURONS. *J. Biol. Chem.*, 272(48), 30096–30102. Retrieved from <http://www.jbc.org/content/272/48/30096.long>

- Brummer, T., Schmitz-Peiffer, C., & Daly, R. J. (2010). Docking proteins. *The FEBS Journal*, 277(21), 4356–69. doi:10.1111/j.1742-4658.2010.07865.x
- Carro, E., & Torres-Aleman, I. (2004). The role of insulin and insulin-like growth factor I in the molecular and cellular mechanisms underlying the pathology of Alzheimer's disease. *European Journal of Pharmacology*, 490(1-3), 127–33. doi:10.1016/j.ejphar.2004.02.050
- Carro, E., Trejo, J. L., Busiguina, S., & Torres-Aleman, I. (2001). Circulating insulin-like growth factor I mediates the protective effects of physical exercise against brain insults of different etiology and anatomy. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 21(15), 5678–84. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11466439>
- Chaigneau, E., Tiret, P., Lecoq, J., Ducros, M., Knöpfel, T., & Charpak, S. (2007). The relationship between blood flow and neuronal activity in the rodent olfactory bulb. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27, 6452–6460. doi:10.1523/JNEUROSCI.3141-06.2007
- Chen, H. C., Bandyopadhyay, G., Sajan, M. P., Kanoh, Y., Standaert, M., & Farese, R. V. (2002). Activation of the ERK pathway and atypical protein kinase C isoforms in exercise- and aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribose (AICAR)-stimulated glucose transport. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(26), 23554–62. doi:10.1074/jbc.M201152200
- Cheng, C. M., Reinhardt, R. R., Lee, W. H., Joncas, G., Patel, S. C., & Bondy, C. A. (2000). Insulin-like growth factor 1 regulates developing brain glucose metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(18), 10236–41. doi:10.1073/pnas.170008497
- Chiu, S.-L., & Cline, H. T. (2010). Insulin receptor signaling in the development of neuronal structure and function. *Neural Development*, 5, 7. doi:10.1186/1749-8104-5-7
- Choi, I. Y., Tkác, I., Ugurbil, K., & Gruetter, R. (1999). Noninvasive measurements of [1-(13)C]glycogen concentrations and metabolism in rat brain in vivo. *Journal of Neurochemistry*, 73(3), 1300–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10461925>
- Chowers, I., Lavy, S., & Halpern, L. (1961). Effect of insulin administered intracisternally in dogs on the glucose level of the blood and the cerebrospinal fluid. *Experimental Neurology*, 3(2), 197–205. doi:10.1016/0014-4886(61)90069-3
- Chowers, I., Lavy, S., & Halpern, L. (1966). Effect of insulin administered intracisternally on the glucose level of the blood and the cerebrospinal fluid in vagotomized dogs. *Experimental Neurology*, 14(3), 383–389. doi:10.1016/0014-4886(66)90122-1

- Chuquet, J., Quilichini, P., Nimchinsky, E. a, & Buzsáki, G. (2010). Predominant enhancement of glucose uptake in astrocytes versus neurons during activation of the somatosensory cortex. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *30*(45), 15298–303. doi:10.1523/JNEUROSCI.0762-10.2010
- Clarke, D., & Sokoloff, L. (1999). *Circulation and Energy Metabolism of the Brain. Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. (pp. 637–669).
- Cobb, M. H., & Goldsmith, E. J. (1995). How MAP Kinases Are Regulated. *Journal of Biological Chemistry*, *270*(25), 14843–14846. doi:10.1074/jbc.270.25.14843
- Cohen, E., & Dillin, A. (2008). The insulin paradox: aging, proteotoxicity and neurodegeneration. *Nature Reviews. Neuroscience*, *9*(10), 759–67. doi:10.1038/nrn2474
- Craft, S., Baker, L. D., Montine, T. J., Minoshima, S., Watson, G. S., Claxton, A., ... Gerton, B. (2012). Intranasal insulin therapy for Alzheimer disease and amnesic mild cognitive impairment: a pilot clinical trial. *Archives of Neurology*, *69*(1), 29–38. doi:10.1001/archneurol.2011.233
- De La Monte, S. M. (2009). Insulin resistance and Alzheimer's disease. *BMB Reports*, *42*(8), 475–481. doi:10.5483/BMBRep.2009.42.8.475
- De la Monte, S. M., Tong, M., Bowling, N., & Moskal, P. (2011). si-RNA inhibition of brain insulin or insulin-like growth factor receptors causes developmental cerebellar abnormalities: relevance to fetal alcohol spectrum disorder. *Molecular Brain*, *4*, 13. doi:10.1186/1756-6606-4-13
- Deitmer, J. W. (2000). Glial strategy for metabolic shuttling and neuronal function. *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, *22*(8), 747–52. doi:10.1002/1521-1878(200008)22:8<747::AID-BIES8>3.0.CO;2-0
- Denley, A., Carroll, J. M., Brierley, G. V, Cosgrove, L., Wallace, J., Forbes, B., & Roberts, C. T. (2007). Differential activation of insulin receptor substrates 1 and 2 by insulin-like growth factor-activated insulin receptors. *Molecular and Cellular Biology*, *27*(10), 3569–77. doi:10.1128/MCB.01447-06
- Dews, M., Prisco, M., Peruzzi, F., Romano, G., Morrione, A., & Baserga, R. (2000). Domains of the insulin-like growth factor I receptor required for the activation of extracellular signal-regulated kinases. *Endocrinology*, *141*(4), 1289–300. doi:10.1210/endo.141.4.7414
- Ding, X. Z., Fehsenfeld, D. M., Murphy, L. O., Permert, J., & Adrian, T. E. (2000). Physiological concentrations of insulin augment pancreatic cancer cell proliferation and glucose utilization by activating MAP kinase, PI3 kinase and enhancing GLUT-1 expression. *Pancreas*, *21*(3), 310–20. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11039477>

- Dorn, A., Bernstein, H. G., Rinne, A., Ziegler, M., Hahn, H. J., & Ansorge, S. (1983). Insulin- and glucagonlike peptides in the brain. *The Anatomical Record*, *207*(1), 69–77. doi:10.1002/ar.1092070108
- Dringen, R. (2000). Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progress in Neurobiology*, *62*(6), 649–71. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10880854>
- Dringen, R., Gebhardt, R., & Hamprecht, B. (1993). Glycogen in astrocytes: possible function as lactate supply for neighboring cells. *Brain Research*, *623*(2), 208–14. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8221102>
- Dringen, R., & Hamprecht, B. (1992). Glucose, insulin, and insulin-like growth factor I regulate the glycogen content of astroglia-rich primary cultures. *Journal of Neurochemistry*, *58*(2), 511–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1729397>
- Dull, T., Zufferey, R., Kelly, M., Mandel, R. J., Nguyen, M., Trono, D., & Naldini, L. (1998). A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *Journal of Virology*, *72*(11), 8463–71. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=110254&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Edmond, J., Auestad, N., Robbins, R. A., & Bergstrom, J. D. (1985). Ketone body metabolism in the neonate: development and the effect of diet. *Federation Proceedings*, *44*(7), 2359–64. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3884392>
- Eng, J., & Yalow, R. S. (1981). Evidence against extrapancreatic insulin synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *78*(7), 4576–8. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=319835&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Fan, X., Copeland, P. M., Liu, E. Y., Chiang, E., Freudenreich, O., Goff, D. C., & Henderson, D. C. (2011). No effect of single-dose intranasal insulin treatment on verbal memory and sustained attention in patients with schizophrenia. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, *31*(2), 231–4. doi:10.1097/JCP.0b013e31820ebd0e
- Federici, M., Giaccari, A., Hribal, M. L., Giovannone, B., Lauro, D., Morviducci, L., ... Sesti, G. (1999). Evidence for glucose/hexosamine in vivo regulation of insulin/IGF-I hybrid receptor assembly. *Diabetes*, *48*(12), 2277–85. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10580414>
- Fernandez, A. M., Fernandez, S., Carrero, P., Garcia-Garcia, M., & Torres-Aleman, I. (2007). Calcineurin in reactive astrocytes plays a key role in the interplay between proinflammatory and anti-inflammatory signals. *The Journal of Neuroscience : The*

Official Journal of the Society for Neuroscience, 27(33), 8745–56.
doi:10.1523/JNEUROSCI.1002-07.2007

- Fernandez, A. M., & Torres-Alemán, I. (2012). The many faces of insulin-like peptide signalling in the brain. *Nature Reviews. Neuroscience*, 13(4), 225–39.
doi:10.1038/nrn3209
- Fletcher, L., Kohli, S., Sprague, S. M., Scranton, R. A., Lipton, S. A., Parra, A., ... Digicaylioglu, M. (2009). Intranasal delivery of erythropoietin plus insulin-like growth factor-I for acute neuroprotection in stroke. Laboratory investigation. *Journal of Neurosurgery*, 111(1), 164–70. doi:10.3171/2009.2.JNS081199
- Frank, H. J., & Pardridge, W. M. (1981). A direct in vitro demonstration of insulin binding to isolated brain microvessels. *Diabetes*, 30(9), 757–61. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7021274>
- García-de Lacoba, M., Alarcón, C., de La Rosa, E. J., & de Pablo, F. (1999). Insulin/insulin-like growth factor-I hybrid receptors with high affinity for insulin are developmentally regulated during neurogenesis. *Endocrinology*, 140(1), 233–43. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9886830>
- Gerhart, D. Z., Enerson, B. E., Zhdankina, O. Y., Leino, R. L., & Drewes, L. R. (1997). Expression of monocarboxylate transporter MCT1 by brain endothelium and glia in adult and suckling rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 273(1), E207–213. Retrieved from <http://ajpendo.physiology.org/content/273/1/E207>
- Ghasemi, R., Haeri, A., Dargahi, L., Mohamed, Z., & Ahmadiani, A. (2013). Insulin in the brain: sources, localization and functions. *Molecular Neurobiology*, 47(1), 145–71. doi:10.1007/s12035-012-8339-9
- Girouard, H., & Iadecola, C. (2006). Neurovascular coupling in the normal brain and in hypertension, stroke, and Alzheimer disease. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 100, 328–335. doi:10.1152/jappphysiol.00966.2005
- Guan, J. (2011). Insulin-like growth factor -1 (IGF-1) derived neuropeptides, a novel strategy for the development of pharmaceuticals for managing ischemic brain injury. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 17(4), 250–5. doi:10.1111/j.1755-5949.2009.00128.x
- Gutiérrez-Ospina, G., Saum, L., Calikoglu, A. S., Díaz-Cintra, S., Barrios, F. A., & D'Ercole, A. J. (1997). Increased neural activity in transgenic mice with brain IGF-I overexpression: a [3H]2DG study. *Neuroreport*, 8(13), 2907–11. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9376529>
- Hallschmid, M., Benedict, C., Schultes, B., Born, J., & Kern, W. (2008). Obese men respond to cognitive but not to catabolic brain insulin signaling. *International Journal of Obesity (2005)*, 32(2), 275–82. doi:10.1038/sj.ijo.0803722

- Hamai, M., Minokoshi, Y., & Shimazu, T. (1999). L-Glutamate and insulin enhance glycogen synthesis in cultured astrocytes from the rat brain through different intracellular mechanisms. *Journal of Neurochemistry*, *73*(1), 400–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10386993>
- Havrankova, J., Roth, J., & Brownstein, M. (1978). Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat. *Nature*, *272*(5656), 827–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/205798>
- Havrankova, J., Schmechel, D., Roth, J., & Brownstein, M. (1978). Identification of insulin in rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *75*(11), 5737–41. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=393044&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- He, A., Liu, X., Liu, L., Chang, Y., & Fang, F. (2007). How many signals impinge on GLUT4 activation by insulin? *Cellular Signalling*, *19*(1), 1–7. doi:10.1016/j.cellsig.2006.05.018
- Heni, M., Hennige, A. M., Peter, A., Siegel-Axel, D., Ordelheide, A.-M., Krebs, N., ... Staiger, H. (2011). Insulin promotes glycogen storage and cell proliferation in primary human astrocytes. *PLoS One*, *6*(6), e21594. doi:10.1371/journal.pone.0021594
- Heni, M., Schöpfer, P., Peter, A., Sartorius, T., Fritsche, A., Synofzik, M., ... Hennige, A. M. (2013). Evidence for altered transport of insulin across the blood-brain barrier in insulin-resistant humans. *Acta Diabetologica*. doi:10.1007/s00592-013-0546-y
- Herculano-Houzel, S. (2012). The remarkable, yet not extraordinary, human brain as a scaled-up primate brain and its associated cost. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109* Suppl , 10661–8. doi:10.1073/pnas.1201895109
- Hertz, L., Dringen, R., Schousboe, A., & Robinson, S. R. (1999). Astrocytes: glutamate producers for neurons. *Journal of Neuroscience Research*, *57*(4), 417–28. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10440891>
- Hom, S., Egleton, R. D., Huber, J. D., & Davis, T. P. (2001). Effect of reduced flow on blood-brain barrier transport systems. *Brain Research*, *890*(1), 38–48. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11164767>
- Huang, D., Khoe, M., Befekadu, M., Chung, S., Takata, Y., Ilic, D., & Bryer-Ash, M. (2007). Focal adhesion kinase mediates cell survival via NF-kappaB and ERK signaling pathways. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, *292*(4), C1339–52. doi:10.1152/ajpcell.00144.2006

- Hwa, V., Oh, Y., & Rosenfeld, R. G. (1999). The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocrine Reviews*, *20*(6), 761–87. doi:10.1210/edrv.20.6.0382
- Izumi, Y., Benz, A. M., Katsuki, H., & Zorumski, C. F. (1997). Endogenous Monocarboxylates Sustain Hippocampal Synaptic Function and Morphological Integrity during Energy Deprivation. *J. Neurosci.*, *17*(24), 9448–9457. Retrieved from <http://www.jneurosci.org/content/17/24/9448.long>
- Izumi, Y., Benz, A. M., Zorumski, C. F., & Olney, J. W. (1994). Effects of lactate and pyruvate on glucose deprivation in rat hippocampal slices. *Neuroreport*, *5*(5), 617–20. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8025256>
- Jacob, K. K., Whittaker, J., & Stanley, F. M. (2002). Insulin receptor tyrosine kinase activity and phosphorylation of tyrosines 1162 and 1163 are required for insulin-increased prolactin gene expression. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *186*(1), 7–16. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11850117>
- Jagust, W. J., Eberling, J. L., Richardson, B. C., Reed, B. R., Baker, M. G., Nordahl, T. E., & Budinger, T. F. (1993). The cortical topography of temporal lobe hypometabolism in early Alzheimer's disease. *Brain Research*, *629*(2), 189–98. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8111623>
- Kann, O., & Kovács, R. (2007). Mitochondria and neuronal activity. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, *292*(2), C641–57. doi:10.1152/ajpcell.00222.2006
- Katoh, M. (2013). Functional proteomics, human genetics and cancer biology of GIPC family members. *Experimental & Molecular Medicine*, *45*, e26. doi:10.1038/emm.2013.49
- Kim, W. H., Lee, J., Jung, D.-W., & Williams, D. R. (2012). Visualizing sweetness: increasingly diverse applications for fluorescent-tagged glucose bioprobes and their recent structural modifications. *Sensors (Basel, Switzerland)*, *12*(4), 5005–27. doi:10.3390/s120405005
- Ko, K. R., Ngai, A. C., & Winn, H. R. (1990). Role of adenosine in regulation of regional cerebral blood flow in sensory cortex. *The American Journal of Physiology*, *259*, H1703–H1708.
- Koshy, S., Alizadeh, P., Timchenko, L. T., & Beeton, C. (2010). Quantitative measurement of GLUT4 translocation to the plasma membrane by flow cytometry. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (45), e2429. doi:10.3791/2429
- Laron, Z. (2009). Insulin and the brain. *Archives of Physiology and Biochemistry*, *115*(2), 112–6. doi:10.1080/13813450902949012

- Lee, W. H., Wang, G. M., Seaman, L. B., & Vannucci, S. J. (1996). Coordinate IGF-I and IGFBP5 gene expression in perinatal rat brain after hypoxia-ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, *16*(2), 227–36. doi:10.1097/00004647-199603000-00007
- Leffler, C. W., Busija, D. W., Mirro, R., Armstead, W. M., & Beasley, D. G. (1989). Effects of ischemia on brain blood flow and oxygen consumption of newborn pigs. *The American Journal of Physiology*, *257*, H1917–H1926.
- Li, J., & Iadecola, C. (1994). Nitric oxide and adenosine mediate vasodilation during functional activation in cerebellar cortex. *Neuropharmacology*, *33*, 1453–1461. doi:10.1016/0028-3908(94)90049-3
- Ligensa, T., Krauss, S., Demuth, D., Schumacher, R., Camonis, J., Jaques, G., & Weidner, K. M. (2001). A PDZ domain protein interacts with the C-terminal tail of the insulin-like growth factor-1 receptor but not with the insulin receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, *276*(36), 33419–27. doi:10.1074/jbc.M104509200
- Lin, S., Rhodes, P. G., & Cai, Z. (2011). Whole body hypothermia broadens the therapeutic window of intranasally administered IGF-1 in a neonatal rat model of cerebral hypoxia-ischemia. *Brain Research*, *1385*, 246–56. doi:10.1016/j.brainres.2011.02.013
- Lindauer, U., Leithner, C., Kaasch, H., Rohrer, B., Foddis, M., Füchtmeier, M., ... Dirnagl, U. (2010). Neurovascular coupling in rat brain operates independent of hemoglobin deoxygenation. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, *30*, 757–768. doi:10.1038/jcbfm.2009.259
- Liu, Y., Liu, F., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., & Gong, C.-X. (2011). Deficient brain insulin signalling pathway in Alzheimer's disease and diabetes. *The Journal of Pathology*, *225*(1), 54–62. doi:10.1002/path.2912
- Loaiza, A., Porrás, O. H., & Barros, L. F. (2003). Glutamate Triggers Rapid Glucose Transport Stimulation in Astrocytes as Evidenced by Real-Time Confocal Microscopy. *J. Neurosci.*, *23*(19), 7337–7342. Retrieved from http://www.jneurosci.org/content/23/19/7337.abstract?ijkey=3cfab4228d55268eac98cf44e9da2f25adcaa8ca&keytype=tf_ipsecsha
- Magistretti, P. J., & Pellerin, L. (1991). Cellular Bases of Brain Energy Metabolism and Their Relevance to Functional Brain Imaging: Evidence for a Prominent Role of Astrocytes. *Cerebral Cortex*, *6*(1), 50–61. doi:10.1093/cercor/6.1.50
- Magistretti, P. J., & Pellerin, L. (1996). The contribution of astrocytes to the 18F-2-deoxyglucose signal in PET activation studies. *Molecular Psychiatry*, *1*(6), 445–52. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9154245>

- Magistretti, P. J., & Pellerin, L. (1999). Astrocytes Couple Synaptic Activity to Glucose Utilization in the Brain. *News in Physiological Sciences : An International Journal of Physiology Produced Jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society*, 14, 177–182. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11390847>
- Magistretti, P. J., & Pellerin, L. (1999). Cellular mechanisms of brain energy metabolism and their relevance to functional brain imaging. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 354(1387), 1155–63. doi:10.1098/rstb.1999.0471
- Maran, A., Cranston, I., Lomas, J., Macdonald, I., & Amiel, S. A. (1994). Protection by lactate of cerebral function during hypoglycaemia. *Lancet*, 343(8888), 16–20. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7905041>
- Margolis, R. U., & Altszuler, N. (1967). Insulin in the cerebrospinal fluid. *Nature*, 215(5108), 1375–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6055448>
- Mintun, M. A., Lundstrom, B. N., Snyder, A. Z., Vlassenko, A. G., Shulman, G. L., & Raichle, M. E. (2001). Blood flow and oxygen delivery to human brain during functional activity: theoretical modeling and experimental data. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 6859–6864. doi:10.1073/pnas.111164398
- Moloney, A. M., Griffin, R. J., Timmons, S., O'Connor, R., Ravid, R., & O'Neill, C. (2010). Defects in IGF-1 receptor, insulin receptor and IRS-1/2 in Alzheimer's disease indicate possible resistance to IGF-1 and insulin signalling. *Neurobiology of Aging*, 31(2), 224–43. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2008.04.002
- Nagase, M., Takahashi, Y., Watabe, A. M., Kubo, Y., & Kato, F. (2014). On-site energy supply at synapses through monocarboxylate transporters maintains excitatory synaptic transmission. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 34(7), 2605–17. doi:10.1523/JNEUROSCI.4687-12.2014
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., Kerr, J. N. D., & Helmchen, F. (2004). Sulforhodamine 101 as a specific marker of astroglia in the neocortex in vivo. *Nature Methods*, 1(1), 31–7. doi:10.1038/nmeth706
- Nishijima, T., Piriz, J., Duflot, S., Fernandez, A. M., Gaitan, G., Gomez-Pinedo, U., ... Torres-Aleman, I. (2010). Neuronal activity drives localized blood-brain-barrier transport of serum insulin-like growth factor-I into the CNS. *Neuron*, 67(5), 834–46. doi:10.1016/j.neuron.2010.08.007
- Norup Nielsen, A., & Lauritzen, M. (2001). Coupling and uncoupling of activity-dependent increases of neuronal activity and blood flow in rat somatosensory cortex. *The Journal of Physiology*, 533, 773–785. doi:PHY_11382 [pii]

- Novak, V., Milberg, W., Hao, Y., Munshi, M., Novak, P., Galica, A., ... Abduljalil, A. (2014). Enhancement of vasoreactivity and cognition by intranasal insulin in type 2 diabetes. *Diabetes Care*, *37*(3), 751–9. doi:10.2337/dc13-1672
- Oberheim, N. A., Takano, T., Han, X., He, W., Lin, J. H. C., Wang, F., ... Nedergaard, M. (2009). Uniquely hominid features of adult human astrocytes. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *29*(10), 3276–87. doi:10.1523/JNEUROSCI.4707-08.2009
- Oberheim, N. A., Wang, X., Goldman, S., & Nedergaard, M. (2006). Astrocytic complexity distinguishes the human brain. *Trends in Neurosciences*, *29*(10), 547–53. doi:10.1016/j.tins.2006.08.004
- Ocrant, I., Fay, C. T., & Parmelee, J. T. (1990). Characterization of insulin-like growth factor binding proteins produced in the rat central nervous system. *Endocrinology*, *127*(3), 1260–7. doi:10.1210/endo-127-3-1260
- Pardridge, W. M., Eisenberg, J., & Yang, J. (1985). Human blood-brain barrier insulin receptor. *Journal of Neurochemistry*, *44*(6), 1771–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2859355>
- Pellerin, L., & Magistretti, P. J. (1994). Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *91*(22), 10625–9. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=45074&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Pellerin, L., & Magistretti, P. J. (1997). Glutamate uptake stimulates Na⁺,K⁺-ATPase activity in astrocytes via activation of a distinct subunit highly sensitive to ouabain. *Journal of Neurochemistry*, *69*(5), 2132–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9349559>
- Pellerin, L., Pellegrini, G., Martin, J.-L., & Magistretti, P. J. (1998). Expression of monocarboxylate transporter mRNAs in mouse brain: Support for a distinct role of lactate as an energy substrate for the neonatal vs. adult brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *95*(7), 3990–3995. doi:10.1073/pnas.95.7.3990
- Pérez-Alvarez, A., Araque, A., & Martín, E. D. (2013). Confocal microscopy for astrocyte in vivo imaging: Recycle and reuse in microscopy. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *7*(April), 51. doi:10.3389/fncel.2013.00051
- Peterson, E. C., Wang, Z., & Britz, G. (2011). Regulation of cerebral blood flow. *International Journal of Vascular Medicine*. doi:10.1155/2011/823525
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, *29*(9), e45. Retrieved from

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=55695&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

- Powers, W. J., Hirsch, I. B., & Cryer, P. E. (1996). Effect of stepped hypoglycemia on regional cerebral blood flow response to physiological brain activation. *The American Journal of Physiology*, *270*, H554–H559.
- Prieto, E., Collantes, M., Delgado, M., Juri, C., García-García, L., Molinet, F., ... Peñuelas, I. (2011). Statistical parametric maps of ¹⁸F-FDG PET and 3-D autoradiography in the rat brain: a cross-validation study. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, *38*(12), 2228–37. doi:10.1007/s00259-011-1905-y
- Rafaelsen, O. (1958). Action of insulin on isolated rat spinal cord. *The Lancet*, *272*(7053), 941–943. doi:10.1016/S0140-6736(58)90432-X
- Rahman, B., Kussmaul, L., Hamprecht, B., & Dringen, R. (2000). Glycogen is mobilized during the disposal of peroxides by cultured astroglial cells from rat brain. *Neuroscience Letters*, *290*(3), 169–72. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10963890>
- Ramon y Cajal, S. (1913). Contribución al conocimiento de la neuroglia del cerebro humano. *Trab. Lab. Invest. Biol.*, *XI*, 225–315.
- Reed, B. C., Cefalu, C., Bellaire, B. H., Cardelli, J. A., Louis, T., Salamon, J., ... Bunn, R. C. (2005). GLUT1CBP(TIP2/GIPC1) interactions with GLUT1 and myosin VI: evidence supporting an adapter function for GLUT1CBP. *Molecular Biology of the Cell*, *16*(9), 4183–201. doi:10.1091/mbc.E04-11-0978
- Reger, M. A., Watson, G. S., Frey, W. H., Baker, L. D., Cholerton, B., Keeling, M. L., ... Craft, S. (2006). Effects of intranasal insulin on cognition in memory-impaired older adults: modulation by APOE genotype. *Neurobiology of Aging*, *27*(3), 451–8. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2005.03.016
- Rivera, E. J., Goldin, A., Fulmer, N., Tavares, R., Wands, J. R., & de la Monte, S. M. (2005). Insulin and insulin-like growth factor expression and function deteriorate with progression of Alzheimer's disease: link to brain reductions in acetylcholine. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, *8*(3), 247–68. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16340083>
- Robinson, A. M., & Williamson, D. H. (1980). Physiological roles of ketone bodies as substrates and signals in mammalian tissues. *Physiol Rev*, *60*(1), 143–187. Retrieved from <http://physrev.physiology.org/content/60/1/143.long>
- Robinson, M. B., & Dowd, L. A. (1997). Heterogeneity and functional properties of subtypes of sodium-dependent glutamate transporters in the mammalian central nervous system. *Advances in Pharmacology (San Diego, Calif.)*, *37*, 69–115. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8891100>

- Roy, C. S., & Sherrington, C. S. (1890). On the Regulation of the Blood-supply of the Brain. *The Journal of Physiology*, *11*(1-2), 85–158.17. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1514242&tool=pmc&entrez&rendertype=abstract>
- Saltiel, A. R. (2001). New Perspectives into the Molecular Pathogenesis and Treatment of Type 2 Diabetes. *Cell*, *104*(4), 517–529. doi:10.1016/S0092-8674(01)00239-2
- Saltiel, A. R., & Kahn, C. R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, *414*(6865), 799–806. doi:10.1038/414799a
- Sara, V. R., Hall, K., Von Holtz, H., Humbel, R., Sjögren, B., & Wetterberg, L. (1982). Evidence for the presence of specific receptors for insulin-like growth factors 1 (IGF-1) and 2 (IGF-2) and insulin throughout the adult human brain. *Neuroscience Letters*, *34*(1), 39–44. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6298669>
- Schäffer, L., Brand, C. L., Hansen, B. F., Ribel, U., Shaw, A. C., Slaaby, R., & Sturis, J. (2008). A novel high-affinity peptide antagonist to the insulin receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *376*(2), 380–3. doi:10.1016/j.bbrc.2008.08.151
- Schechter, R., Whitmire, J., Holtzclaw, L., George, M., Harlow, R., & Devaskar, S. U. (1992). Developmental regulation of insulin in the mammalian central nervous system. *Brain Research*, *582*(1), 27–37. doi:10.1016/0006-8993(92)90313-X
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., ... Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, *9*(7), 676–82. doi:10.1038/nmeth.2019
- Schubert, M., Gautam, D., Surjo, D., Ueki, K., Baudler, S., Schubert, D., ... Brüning, J. C. (2004). Role for neuronal insulin resistance in neurodegenerative diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(9), 3100–5. doi:10.1073/pnas.0308724101
- Schurr, A., Miller, J. J., Payne, R. S., & Rigor, B. M. (1999). An Increase in Lactate Output by Brain Tissue Serves to Meet the Energy Needs of Glutamate-Activated Neurons. *J. Neurosci.*, *19*(1), 34–39. Retrieved from <http://www.jneurosci.org/content/19/1/34.long>
- Schurr, A., & Rigor, B. M. (1998). Brain anaerobic lactate production: a suicide note or a survival kit? *Developmental Neuroscience*, *20*(4-5), 348–57. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9778571>
- Schurr, A., West, C. A., & Rigor, B. M. (1988). Lactate-supported synaptic function in the rat hippocampal slice preparation. *Science (New York, N.Y.)*, *240*(4857), 1326–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3375817>

- Sherwood, C. C., Stimpson, C. D., Raghanti, M. A., Wildman, D. E., Uddin, M., Grossman, L. I., ... Hof, P. R. (2006). Evolution of increased glia-neuron ratios in the human frontal cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(37), 13606–11. doi:10.1073/pnas.0605843103
- Stadler, C., Rexhepaj, E., Singan, V. R., Murphy, R. F., Pepperkok, R., Uhlén, M., ... Lundberg, E. (2013). Immunofluorescence and fluorescent-protein tagging show high correlation for protein localization in mammalian cells. *Nature Methods*, *10*(4), 315–23. doi:10.1038/nmeth.2377
- Steen, E., Terry, B. M., Rivera, E. J., Cannon, J. L., Neely, T. R., Tavares, R., ... de la Monte, S. M. (2005). Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease--is this type 3 diabetes? *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, *7*(1), 63–80. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15750215>
- Stobart, J. L., & Anderson, C. M. (2013). Multifunctional role of astrocytes as gatekeepers of neuronal energy supply. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *7*(April), 38. doi:10.3389/fncel.2013.00038
- Suzanne, M., & Monte, S. M. De. (2012). Contributions of brain insulin resistance and deficiency in amyloid-related neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Drugs*, *72*(1), 49–66. Retrieved from <http://link.springer.com/article/10.2165/11597760-000000000-00000>
- Taha, C., & Klip, A. (1999). The insulin signaling pathway. *The Journal of Membrane Biology*, *169*(1), 1–12. doi:10.1007/PL00005896
- Takahashi, S., Driscoll, B. F., Law, M. J., & Sokoloff, L. (1995). Role of sodium and potassium ions in regulation of glucose metabolism in cultured astroglia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *92*(10), 4616–20. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=41995&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Talbot, K., Wang, H.-Y., Kazi, H., Han, L.-Y., Bakshi, K. P., Stucky, A., ... Arnold, S. E. (2012). Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer's disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline. *The Journal of Clinical Investigation*, *122*(4), 1316–38. doi:10.1172/JCI59903
- Tian, R., Vogel, P., Lassen, N. A., Mulvany, M. J., Andreasen, F., & Aalkjaer, C. (1995). Role of extracellular and intracellular acidosis for hypercapnia-induced inhibition of tension of isolated rat cerebral arteries. *Circulation Research*, *76*, 269–275. doi:10.1161/01.RES.76.2.269
- Torres Aleman, I. (2012). Insulin-like growth factor-1 and central neurodegenerative diseases. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, *41*(2), 395–408, vii. doi:10.1016/j.ecl.2012.04.016

- Trejo, J. L., Carro, E., & Torres-Aleman, I. (2001). Circulating insulin-like growth factor I mediates exercise-induced increases in the number of new neurons in the adult hippocampus. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *21*(5), 1628–34. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11222653>
- Vannucci, R. C., & Vannucci, S. J. (2000). Glucose metabolism in the developing brain. *Seminars in Perinatology*, *24*(2), 107–15. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10805166>
- Vannucci, S. J., Maher, F., & Simpson, I. A. (1997). Glucose transporter proteins in brain: delivery of glucose to neurons and glia. *Glia*, *21*(1), 2–21. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9298843>
- Venge, P., Moberg, L., Björnsson, E., Bergström, M., Långström, B., & Håkansson, L. (2003). Mechanisms of basal and cytokine-induced uptake of glucose in normal human eosinophils: relation to apoptosis. *Respiratory Medicine*, *97*(10), 1109–19. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14561018>
- Walter, H. J., Berry, M., Hill, D. J., & Logan, A. (1997). Spatial and temporal changes in the insulin-like growth factor (IGF) axis indicate autocrine/paracrine actions of IGF-I within wounds of the rat brain. *Endocrinology*, *138*(7), 3024–34. doi:10.1210/endo.138.7.5284
- Wender, R., Brown, A. M., Fern, R., Swanson, R. A., Farrell, K., & Ransom, B. R. (2000). Astrocytic glycogen influences axon function and survival during glucose deprivation in central white matter. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *20*(18), 6804–10. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10995824>
- Wieman, H. L., Wofford, J. A., & Rathmell, J. C. (2007). Cytokine stimulation promotes glucose uptake via phosphatidylinositol-3 kinase/Akt regulation of Glut1 activity and trafficking. *Molecular Biology of the Cell*, *18*(4), 1437–46. doi:10.1091/mbc.E06-07-0593
- Wiesinger, H., Hamprecht, B., & Dringen, R. (1997). Metabolic pathways for glucose in astrocytes. *Glia*, *21*(1), 22–34. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9298844>
- Withers, D. J., & White, M. (2000). Perspective: The insulin signaling system--a common link in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Endocrinology*, *141*(6), 1917–21. doi:10.1210/endo.141.6.7584
- Woods, S. C., & Porte, D. (1977). Relationship between plasma and cerebrospinal fluid insulin levels of dogs. *The American Journal of Physiology*, *233*(4), E331–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/910946>

- Zhao, N., Zhong, C., Wang, Y., Zhao, Y., Gong, N., Zhou, G., ... Hong, Z. (2008). Impaired hippocampal neurogenesis is involved in cognitive dysfunction induced by thiamine deficiency at early pre-pathological lesion stage. *Neurobiology of Disease*, 29(2), 176–85. doi:10.1016/j.nbd.2007.08.014
- Zhao, W.-Q., De Felice, F. G., Fernandez, S., Chen, H., Lambert, M. P., Quon, M. J., ... Klein, W. L. (2008). Amyloid beta oligomers induce impairment of neuronal insulin receptors. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 22(1), 246–60. doi:10.1096/fj.06-7703com
- Zonta, M., Angulo, M. C., Gobbo, S., Rosengarten, B., Hossmann, K.-A., Pozzan, T., & Carmignoto, G. (2003). Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nature Neuroscience*, 6, 43–50. doi:10.1038/nn980