



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO  
POLITÉCNICO NACIONAL

Departamento de Farmacobiología

**“El L-lactato como modulador de la transmisión y plasticidad sináptica en el área CA3 del  
hipocampo”**

Tesis que presenta

M. en C. Gabriel Herrera López

Para obtener el grado de

Doctor en Ciencias en

Neurofarmacología y Terapéutica Experimental

Director de tesis

Dr. Emilio Javier Galván Espinosa

Ciudad de México

Febrero 2021

El presente trabajo de investigación se realizó en las instalaciones del departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, con el apoyo otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través de la beca número 426505

## Artículo I. Contenido

Sección 1.01	Índice de figuras y tablas .....	5
Sección 1.02	Abreviaturas .....	6
Sección 1.03	Resumen .....	7
Sección 1.04	Abstract .....	8
Artículo II.	Introducción .....	9
Sección 2.01	Anatomía hipocampal .....	9
Sección 2.02	Plasticidad sináptica.....	11
(a)	Plasticidad a corto plazo: facilitación.....	12
(b)	Plasticidad a largo plazo: LTP.....	13
Sección 2.03	Requerimientos energéticos para la transmisión sináptica .....	16
(a)	Lactato en el sistema nervioso central .....	17
(b)	Lactato en la obtención de energía .....	18
(c)	Regulación de la producción de lactato.....	21
Artículo III.	Antecedentes .....	23
Sección 3.01	Modulación de funciones cerebrales específicas por lactato .....	23
(a)	Lactato y memoria.....	24
Artículo IV.	Justificación .....	26
Artículo V.	Hipótesis.....	27
Artículo VI.	Objetivos .....	27
Artículo VII.	Material y métodos .....	28
Sección 7.01	Obtención de rebanadas de hipocampo.....	28
Sección 7.02	Registros electrofisiológicos .....	28
Sección 7.03	Diseño experimental.....	29
Sección 7.04	Análisis estadístico.....	30
Sección 7.05	Fármacos .....	30
Artículo VIII.	Resultados .....	31
Sección 8.01	La perfusión de L-lactato induce potenciación sináptica dependiente de receptores NMDA en CA3 .....	33
Sección 8.02	La potenciación inducida por lactato es mediada por la activación de un receptor de lactato.....	38
Sección 8.03	Vías de señalización intracelular necesarias para la potenciación sináptica .....	44

Sección 8.04	El lactato promueve un incremento específico en el acople EPSP-espiga de las células piramidales CA3.....	46
Sección 8.05	El efecto presináptico observado en presencia de lactato es consecuencia de la activación de receptores de adenosina.....	49
Artículo IX.	Discusión .....	51
Sección 9.01	Requisitos para la inducción de potenciación sináptica a largo plazo.....	52
Sección 9.02	Las células piramidales de CA3 expresan un receptor de lactato atípico.....	54
Sección 9.03	El lactato incrementa el acoplamiento EPSP-espiga de las células piramidales de CA3	56
Sección 9.04	Implicaciones fisiológicas.....	59
Artículo X.	Conclusiones.....	60
Artículo XI.	Perspectivas.....	60
Artículo XII.	Bibliografía.....	61

## Sección 1.01 Índice de figuras y tablas

Figura 1. Diagrama de la anatomía de la formación hipocampal.....	9
Figura 2. Conectividad del circuito hipocampal con énfasis en CA3.....	10
Figura 3. Esquema de las aferencias que reciben las neuronas piramidales de CA3.....	12
Figura 4. Diagrama original de la ANLS publicado en 1994.....	18
Figura 5. Importancia de los MCTs en la ANLS.....	20
Figura 6. Modelo de la unión de lactato al receptor HCA1.....	22
Figura 7. Estrategia farmacológica.....	29
Figura 8. Propiedades características de las sinapsis C/A- y MF-CA3.....	32
Figura 9. El lactato desencadena la potenciación sináptica en la sinapsis colateral recurrente de las células piramidales CA3.....	34
Figura 10. Modificaciones presinápticas desencadenadas por la perfusión de lactato.	36
Figura 11. Requisitos postsinápticos para la potenciación sináptica de las células piramidales CA3.....	37
Figura 12. La potenciación sináptica es independiente del metabolismo del lactato.....	40
Figura 13. La potenciación sináptica implica la activación de proteínas Gs.....	43
Figura 14. Cascadas de señalización intracelular necesarias para la potenciación sináptica.....	46
Figura 15. El lactato desencadena un aumento específico de la sinapsis en la probabilidad de disparo en CA3 PC.....	48
Figura 16. La adenosina derivada del metabolismo de lactato es responsable de la depresión presináptica transitoria en CA3.....	50
Figura 17. Modelo propuesto del mecanismo celular de inducción de potenciación sináptica.....	58
Tabla 1. Clasificación de los subtipos de transportadores de monocarboxilatos y expresión orgánica.....	19

## Sección 1.02

## Abreviaturas

3,5-DHBA	Ácido 3,5-dihidroxibenzóico
4-CIN	Ácido- $\alpha$ -ciano, 4-hidroxi cinámico
ANLS	Transporte de lactato astrocito-neurona
AP	Potencial de acción
C/A	Comisural de asociación
CTX	Toxina del cólera
CV	Coefficiente de variación
EPSC	Corriente postsináptica excitadora
EPSP	Potencial postsináptico excitador
HCA1	Receptor a hidroxiaácidos carboxílicos 1
Lac	L-lactato
LCRA	Líquido cefalorraquídeo artificial
LDH	Lactato deshidrogenasa
LTP	Potenciación a largo plazo
MCT	Transportador de monocarboxilatos
MF	Fibras musgosas
n.s.	No significativo
PT	Toxina pertussis
PTX	Picrotoxina
SNK	Student Newman Keuls

## Sección 1.03      Resumen

La actividad neuronal dentro del rango fisiológico estimula la producción de lactato que, a través de vías metabólicas u operando a través de una serie de receptores acoplados a proteína G, regula la excitabilidad intrínseca y la transmisión sináptica. El descubrimiento reciente de que el lactato ejerce un control estricto: a) de los canales iónicos, b) la liberación de neurotransmisores y c) las cascadas de señalización intracelular relacionadas con la plasticidad sináptica; por lo que se abre la posibilidad de que el lactato regule la potenciación a largo plazo en las sinapsis centrales. En este trabajo, demuestro que el lactato extracelular (1-2 mM) induce la potenciación glutamatérgica en la sinapsis comisural de asociación de las células piramidales de la región CA3 del hipocampo. Esta potenciación es independiente del transporte de lactato y de su posterior metabolismo. Nuestros datos sugieren que su acción se ejerce mediante la activación de un receptor y requiere la activación de los receptores NMDA, la acumulación de calcio postsináptico y la activación de un receptor acoplado a proteína G sensible a la toxina del cólera. También encontramos que el ácido 3,5-dihidroxibenzoico, un agonista del receptor de lactato imita esta forma de potenciación. El mecanismo de transducción subyacente a esta nueva forma de plasticidad sináptica requiere subunidades  $\beta\gamma$  de la proteína G, inositol-1,4,5-trifosfato 3-quinasa, PKC y CaMKII. La activación de estas cascadas de señalización está compartimentada de una manera específica en la sinapsis comisural de asociación, ya que el lactato no induce potenciación en las sinapsis de fibras musgosas de las células piramidales CA3. La potenciación de esta sinapsis, mediante lactato se refleja en un aumento de la descarga de salida de las neuronas piramidales de CA3 cuando la red comisural de asociación se activa repetidamente durante la perfusión de lactato. Este estudio proporciona nuevos conocimientos sobre los mecanismos celulares por los que el lactato actúa a través de un receptor de membrana y contribuye al proceso de potenciación sináptica, lo que sugiere que está implicado en la formación de la memoria.

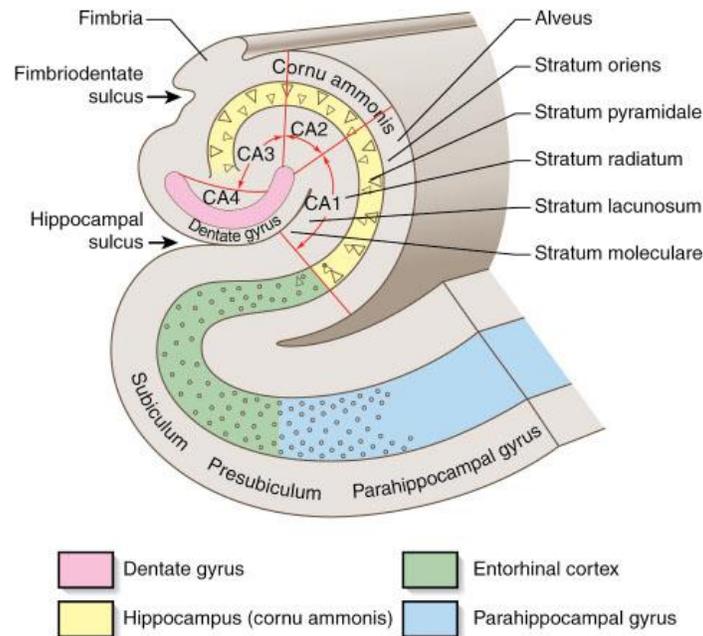
## Sección 1.04    Abstract

Neuronal activity within the physiologic range stimulates lactate production that, via metabolic pathways or operating through an array of G-protein-coupled receptors, regulates intrinsic excitability and synaptic transmission. The recent discovery that lactate exerts a tight control of: a) ion channels, b) neurotransmitter release, and c) synaptic plasticity-related intracellular signaling cascades; opens up the possibility that lactate regulates long-term potentiation at central synapses. Here, we demonstrate that extracellular lactate (1–2 mM) induces glutamatergic potentiation on the recurrent collateral synapses of hippocampal CA3 pyramidal cells. This potentiation is independent of lactate transport and further metabolism. Our data suggests that lactate actions are exerted by a receptor activation and requires activation of NMDA receptors, postsynaptic calcium accumulation, and activation of a G-protein-coupled receptor sensitive to cholera toxin. We also found that 3,5- dihydroxybenzoic acid, a lactate receptor agonist, mimics this form of potentiation. The transduction mechanism underlying this novel form of synaptic plasticity requires G-protein  $\beta\gamma$  subunits, inositol-1,4,5-trisphosphate 3-kinase, PKC, and CaMKII. Activation of these signaling cascades is compartmentalized in a synapse-specific manner since lactate does not induce potentiation at the mossy fiber synapses of CA3 pyramidal cells. Consistent with this synapse-specific potentiation, lactate increases the output discharge of CA3 neurons when recurrent collaterals are repeatedly activated during lactate perfusion. This study provides new insights into the cellular mechanisms by which lactate, acting via a membrane receptor, contributes to synaptic potentiation and implies that has an active role in the memory formation process.

## Artículo II. Introducción

### Sección 2.01 Anatomía hipocampal

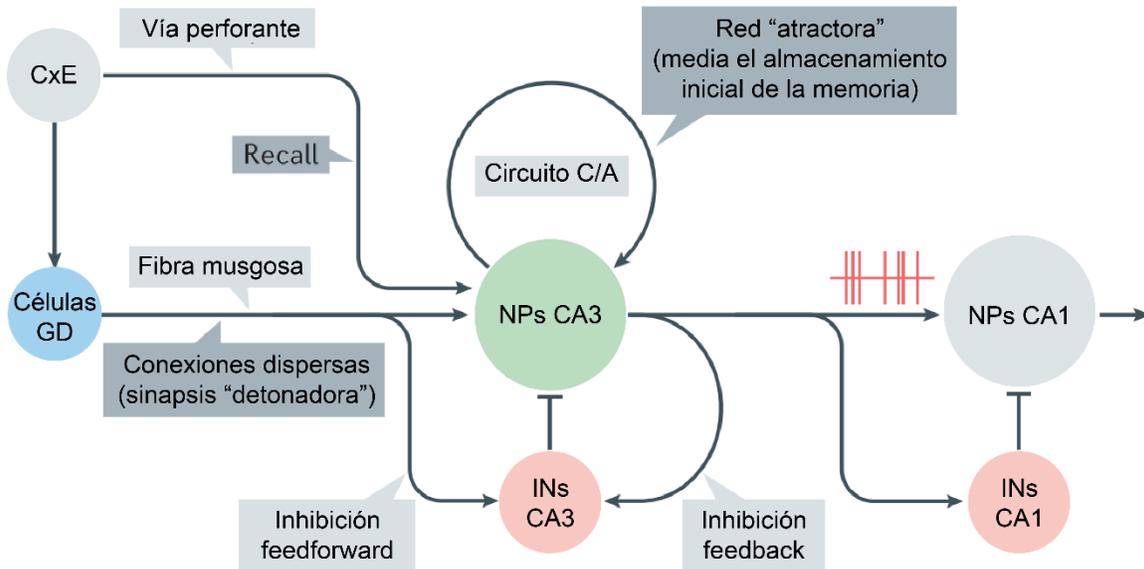
La formación hipocampal es una estructura subcortical del sistema límbico implicada en procesos de aprendizaje y memoria. Está formado por el giro dentado, el hipocampo propiamente dicho, el subiculum, presubiculum y parasubiculum, y la corteza entorrinal.



**Figura 1. Diagrama de la anatomía de la formación hipocampal.** Sección horizontal en la que se indican las capas corticales y los ejes tridimensionales. La formación hipocampal consta del giro dentado (DG, rosa), CA3 (amarillo, primer tercio), CA2 (amarillo, segundo tercio), CA1 (amarillo, tercer tercio) y el subiculum (verde). Adicionalmente se muestra la región parahipocampal (azul). (Modificado de van Strien et al., 2009).

La región de CA3, además, se divide en porciones. En primer lugar a la porción limitada por los bordes del giro dentado que es CA3c; continúa inmediatamente la porción de CA3b, delimitada por la curvatura hipocampal, y termina con la porción de CA3a, donde confluye la región de CA2.

Tradicionalmente, se ha representado al hipocampo como un circuito trisináptico (Corteza entorrinal – GD; GD – CA3 y CA3 – CA1). Sin embargo, la constante investigación acerca de sus conexiones sinápticas ha vuelto arcaica esta noción.



**Figura 2. Conectividad del circuito hipocampal con énfasis en CA3.** CxE: Corteza entorrinal, GD: Giro dentado, NPs CA3: neuronas piramidales de la región CA3, C/A: comisural de asociación, INs CA3: interneuronas de CA3, NPs CA1: neuronas piramidales de la región CA1, INs CA1: interneuronas de CA1. Modificado de (Rebola et al., 2017).

La entrada de información sensorial llega desde la capa II de la corteza entorrinal a través de los axones de la vía perforante al giro dentado. Éstos hacen contacto sináptico excitando las dendritas de las células granulares que proyectan sus axones (fibras musgosas) hacia las dendritas apicales de las neuronas piramidales de CA3. Por su parte, estas neuronas envían proyecciones hacia las células piramidales ipsilaterales de CA1 a través de las colaterales de Schaffer y hacia células contralaterales de CA3 y CA1 a través de conexiones comisurales. Las células piramidales de CA3 están además invadas por una entrada directa de las células de la capa II de la corteza entorrinal. Por último, las dendritas apicales distales de las células piramidales de CA1 reciben una entrada directa de las células de la capa III de la corteza entorrinal como se ilustra en la figura 2 (Neves et al., 2008).

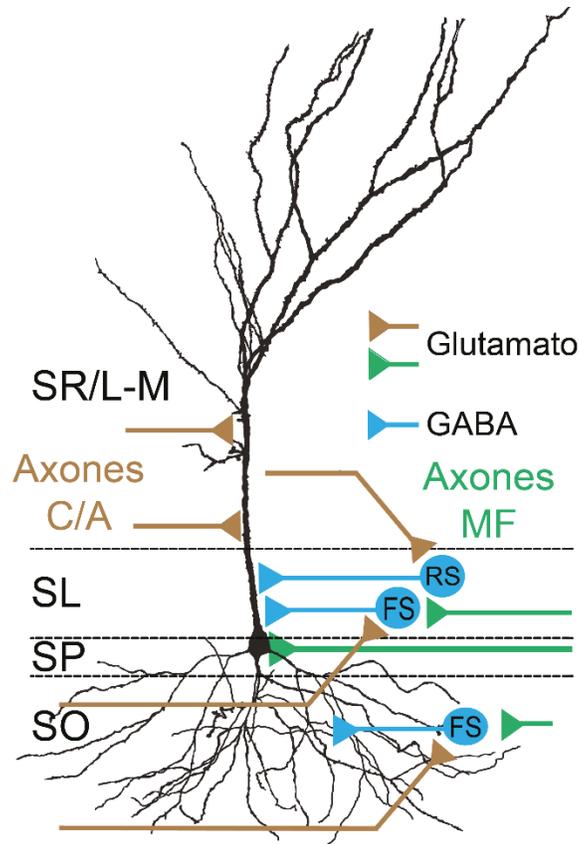
Cada vía sináptica que inerva las neuronas piramidales está restringida a un espacio a diferentes puntos distales a partir del soma. De las dendritas basales, surgen las colaterales de Schaffer que inervan a las neuronas de la región CA1. En la misma región se genera la red de excitación recurrente que estimula las dendritas basales y la parte medial de las dendritas apicales a altura del Stratum radiatum. Las fibras musgosas dibujan el Stratum lucidum e inervan a nivel somático y proximal de las dendritas apicales. Por último, la vía perforante llega a la parte más distal de las dendritas apicales formando el Stratum lacunosum-moleculare (Figura 3).

## Sección 2.02 Plasticidad sináptica

Las neuronas se comunican entre sí mayoritariamente a través de sinapsis químicas. En ellas, un potencial de acción despolariza la membrana presináptica y abre canales de  $\text{Ca}^{2+}$  activados por voltaje. El  $\text{Ca}^{2+}$  que entra a la terminal, promueve la fusión de vesículas y con ello la liberación de su contenido de neurotransmisores que son detectados por receptores en la terminal postsináptica.

Históricamente, se consideraba que la comunicación entre neuronas era un fenómeno de intensidad fija y relativamente estable una vez que maduraban las uniones sinápticas. Sin embargo, 60 años de investigación continua, nos demuestran que, la mayoría de las sinapsis son extremadamente plásticas. Son capaces de modularse dependiendo de la propia actividad o de la actividad de otras neuronas vecinas.

Estos cambios plásticos pueden clasificarse en función de su duración como plasticidad a corto plazo (dura unos cuantos milisegundos a algunos minutos) y plasticidad a largo plazo, que es el nombre genérico que se les da a los cambios en la eficacia de la transmisión sináptica con una duración prolongada, de varios minutos a horas. Si bien en cada caso existen fenómenos que aumentan y otros procesos que disminuyen la eficacia de la transmisión sináptica, para fines de este trabajo nos enfocaremos en los procesos que inducen un aumento de la transmisión.



**Figura 3. Esquema de las aferencias que reciben las neuronas piramidales de CA3.** Las neuronas piramidales del área CA3 del hipocampo reciben conexiones glutamatérgicas provenientes de la corteza entorrinal que conectan con las dendritas distales de las neuronas a altura del Stratum Lacunosum-moleculare. Más abajo, reciben contactos sinápticos con fibras comisurales, y llegan a la altura del Stratum radiatum y directamente a nivel perisomático, siendo además las más numerosas. Finalmente, las neuronas piramidales reciben entradas glutamatérgicas provenientes de las neuronas granulares a altura del Stratum lucidum, las llamadas fibras musgosas.

#### (a) Plasticidad a corto plazo: facilitación

Muchas sinapsis químicas muestran un incremento en la eficacia sináptica o un incremento en la amplitud de potenciales postsinápticos tras la activación repetida. Cuando este incremento se observa en la escala de milisegundos, se llama facilitación. Se puede observar en un par de estímulos, en este caso, el segundo potencial postsináptico (o corriente) puede ser hasta cinco veces mayor que la primera respuesta.

Desde los primeros intentos por explicar la facilitación, los investigadores se dieron cuenta del papel crucial del  $\text{Ca}^{2+}$ . A partir de los estudios pioneros de Katz y Miledi en la unión neuromuscular (Katz and Miledi, 1968), surgió la teoría del calcio residual ya que existe una correlación entre la acumulación de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y la facilitación sináptica. Esta hipótesis estipula que el aumento en el  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  inducido por un potencial de acción a nivel presináptico, desencadena una liberación fásica de neurotransmisores, mientras que el  $\text{Ca}^{2+}$  residual de este evento se suma con el aumento del  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  producido por un segundo potencial de acción y favorece una mayor liberación de neurotransmisores (revisado en Zucker and Regehr, 2002).

(b) Plasticidad a largo plazo: LTP

El primer fenómeno de plasticidad a largo plazo descrito, fue la potenciación a largo plazo (LTP), descubierta por Terje Lømo en 1964 (Lomo, 2003); aunque, sus hallazgos se hicieron públicos hasta casi una década después (Bliss y Lomo, 1973). Es un fenómeno ampliamente distribuido en el sistema nervioso central y actualmente es considerado por muchos como un mecanismo primario para el entendimiento del aprendizaje y la memoria (Kandel, 2001)

(i) Fases de la LTP

La LTP prototípica y la más extensamente estudiada es la que se produce en la sinapsis Shaffer con las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo. Requiere de la activación de receptores glutamatérgicos tipo NMDA. Estos receptores conducen iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ . El incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular a través de los receptores NMDA activa cinasas como la CaMKII y la PKC que fosforilan receptores glutamatérgicos AMPA que subsecuentemente se expresan en la membrana de la neurona postsináptica aumentando la eficacia de la transmisión sináptica.

(ii) *LTP no NMDA*

A pesar de que la LTP que ocurre en la sinapsis Schaffer-CA1 se considera el prototipo de la LTP, no es el único mecanismo que puede encontrarse en el sistema nervioso central. En 1986, Harris y Cotman demostraron que la LTP evocada en la sinapsis fibra musgosa (MF)-CA3 es insensible al antagonismo de los receptores NMDA (Harris and Cotman, 1986), y de hecho, depende de la acción de receptores AMPA, además de que tiene un locus de expresión presináptico.

(iii) *Plasticidad sináptica en los circuitos de CA3*

Aunque ambas regiones hipocámpales se asocian con procesos mnemónicos, y de hecho se cree que juegan un papel crucial en el aprendizaje espacial (Gold and Kesner, 2005; Hagena and Manahan-Vaughan, 2011) el tipo de memoria que se relaciona con cada área es distinto. En línea con esto, la región CA3 del hipocampo, tiene varias diferencias fisiológicas con la región vecina de CA1 en cuanto a sus propiedades plásticas.

(iv) *Plasticidad en el circuito fibras musgosas-CA3*

Las células del giro dentado envían axones no mielinizados llamados fibras musgosas (MF) a lo largo del stratum lucidum, donde hacen contacto con espinas en las dendritas proximales de las neuronas piramidales de CA3. Adicionalmente, las MF hacen contacto sináptico con terminales *en passant* de las interneuronas GABAérgicas.

La sinapsis fibra musgosa es conocida por expresar plasticidad presináptica tanto a corto como a largo plazo. La amplitud de los MF-EPSCs está determinada por el patrón de actividad presináptica, dando lugar a una sinapsis tipo "detonador condicional". Cuando la frecuencia de la actividad de las células del GD es baja (<0.1 Hz), los MF-EPSPs tienen amplitudes pequeñas (insuficientes para desencadenar la descarga de potenciales de acción) debido a la baja probabilidad de liberación típica de la sinapsis. No están claros los mecanismos moleculares que hacen que estos sitios de liberación individuales sean tan

ineficaces a bajas frecuencias de actividad; sin embargo, se cree que el acoplamiento débil entre los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  presinápticos y la maquinaria de liberación permite que los buffers de  $\text{Ca}^{2+}$  endógenos entre los que figuran proteínas de unión a calcio, limiten la probabilidad de liberación inicial. A pesar de esta baja probabilidad de liberación inicial, las sinapsis de una sola fibra musgosa-CA3 son capaces de desencadenar potenciales de acción postsinápticos en respuesta a una breve ráfaga de estimulación presináptica. Estas propiedades de "detonador" se explican por una gran facilitación presináptica a corto plazo que se produce tras la estimulación repetida, la gran cantidad de sitios de liberación, el gran tamaño del conjunto de vesículas y la aparición de liberación multivesicular. Fenómeno que en conjunto es responsable de la marcada facilitación por pulso pareado característica de esta sinapsis (Revisado en Rebola et al., 2017).

La sinapsis MF-CA3 también expresa formas presinápticas de LTP. La MF-LTP se induce presinápticamente y se expresa como cambios presinápticos independientes de NMDAR en la liberación de glutamato. Se han propuesto varios mecanismos moleculares para inducir estas formas de plasticidad. La LTP de la fibra musgosa depende de la producción de AMPc y de la activación de las vías subsecuentes y de la señalización retrógrada a través de las efrinas. *In vivo*, el antagonismo del receptor metabotrópico de glutamato 5 (mGluR5) previene la LTP de fibra musgosa de las fEPSP, lo que sugiere que la activación endógena de mGluR5 facilita la LTP (Rebola et al., 2008).

La sinapsis MF-CA3 expresa receptores NMDA en niveles bajos, lo que explica en parte la LTP inducida por receptores AMPA. Sin embargo, los EPSCs mediados por NMDAR se pueden potenciar selectivamente mediante patrones de estimulación presináptica que no afectan al componente AMPAR de los EPSC. La LTP de los EPSC tipo NMDA depende de la activación de la PKC y SRC, y requiere la activación de los receptores de adenosina A2A y mGluR5 (Kwon and Castillo, 2008; Rebola et al., 2011).

#### *(v) Plasticidad en la sinapsis asociativa CA3-CA3*

La propiedad distintiva de la red CA3 es que media la recuperación de información y puede ser activada por señales parciales o degradadas, un fenómeno conocido como

recuperación autoasociativa o finalización de patrones. Las propiedades plásticas de esta sinapsis van en línea con el modelo de CA1, requiere de la activación de receptores NMDA y canales de calcio tipo L para la inducción de la LTP. Sin embargo, una diferencia notoria y que va en línea con el proceso de terminación de patrones es que un protocolo de inducción de plasticidad dependiente del tiempo de espigas es ancho y simétrico, lo que mejora la potencia computacional de la red, aumentando la confiabilidad de la terminación del patrón y la capacidad de almacenamiento (Mishra et al., 2016).

#### (vi) Control GABAérgico de las células piramidales

Las neuronas piramidales de CA3 reciben entradas GABAérgicas muy fuertes y diversas que regulan la excitabilidad neuronal y controlan la sincronización y las oscilaciones neuronales. Varios tipos de neuronas inhibitoras incluyen “basquet-cells” parvalbúmina (PV) positivas y colecistoquinina-positivas (que forman sinapsis en las dendritas proximales y el soma de las células piramidales), y una gran población de interneuronas incompletamente caracterizadas que inervan las dendritas distales (Freund and Buzsáki, 1996).

Las interneuronas de CA3 en el *stratum lucidum* están inervadas por pequeñas sinapsis de fibras musgosas *en passant* o filopodiales, creando la base anatómica para una fuerte inhibición de retroalimentación conocida en inglés como “feedforward inhibition” (Sloviter, 1991). La manera en que estas interneuronas moldean a la activación de las neuronas piramidales de CA3 depende en gran medida de las propiedades diferenciales de plasticidad a corto plazo de los contactos sinápticos inhibitorios y excitadores involucrados. Así, por ejemplo, las sinapsis MF-interneuronas de CA3 suelen mostrar una mayor probabilidad de liberación y tamaño cuantal que las sinapsis con neuronas piramidales, lo que facilita la transmisión incluso a una frecuencia baja de estimulación presináptica

### Sección 2.03      Requerimientos energéticos para la transmisión sináptica

En términos energéticos, las funciones cerebrales se mantienen gracias al gradiente de glucosa en torrente sanguíneo. El cerebro es el órgano que consume mayor cantidad de

glucosa, alrededor de un 20%, a pesar de que representa el 2% del total del peso corporal (Kety, 1957; revisado en Magistretti and Allaman, 2015). La glucosa se destina a mantener la actividad cerebral, y es prácticamente aprovechada en su totalidad en condiciones de estimulación (Fox et al., 1988; Fox and Raichle, 1986)

En condiciones fisiológicas, la glucosa circulante en el torrente sanguíneo atraviesa fácilmente la barrera hematoencefálica (BHE) gracias a la presencia de proteínas transportadoras que permiten su difusión pasiva, como el transportador GLUT1 (Klepper & Voit, 2002). Sin embargo, las neuronas no tienen acceso directo a la glucosa circulante, están separadas de este recurso por dos barreras endoteliales y dos astrocíticas (Mathiesen, Lehre, Danbolt, & Ottersen, 2010), además de las limitaciones anatómicas, carecen de un proceso glucolítico eficiente en contraposición a la alta demanda de ATP (Lovatt et al., 2007).

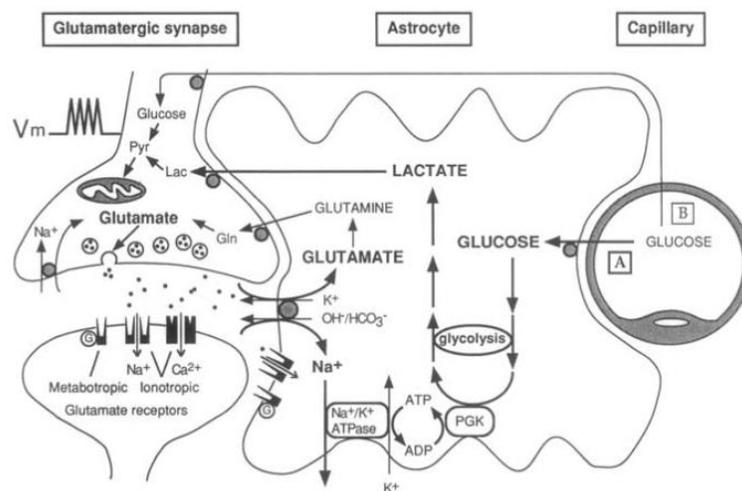
Para subsanar las desventajas anatómicas y metabólicas de las neuronas, los astrocitos se han especializado en realizar la glucólisis. Este tipo celular, más íntimamente ligado a los vasos sanguíneos, oxida la glucosa hasta convertirla en lactato, intermediario metabólico que es transportado al espacio extracelular para ser aprovechado por las neuronas. A este proceso de intercambio del lactato entre astrocitos y neuronas se le conoce como la teoría del disparo de lactato (Brooks, 2009; Pellerin and Magistretti, 1994).

#### (a) Lactato en el sistema nervioso central

El lactato es el monocarboxilato más abundante en el sistema nervioso central (Bergersen, 2007). Se desprende como producto de una vía alterna a la fosforilación oxidativa, y debido a esto, en la década de los noventa se le consideró un desecho, un *cul de sac*. Sin embargo, en estudios de imagen funcional en humanos, se encontró una relación entre la actividad cerebral y el incremento en la concentración de lactato tisular. A partir de ese hecho, se comenzó a pensar en el lactato como una molécula con un papel trascendente.

## (b) Lactato en la obtención de energía

Uno de los estudios pioneros que muestra el papel fisiológico del lactato, fue el realizado por Pellerin y Magistretti en 1994. Estos autores propusieron que el lactato es la forma molecular que aprovechan las neuronas para la síntesis de ATP. Esta noción se ha conocido desde entonces como teoría del transporte de lactato astrocito-neurona (ANLS, por sus siglas en inglés), y afirma que los astrocitos, más íntimamente ligados al endotelio vascular, aprovechan la glucosa circulante en torrente sanguíneo, la oxidan y exportan en forma de lactato, el cual es metabolizado por las neuronas para sintetizar energía y mantener sus funciones, dado que se produce igualmente en presencia de oxígeno, se ha llamado también glucólisis aerobia (Pellerin and Magistretti, 2012, 1994).



**Figura 4. Diagrama original de la ANLS publicado en 1994.** En las sinapsis glutamatergicas, el glutamato despolariza las neuronas actuando en receptores específicos. Una vez que la acción del glutamato termina, es cotransportado al interior del astrocito junto a un ion  $\text{Na}^+$ , lo que echa a andar la bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa. Este fenómeno a su vez activa la glicólisis, aumenta la captación de glucosa y la producción de lactato. El lactato producido es liberado y captado por las neuronas para producir energía. Tomado de (Pellerin and Magistretti, 1994)

El lactato es el producto de la oxidación de la glucosa. Tras la glucólisis, el piruvato obtenido, puede ser metabolizado para obtener acetyl-CoA y echar a andar el ciclo de Krebs. Sin embargo, es posible que la glucosa se oxide de forma parcial para obtener lactato.

Cuando la glucosa es metabolizada en piruvato, éste es susceptible de ser convertido en lactato por la acción de la enzima lactato deshidrogenasa.

El lactato sintetizado en los astrocitos es transportado a las neuronas mediante canales formados por conexinas 43 y 30. Una vez dentro de las neuronas, el lactato se oxida siguiendo la vía ciclo de Krebs-forforilación oxidativa y permite a estas células mantener sus funciones vitales, incluida la comunicación sináptica (Rouach et al., 2008).

*(i) Transportadores de monocarboxilatos en el sistema nervioso central*

Además del tránsito de lactato por las uniones comunicantes entre astrocitos y neuronas, el lactato cuenta con un sistema de proteínas transportadoras conocidas como transportadores de monocarboxilatos (MCT). Existen 14 subtipos de transportadores que van del MCT1-9 y del MCT11-14, además del transportador de aminoácidos tipo T (TAT1) (Pierre and Pellerin, 2005).

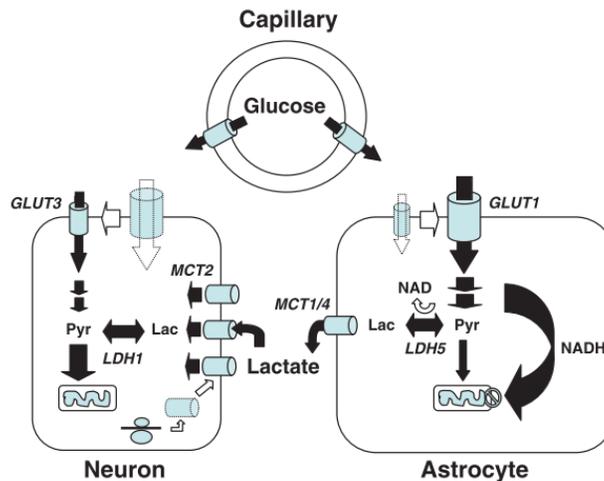
Tipo	Distribución	Localización celular	
		In vivo	In vitro
<b>MCT1</b>	Amplia	Células endoteliales vasculares, endimocitos, astrocitos. Pocas neuronas en rata	Astrocitos, débil en algunas neuronas
<b>MCT2</b>	Corteza, hipocampo, cerebelo	Neuronas, soma de astrocitos de rata	Neuronas, soma de astrocitos de rata
<b>MCT3</b>	Retina	Células epiteliales del plexo coroides y pigmento retiniano	
<b>MCT4</b>	Corteza, cerebelo, estriado, hipocampo	Astrocitos	No determinada

Tabla 1. Clasificación de los subtipos de transportadores de monocarboxilatos y expresión orgánica. Modificado de Pierre y Pellerin, 2005

De los 14 miembros de la familia de MCTs, sólo los tipos 1 a 4 se expresan diferencialmente en las células del sistema nervioso central y son los únicos capaces de transportar lactato

(para revisión, ver Mosienko et al., 2015). En la tabla anterior (tabla 1) se resume la localización de estos MCTs.

Los MCTs son cotransportadores de monocarboxilatos y protones en proporción estequiométrica 1:1. Poseen diferente afinidad por los monocarboxilatos que transportan, por ejemplo, el MCT4 (en astrocitos) tiene relativamente baja afinidad y alta tasa de transporte (Rafiki et al., 2003) lo que lo convierte en un exportador de lactato mientras que el MCT2 (neuronal) tiene mayor afinidad, y se le considera importador (Rae et al., 2009).



**Figura 5. Importancia de los MCTs en la ANLS.** El lactato y otros monocarboxilatos como el piruvato y el  $\beta$ -OH-butirato, son transportados de manera pasiva a través de proteínas conocidas como transportadores de monocarboxilatos o MCTs. Los distintos tipos de MCTs están expresadas de forma diferencial en células endoteliales, astrocitos y neuronas permitiendo así la exportación de lactato producto de la glicólisis desde los astrocitos a través de los MCT1/4 y la importación de éste en las neuronas a través de MCT2. El lactato circulante en torrente sanguíneo también puede ser captado por las neuronas, para eso, debe ser transportado por el MCT1, principalmente, expresado en vasos sanguíneos.

Los MCTs tienen afinidad por fármacos de la familia de los cinamatos como el ácido  $\alpha$ -ciano-4-OH-cinámico y a fármacos antiepilépticos como el estiripentol. Ambos grupos de fármacos bloquean el paso de monocarboxilatos a través de los transportadores.

### (c) Regulación de la producción de lactato

La producción de lactato, así como su liberación y por ende su concentración en el espacio extracelular, varían en función de los recursos disponibles y de los requerimientos en cada momento y condición específica. En términos generales, existen tres señales que regulan la glucólisis aerobia en los astrocitos: glutamato,  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{K}^+$ , cada una de las cuales es liberada por neuronas activas.

Una vez liberado el glutamato de la neurona presináptica, una gran proporción de éste es captado por los astrocitos vía transportadores a aminoácidos excitadores (EAATs) aprovechando un gradiente electroquímico de  $\text{Na}^+$  que introduce tres iones de éstos por cada molécula de glutamato. El gradiente alterado, se reestablece mediante la bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa con gasto de ATP. Enseguida el glutamato se convierte en glutamina (también con gasto de ATP) y se envía a las neuronas. Este proceso favorece la glucólisis no oxidativa y la captura de glucosa circulante por parte de los astrocitos (Magistretti and Allaman, 2015; Pellerin and Magistretti, 2012).

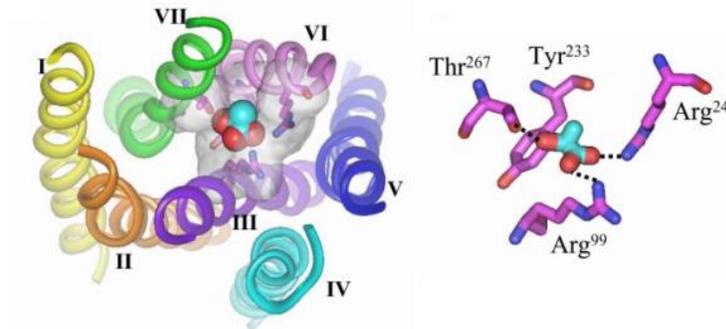
La glutamina se convierte en glutamato dentro de las neuronas mediante una reacción de desaminación que produce  $\text{NH}_4^+$ . Este ion es captado por los astrocitos y previene el consumo de piruvato por la mitocondria al reducir el pH de la matriz mitocondrial. Este proceso de acidificación inhibe el transportador de piruvato mitocondrial con lo que el piruvato se acumula en el citosol y favorece la acumulación y por ende, liberación de lactato, además de la depleción de NADH citosólico que será recuperado a partir de la glucólisis (Lerchundi et al., 2015).

Los mecanismos mencionados arriba, ocurren en el orden de los minutos. Las acciones del  $\text{K}^+$  sobre la modulación de la glucólisis ocurre en el rango de los segundos (Bittner et al., 2011). Este ion es liberado por las neuronas postsinápticas durante activación sináptica normal (Brocard et al., 2013), lo que produce despolarización de la membrana plasmática y alcalinización intracelular en los astrocitos e induce a su vez una respuesta glicolítica rápida (Ruminot et al., 2011).

La regulación de la glucólisis mediada por  $K^+$  se vuelve más compleja dado el descubrimiento de un receptor de lactato, conocido como receptor a hidroxiaácidos carboxílicos (HCA1), cuya activación aumenta conductancias de  $K^+$  y disminuye la excitabilidad neuronal (Bozzo et al., 2013; Herrera-López and Galván, 2018).

(i) *Receptor HCA1*

El receptor HCA1 (antes conocido como GPR81) une lactato con una  $EC_{50}$  de 1 mM, posee siete dominios transmembranales y junto con los tipos 2 y 3, pertenece a la familia de receptores a hidroxiaácidos carboxílicos, los tres subtipos de receptores están acoplados a una proteína  $G_{i/o}$ .



**Figura 6. Modelo de la unión de lactato al receptor HCA1.** Modelado *in silico* por homología de los sitios de unión e interacciones del lactato con el receptor HCA1. Los sitios de unión se localizan entre los segmentos transmembranales TM3, TM6 y TM7 (panel izquierdo). Representación de superficie de los aminoácidos clave para la unión del lactato con su receptor ( $Arg^{99}$ ,  $Arg^{240}$ ,  $Tyr^{233}$ , y  $Thr^{267}$ , panel derecho). Modificado de (Liu et al., 2009)

La farmacología específica de este receptor es muy limitada. Liu et al. (2012) describieron un agonista selectivo conocido como 3,5-dihidroxibenzóico (3,5-DHBA), basado en el modelo *in silico* por homología con receptores  $\beta$ -adrenérgicos y hasta el momento, no se han reportado antagonistas selectivos o nuevos agonistas con mayor afinidad.

Originalmente, el receptor HCA1 fue descrito en tejido adiposo, aunque se confirmó también la expresión del ARNm que codifica para éste en tejido muscular y nervioso (Lee et

al., 2001; Liu et al., 2009). Sin embargo, posteriormente se confirmó la presencia del receptor HCA1 en el sistema nervioso central, particularmente en cerebelo, corteza, hipocampo y estriado. Adicionalmente, se mostró que el HCA1 se encuentra acoplado a un sistema transduccional que inhibe la formación de AMPc cuando el receptor se expresa en un sistema heterólogo como las células HeLa (Lauritzen et al., 2014).

La reducción en la concentración de AMPc ligada a la activación de receptores acoplados a proteína  $G_{i/o}$  (como el HCA1) se relaciona de manera general con la disminución en la excitabilidad neuronal. Este hecho se ha estudiado en células provenientes de corteza (Bozzo et al., 2013) y rebanadas de hipocampo (Herrera-López and Galván, 2018). Se ha propuesto que la activación del HCA1 representa un mecanismo de regulación por retroalimentación negativa del metabolismo energético, al incrementar conductancias de potasio y disminuir la liberación de glutamato (Herrera-López and Galván, 2018).

## Artículo III. Antecedentes

### Sección 3.01 Modulación de funciones cerebrales específicas por lactato

Barros (Barros, 2013), sugiere que *“dado el papel del lactato como sustrato de energía y sus efectos sobre el equilibrio redox, el pH intracelular, el metabolismo local y el flujo sanguíneo, se deduce que prácticamente todas las funciones del cerebro son soportadas o moduladas por el lactato”* Esto, más la descripción de su acción mediante el receptor HCA1 hace del lactato una molécula señalizadora, pero al mismo tiempo lo involucra en una serie de procesos fisiológicos bastante complejas.

Algunos de estos procesos en los que se ha implicado al lactato son la inducción del miedo (Maddock et al., 2009), regulación del ciclo circadiano (Wang et al., 2012), ventilación (Erllichman et al., 2008); modulador de la depresión (Carrard et al., 2018) y de relevancia para este trabajo, participa activamente en los procesos de memoria hipocampal (Newman et al., 2011; Suzuki et al., 2011).

### (a) Lactato y memoria

Varios trabajos han mostrado que el lactato participa en varias etapas de la memoria, principalmente en su formación. En los trabajos de Newman et al., (2011) y Suzuki et al., (2011) muestran que el lactato, producido tras el desdoblamiento del glucógeno almacenado en los astrocitos, es indispensable para la formación de la memoria en los paradigmas de alternancia espontánea y evitación pasiva. En ambos trabajos exponen además que se necesita del intercambio de lactato astrocito-neurona, lo que apoya la ANLS, y concluyen que el lactato participa en la formación de la memoria porque representa una fuente energética.

Sin embargo, en el mismo trabajo por Suzuki et al. (2011) una cantidad equicalórica de glucosa no tuvo los mismos efectos del lactato, de ahí que se pensó en un mecanismo paralelo específico para el lactato. Años más tarde, se mostró que el lactato, a concentraciones de 10 mM, modula la expresión de genes asociados a la memoria a largo plazo como *Arc*, *Zif268* (Yang et al., 2014) y otros genes asociados a la vía de señalización de las MAPK (Margineanu et al., 2018) tras inducir la potenciación de las corrientes NMDA de forma dependiente del potencial redox intracelular. Si bien este mecanismo es bastante replicable en neuronas corticales, en otras áreas cerebrales, el lactato parece tener un mecanismo totalmente diferente.

Tang et al. (2014), describieron el efecto de un receptor de lactato cuya activación en neuronas del *locus coeruleus*, incrementa la excitabilidad neuronal. Este receptor putativo está acoplado a una proteína  $G_s$ . Mostraron que el lactato promueve la liberación de noradrenalina. La activación del *locus coeruleus* del tronco encefálico por el lactato derivado del glucógeno probablemente también estimula la glucogenólisis mediada por noradrenalina en todo el cerebro, promoviendo así la producción de energía astrocítica y las actividades de señalización durante la vigilia.

Se ha pensado que un receptor similar al lactato podría existir en el hipocampo y tener un papel en la consolidación de la memoria provocada por los niveles extracelulares de lactato (Dienel, 2015). De hecho, hay evidencia que podría sugerir que existe. Hace

algunos años, se describió que el 3,5-DHBA (agonista del receptor a lactato HCA1) induce un efecto excitador sobre las respuestas sinápticas evocadas en la región de CA3; sin embargo, los autores de dicho hallazgo, no prestaron mayor atención al efecto del lactato sobre la transmisión sináptica (Angamo et al., 2016).

Pareciera, sin embargo, existir una contradicción, ya que Suzuki et al. (2011) afirmaron que el lactato no se requiere en procesos de memoria a corto plazo cuando la región CA3 se asocia más a memoria de este tipo. En este reporte, los investigadores analizaron un tipo de memoria a corto plazo asociada al condicionamiento al miedo que involucra otras áreas cerebrales además del hipocampo, como la amígdala. El tratamiento con DAB, un inhibidor de la producción de lactato no tuvo efecto en la fase de entrenamiento de esta prueba; sin embargo, la generalización hecha por los autores sobre que el lactato no participa en procesos de memoria a corto plazo es bastante aventurada ya que sólo se centraron en un proceso.

## Artículo IV. Justificación

El lactato ha sido estudiado, desde su descubrimiento como participante en el proceso metabólico; sin embargo, se ha dejado de lado su papel en la señalización intercelular e intracelular. Cuando se descubrió el lactato, nunca se pensó en la posibilidad de que sus acciones estuvieran ligadas a la activación de cascadas de segundos mensajeros por unión directa de éste con un receptor.

Actualmente, la literatura existente en torno a las acciones del lactato aborda su participación en el metabolismo con consecuentes alteraciones en el aporte calórico, cambios en el potencial redox o en el pH intracelular y más recientemente por acciones de otros metabolitos. Es claro que el lactato no solo tiene un papel como aportador de energía, y que de hecho funge como un punto de concordancia y retroalimentación que liga el metabolismo con otras funciones neuronales, como la transmisión sináptica. Uno de los principales nodos de integración metabolismo-actividad neuronal es receptor de lactato llamado HCA1.

Aún no está claro hasta qué punto distinguir un mecanismo metabólico y de un mecanismo transduccional (por activación de receptores y cascadas de segundos mensajeros) cuando ambas acciones parecen ocurrir de manera paralela.

Este proyecto tiene la finalidad de estudiar las acciones del lactato sobre la transmisión glutamatérgica en la región CA3 e identificar mecanismos de acción metabólica y mediados por la activación de un receptor. Con lo anterior, sentar las bases para entender el papel del lactato en procesos de plasticidad sináptica que podrían asociarse a memoria a corto plazo propia de esta región, fundamentado en las observaciones hechas por Angamo, et al. en el 2016.

La región de CA3 representa un modelo de interés para el estudio de las acciones del lactato debido a la convergencia de al menos dos entradas sinápticas glutamatérgicas diferentes sobre las neuronas piramidales: la sinapsis MF-CA3 conocida por expresar un mecanismo de inducción de plasticidad a largo plazo dependiente de la activación de

receptores AMPA, cuya interacción con el lactato aún se desconoce; y por otra parte, la sinapsis C/A, más similar a la sinapsis prototípica y la más estudiada Schaffer-CA1, dependiente de la activación de receptores NMDA, para los cuales se ha reportado una fuerte dependencia con las acciones del lactato.

## Artículo V. Hipótesis

El L-lactato, perfundido de manera aguda en el LCRA que baña el tejido, inducirá procesos de plasticidad sináptica a largo plazo en el área CA3 del hipocampo, a través de mecanismos ligados a señalización neurometabólica *in vitro*.

## Artículo VI. Objetivos

*Objetivo general.* Caracterizar los efectos de la perfusión transitoria de L-lactato sobre la transmisión sináptica de la región CA3 y los mecanismos celulares que subyacen a dichos efectos.

### **Objetivos específicos**

1. Caracterizar el efecto del L-lactato sobre las respuestas sinápticas de las neuronas piramidales de CA3 evocadas por estimulación de las fibras comisurales de asociación y de las fibras musgosas.
2. Explorar los mecanismos celulares que subyacen a los procesos de plasticidad sináptica inducidos por L-lactato.
3. Explorar el papel de la glía en las acciones del L-lactato sobre la transmisión sináptica

## Artículo VII. Material y métodos

### Sección 7.01 Obtención de rebanadas de hipocampo

Se usaron ratas macho de la cepa Sprague-Dawley de 3 a 4 semanas de edad expuestas a un ciclo normal luz oscuridad (12h/12h) con agua y alimento ad libitum. Los animales son anestesiados con pentobarbital sódico (60 mg/kg, i.p.) y tras conseguir anestesia profunda, se decapitan para extraer el cerebro. El cerebro se recibe en líquido cefalorraquídeo artificial modificado con la siguiente composición: (mM): sacarosa 210, KCl 2.8, MgSO<sub>4</sub> 2, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.25, NaHCO<sub>3</sub> 26, D-glucosa 10, MgCl<sub>2</sub> 1 y CaCl<sub>2</sub> 1 se cortan las secciones del cerebro que contengan al hipocampo y estructuras circundantes para realizar cortes transversales de 385 µm de grosor utilizando un vibratomo Leica VT1000 S. Las rebanadas obtenidas de esta forma se colocan en una solución de incubación con la siguiente composición (mM): NaCl 125, KCl 2.5, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.25, NaHCO<sub>3</sub> 25, MgCl<sub>2</sub> 4, D-glucosa 10 y CaCl<sub>2</sub> 1; a 34° por 30 min y 90 min a temperatura ambiente para permitir que se estabilicen.

### Sección 7.02 Registros electrofisiológicos

Las rebanadas se transfieren a una cámara de registro perfundida continuamente a una velocidad de 2-3 ml/min con líquido cefalorraquídeo artificial (LCRA) con la siguiente composición (mM): NaCl 125, KCl 2.5, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.25, NaHCO<sub>3</sub> 25, MgCl<sub>2</sub> 2, D-glucosa 10 y CaCl<sub>2</sub> 2; la solución preparada de esta forma se gasea constantemente con 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> para mantener un pH=7.4.

Con ayuda de un microscopio Nikon FN-S2N, adosado a una cámara infrarroja de contraste de interferencia, se seleccionaron neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo para realizar registros de patch clamp en la configuración de célula completa.

Se usaron pipetas de borosilicato, estiradas con un estirador horizontal Flaming-Brown P-97 (Sutter Instrument Co.) para obtener una resistencia final de 3-5 MΩ. Los

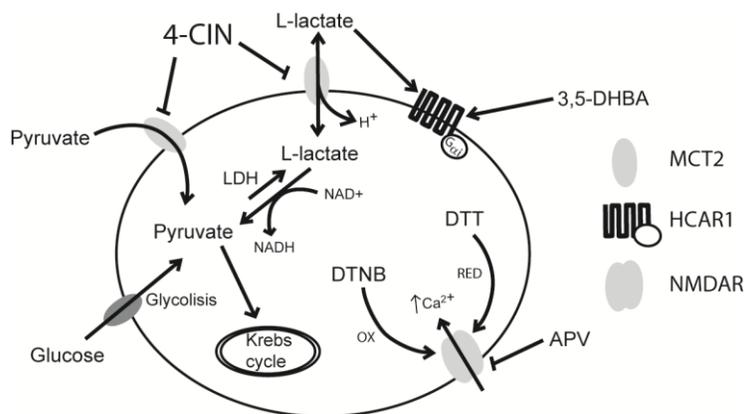
electrodos se llenaron con una solución con la siguiente composición (mM): Cs<sup>+</sup>-Metanosulfonato 120, KCl 10, EGTA 0.5, HEPES 10, Mg<sup>2+</sup>-ATP 4, Na<sup>+</sup>-GTP, 0.3, fosfocreatina 8; la solución es ajustada a pH 7.2-7.26 con HCl o CsOH según corresponda.

Los registros se realizaron usando un amplificador Axopatch 1C o 1D (Molecular Devices) y digitalizados con una Digidata 1440A (Axon) y un software pClamp 10.4 (Molecular Devices) para su posterior análisis.

### Sección 7.03 Diseño experimental

Para caracterizar el efecto del lactato sobre la transmisión sináptica de la región CA3, se usaron electrodos bipolares de nicromo de 38 μm de diámetro y se colocaron sobre la capa granular del giro dentado o sobre el *stratum radiatum* de CA3a para estimular eléctricamente y evocar respuestas provenientes de las fibras musgosas o de las fibras comisurales de asociación, respectivamente.

Tras obtener una respuesta estable, se registraron 10 minutos de actividad basal, seguido de la perfusión de L-lactato solo o en presencia de fármacos agonistas o antagonistas (ver diagrama en la fig. 7), durante 10 minutos. Terminado este tiempo, se retiraron los fármacos del medio y se siguió el registro por al menos 30 minutos más. Todos los experimentos se realizaron en presencia de picrotoxina (50 μM) para bloquear las respuestas GABAérgicas provenientes de las interneuronas.



**Figura 7. Estrategia farmacológica.** Diagrama de los sitios de interacción del lactato o metabolitos relacionados, así como los agonistas y bloqueadores selectivos de las proteínas más

importantes. MCT2, transportador de monocarboxilatos 2; HCAR1, receptor a hidroxiácidos carboxílicos 1; NMDAR, receptor glutamatérgico tipo NMDA; 4-CIN, ácido- $\alpha$ -cianohidroxicinámico; LDH, lactato deshidrogenasa; DTT, ditiotreitolo; DTNB, ácido di-tio-bis, nitrobenzólico.

#### Sección 7.04 Análisis estadístico

Los datos se expresan como la media  $\pm$  e.e o el rango intercuartil de los datos crudos obtenidos en intervalos de 10 minutos de adquisición de datos. En el caso de los grupos pareados, se realizó una prueba t de Student para muestras pareadas o un análisis de varianza ANOVA de dos vías para medidas repetidas seguida de la prueba post hoc Student-Newman-Keuls, según corresponde, a menos que se especifique otra prueba.

Para analizar los grupos independientes, se realizó un análisis de varianza ANOVA de una vía seguida de la prueba post hoc Student-Newman-Keuls y se consideró diferencia entre los grupos cuando  $p < 0.05$ .

#### Sección 7.05 Fármacos

Todos los productos químicos y fármacos se obtuvieron de Sigma-Aldrich Chemicals Co. (St. Louis, MO, EE. UU.) y se prepararon directamente en la solución requerida. La galeína, el ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico (4-CIN), el U73122, la wortmanina y la queleritrina se diluyeron directamente en DMSO para obtener una solución stock y luego se diluyeron en líquido cefalorraquídeo artificial o solución intracelular (según sea necesario) hasta la concentración requerida. La concentración final de DMSO siempre estuvo por debajo del 0,5%. Las alícuotas preparadas en DMSO se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  y se usaron dentro de la siguiente semana de preparación, en el caso de la wortmanina, se empleó el fármaco sólo dos días después de su preparación en DMSO. La toxina pertussis (Millipore) se diluyó en glicerol como una solución stock y se mantuvo a  $-4^{\circ}\text{C}$ .

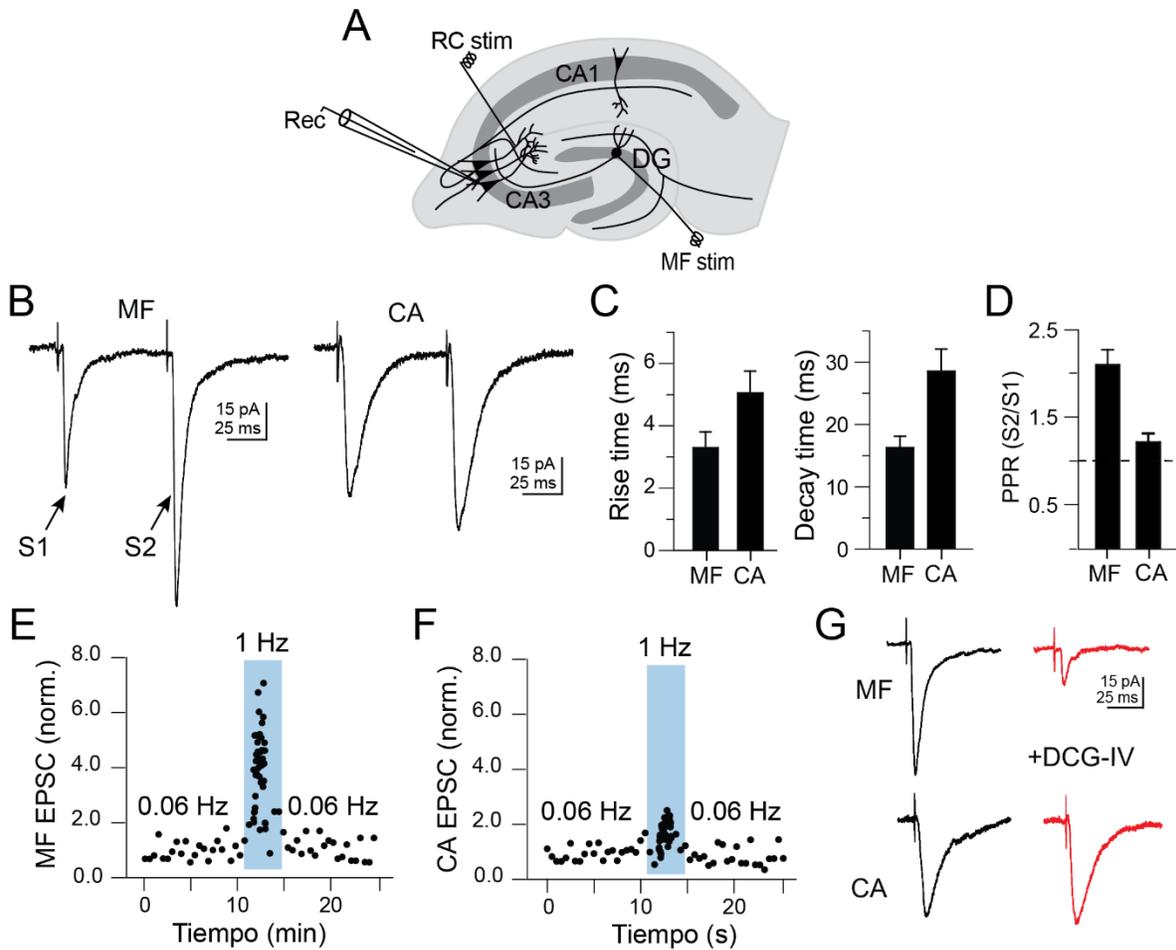
## Artículo VIII. Resultados

Se obtuvieron EPSCs evocados en las sinapsis C/A- y MF-CA3 que se distinguen por su localización anatómica, propiedades cinéticas, plasticidad a corto plazo y farmacología. En la figura 8 se resumen dichas propiedades. Los EPSCs se obtuvieron mediante electrodos localizados de acuerdo con el diagrama de la figura 8 (figura 8A), algunos experimentos se hicieron evocando las respuestas de ambas sinapsis sobre una sola neurona, pero la mayoría se hizo de manera independiente.

Las respuestas evocadas en la sinapsis C/A-CA3 se caracterizan por su cinética lenta, debida a la mayor expresión de receptores NMDA, así como un índice de facilitación por pulso pareado cercano a 1, mientras que la cinética de las respuestas sinápticas evocadas en la MF es más rápida ya que está predominantemente compuesta de receptores AMPA y muestra un índice de facilitación por pulso pareado de alrededor de 2 (figura 8B-D).

Ambas sinapsis responden diferente a la frecuencia de estimulación. Los EPSCs se obtienen a 0.06 Hz, cuando se incrementa la frecuencia de estimulación a 1 Hz, los EPSCs evocados en la sinapsis C/A incrementan su amplitud en alrededor de un 150% (figura 8F), mientras que el mismo protocolo aplicado en la fibra musgosa induce un incremento en la amplitud de la respuesta de alrededor de 800% de la amplitud basal como se muestra en la figura 8E.

Además de lo anterior, ambas sinapsis tienen propiedades farmacológicas distinguibles. La sinapsis MF-CA3 expresa de manera basal los receptores glutamatérgicos metabotrópicos del grupo II (mGluRII), a diferencia de la sinapsis C/A-CA3 que carece de ellos. Son receptores acoplados a proteína  $G_{i/o}$ , por lo que su activación con un agonista específico como el DCG-IV, inhibe de manera selectiva la respuesta evocada en la MF (ver figura 8G).



**Figura 8. Propiedades características de las sinapsis C/A- y MF-CA3.** **A)** Representación esquemática del corte de hipocampo que muestra el arreglo de los electrodos. Las fibras musgosas se estimularon (estimulación MF) en la hoja superior del giro dentado (DG), mientras que la sinapsis comisural de asociación (estimulación C/A) se estimuló en el stratum radiatum del área CA3. La adquisición en conjunto de las respuestas evocadas se realizó con un retraso de 1 s entre la estimulación de MF y C/A y los registros de whole cell se restringieron a las células piramidales (PC) ubicadas en la sección CA3b de la formación hipocampal. **B)** Trazos representativos de las respuestas sinápticas evocadas por un protocolo de estimulación pareada. En cada caso se evocan dos respuestas sinápticas con un intervalo interestímulo de 60-70 ms. Por un lado, las respuestas sinápticas evocadas en la sinapsis C/A tienen una cinética lenta característica de los receptores NMDA, mientras que las propias evocadas en la MF son más rápidas, característica de los receptores AMPA. **D)** El protocolo de estimulación por pulso pareado hace que la segunda respuesta sea de mayor amplitud que la primera respuesta obteniéndose un índice de facilitación de aproximadamente 1.3 en el caso de la sinapsis C/A y de alrededor de 2 para la sinapsis MF. **E y F**

muestran los cambios en la amplitud de las respuestas sinápticas tras incrementar la frecuencia de estimulación. La sinapsis MF puede crecer hasta 1000% de la respuesta basal, no así la sinapsis C/A.

**G)** Trazos representativos que muestran la sensibilidad de las respuestas evocadas en la sinapsis MF a la acción de un agonista de los receptores mGluRII, como el DCG-IV. Nótese la carencia de efecto al aplicar este agonista sobre la sinapsis C/A.

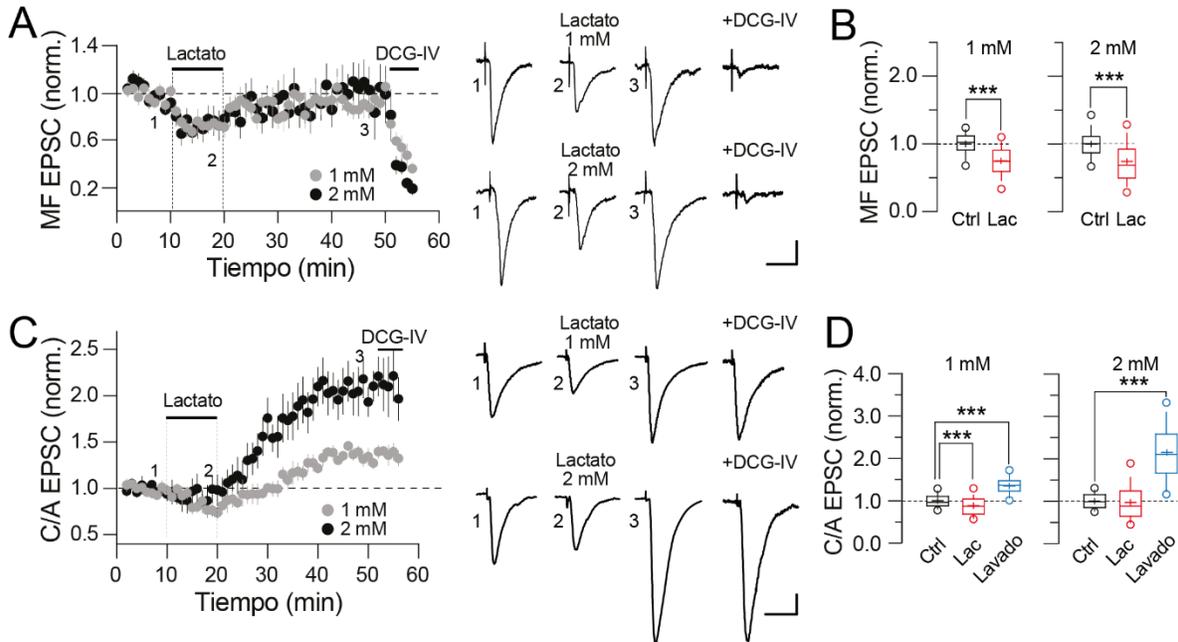
### Sección 8.01 La perfusión de L-lactato induce potenciación sináptica dependiente de receptores NMDA en CA3

Una vez que se garantiza el origen de las respuestas sinápticas evocadas, examinamos el efecto del lactato sobre los EPSC de las células piramidales de CA3 (CA3 PC) evocados en la sinapsis fibra musgosa (MF EPSC) y la sinapsis comisural de asociación (C/A EPSC). Primero, realizamos un análisis en tándem para determinar los efectos del lactato en la transmisión sináptica que converge en las células piramidales de CA3 PC.

Para aislar la transmisión glutamatérgica, los experimentos se realizaron en presencia de picrotoxina (50  $\mu$ M), a menos que se especifique lo contrario. Después de registrar una línea basal estable de 10 minutos de los EPSCs evocados en ambas sinapsis, perfundimos lactato (1 mM o 2 mM) durante 10 minutos, seguido de un lavado que continuó hasta 35 minutos. Como se resume en el gráfico del curso temporal de la Fig. 9A, la perfusión de lactato deprimió transitoriamente los MF EPSCs; tras el lavado, la respuesta sináptica volvió a su valor inicial (MF EPSC en presencia de lactato 1 mM =  $74.2 \pm 2.7\%$  de la respuesta inicial,  $n = 8$ ; en presencia de lactato 2 mM =  $74.2 \pm 3.4\%$  de la respuesta inicial,  $n = 10$ ; Figuras 1B, 1C). Para verificar el origen MF de la respuesta sináptica, perfundimos el agonista mGluR del grupo II, DCG-IV (5  $\mu$ M) (Kamiya and Ozawa, 1999; Yoshino et al., 1996). Como era de esperarse, la perfusión de DCG-IV deprimió la respuesta evocada (MF EPSC en presencia de DCG-IV =  $9.1 \pm 3.4\%$  de la respuesta inicial).

Por otro lado, en presencia de L-lactato 1 mM (10 min), se observó la disminución en la amplitud del C/A-EPSC ( $72.76 \pm 5.7\%$  de la respuesta basal). Durante el lavado, la respuesta sináptica se potencia hasta un  $122.38 \pm 8.1\%$  de la respuesta basal y se mantiene por al menos 30 min (fig. 9C-D, símbolos grises,  $n=7$  células). Al seguir el mismo protocolo, esta

vez perfundiendo L-lactato 2 mM, no se observa la disminución de la amplitud del C/A-EPSC como lo ocurrido en presencia de la concentración menor; sin embargo, tras el lavado del lactato, la respuesta sináptica se potencia alcanzando valores de  $188.57 \pm 23.4\%$  de la basal y se mantuvo por al menos 30 min (fig. 9C-D, símbolos negros, n=10 células).



**Figura 9. El lactato desencadena la potenciación sináptica en la sinapsis colateral recurrente de las células piramidales CA3. A)** Curso temporal que muestra los efectos del lactato (1 o 2 mM; símbolos grises y negros, respectivamente) en el MF EPSC. Las barras sobre el curso temporal indican la perfusión de lactato y DCG-IV, respectivamente. El panel de la derecha muestra trazos representativos de MF EPSCs (promediadas a partir de 5 barridos continuos) en control (1), durante la perfusión de lactato (2), 30 min después del lavado de lactato (3) y en presencia de DCG-IV. **B)** Gráficos de caja que resumen las acciones del lactato sobre los MF EPSCs (prueba t pareada, \*  $p < 0.05$  vs basal). **C)** Curso temporal que muestra los efectos del lactato (1 o 2 mM; símbolos grises y negros, respectivamente) sobre los C/A EPSCs. Los trazos representativos de C/A EPSCs (promediados a partir de cinco barridos continuos) muestran los efectos del lactato en las dos concentraciones probadas. **D)** Gráficos de caja que resumen las acciones del lactato sobre los C/A EPSCs (ANOVA de una vía, SNK, \*  $p < 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ).

Tomando en cuenta que las respuestas anteriores se evocaron utilizando pulsos pareados (ISI = 70 ms), también analizamos el índice de facilitación por pulsos pareados

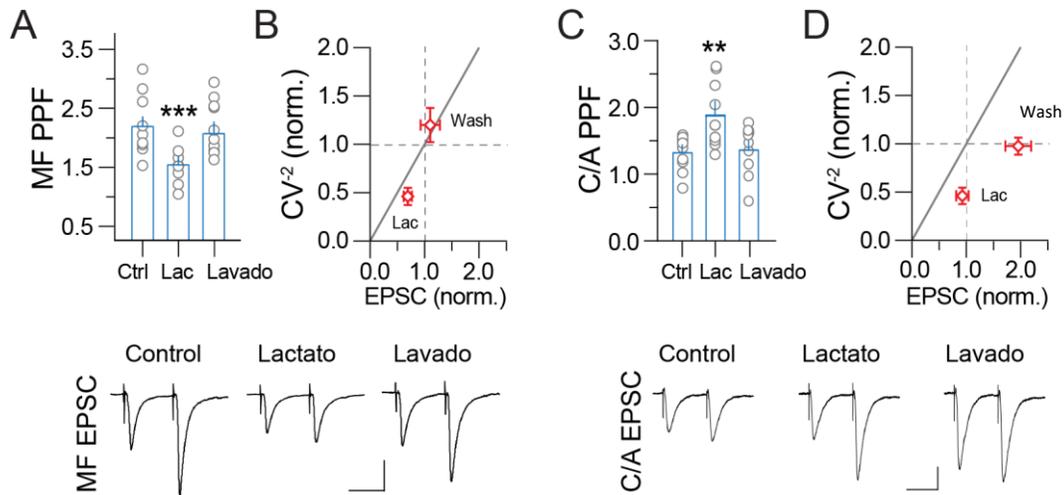
(PPR) y el coeficiente de variación ( $CV^{-2}$ ) en ambas sinapsis. Estos análisis tienen como objetivo identificar el sitio de acción del lactato exógeno adicionado. Como se ilustra en la Fig. 10A, el MF PPR disminuyó durante la perfusión de lactato y volvió al valor inicial durante el lavado (MF PPR basal =  $2.2 \pm 0.2$ ; durante la perfusión de lactato =  $1.5 \pm 0.14$ ,  $p < 0.05$ ; lavado =  $2.1 \pm 0.3$ ;  $n = 10$ ). En línea con esta observación, el lactato redujo también el coeficiente de variación ( $CV^{-2}$ ) de los MF EPSCs ( $CV^{-2}$  durante la perfusión de lactato =  $46.06 \pm 8.9\%$ ;  $CV^{-2}$  durante el lavado =  $119.8 \pm 17\%$ ; Fig. 10B).

En la sinapsis C/A, el lactato aumentó transitoriamente el PPR, que volvió a su basal durante el lavado (C/A PPR basal =  $1.3 \pm 0.12$ ; durante la perfusión de lactato =  $1.88 \pm 0.2$ ,  $p < 0.05$ ; lavado =  $1.32 \pm 0.23$ ;  $n = 9$ ; Fig. 10C). Asimismo, la perfusión de lactato provocó una disminución transitoria del C/A  $CV^{-2}$ , que volvió al valor basal durante el lavado ( $CV^{-2}$  durante la perfusión de lactato =  $45.9 \pm 8.5\%$ ;  $CV^{-2}$  al lavado =  $97.5 \pm 8.7\%$ ; fig. 10D).

En conjunto, los cambios en el PPR y el  $CV^{-2}$  indican que el lactato actúa a nivel presináptico. Además, ya que la potenciación de la sinapsis C/A no va acompañada de un cambio persistente en el PPR o el  $CV^{-2}$ , nuestros experimentos también sugieren que se necesita un mecanismo postsináptico para inducir la potenciación sináptica.

Para comprobar que la potenciación sináptica inducida por lactato sigue un mecanismo de inducción pre- o postsináptico, realizamos la siguiente serie de experimentos. Primero, la perfusión de lactato durante 10 min se pareó con la hiperpolarización de la neurona postsináptica hasta  $-100$  mV, con esta manipulación esperamos afectar canales dependientes de voltaje. Enseguida, se regresó el potencial de membrana en reposo a  $-70$  mV como en el resto de los experimentos y se permitió el lavado del lactato durante 5 minutos. Esta maniobra impidió que se indujera la potenciación sináptica. Después, en la misma neurona, se volvió a perfundir lactato por 10 minutos manteniendo el potencial de la célula a  $-70$ , como en el resto de los experimentos, esta vez, la perfusión del monocarboxilato logró inducir el incremento en la eficacia sináptica esperado (figura 11A). Esto nos dice que la potenciación sináptica requiere de la activación de un mecanismo dependiente de voltaje en la neurona postsináptica para que se induzca.

Además, esta manipulación no alteró el mecanismo presináptico de acción del lactato ya que se observó el cambio esperado en el PPR (figura 11C).



**Figura 10. Modificaciones presinápticas desencadenadas por la perfusión de lactato.**

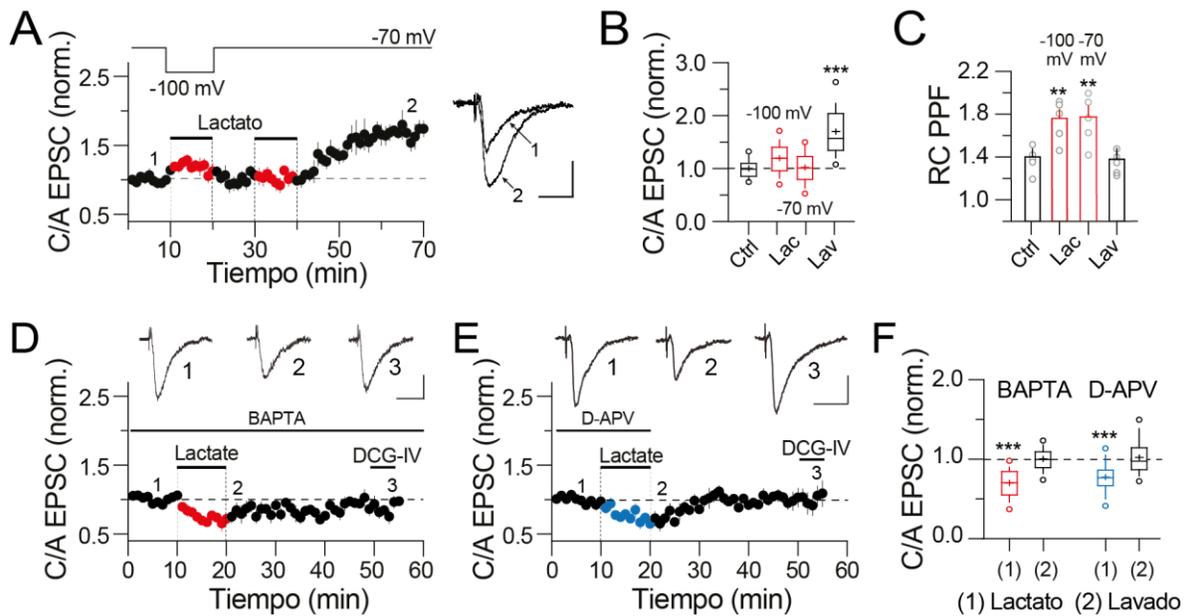
Análisis de la relación de pulsos pareados y  $CV^{-2}$  de **A – B)** MF EPSC y **C – D)** C/A EPSC en condiciones control, durante la perfusión de lactato (2 mM) y a los 30 min de lavado de lactato. Los paneles inferiores muestran los pares de EPSCs representativos en cada condición evocado con un ISI de 70 ms. La perfusión de lactato desplaza el  $CV^{-2}$  por debajo de las líneas de identidad (líneas horizontales y diagonales), lo que indica una acción presináptica. (ANOVA de una vía, SNK, \*  $p < 0.05$ ).

Además de los canales iónicos sensibles a voltaje, el receptor NMDA también tiene dependencia al voltaje, debido a la presencia de un ion  $Mg^{2+}$  que mantiene al receptor inactivo a voltajes hiperpolarizados, además, este receptor es central en la inducción de LTP en esta sinapsis y se ha descrito como el blanco molecular sobre el que actúa el lactato (Yang et al., 2014). Con esto en mente, en el siguiente experimento, la perfusión de lactato se realizó en presencia de APV (100  $\mu M$ ), antagonista de los receptores NMDA. Como era de esperarse, el lactato no logró inducir la potenciación sináptica esperada. Sin embargo, se desenmascaró un fenómeno paralelo, una disminución transitoria de la amplitud de los C/A-EPSCs (figura 11E).

La activación de los receptores NMDA, permite el incremento en la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular, lo que facilita la inducción de la LTP, así que, en la siguiente serie de experimentos, se difundió BAPTA en la neurona postsináptica por alrededor de 15 min, que

es el tiempo en el que la corriente  $I_{AHP}$  (una corriente de  $K^+$  activada por  $Ca^{2+}$ ) fue abolida (datos no mostrados). Similar a lo que observamos con APV, el tratamiento con BAPTA impidió que se indujera la potenciación al tiempo que se indujo una caída transitoria de la amplitud del C/A-EPSC (figura 11D). El análisis del pulso pareado sugiere que la disminución observada durante la perfusión de lactato tiene un origen presináptico (datos no mostrados).

Estos experimentos muestran la coexistencia de dos fenómenos inducidos por lactato, por un lado, la disminución de la amplitud de los C/A-EPSCs a nivel presináptico y por otro, la potenciación en la neurona postsináptica.



**Figura 11. Requerimientos postsinápticos para la potenciación sináptica de las células piramidales CA3. A)** Curso temporal promediado; se perfundió lactato (2 mM) mientras que las células se mantuvieron a -100 mV (símbolos rojos), 5 min después del lavado, la perfusión de lactato con células a -70 mV indujo una potenciación sináptica. Inserto, trazos representativos de C/A EPSCs obtenidos en condiciones control (1) y 30 min después del lavado con lactato (2). **B)** Diagramas de caja que resumen los cambios en la amplitud de los C/A EPSCs en condiciones basal, perfusión de lactato a -100 mV y -70 mV (cajas rojas) y a los 30 min del lavado (ANOVA de una vía, SNK, \*\*\* p < 0.001). **C)** Análisis del PPR en las condiciones indicadas (ANOVA de una vía, SNK, \* p < 0.05). **D)** Curso temporal que muestra los efectos del lactato en células cargadas con BAPTA (20 mM). Los

trazos superiores son C/A EPSCs representativos (promediados a partir de cinco sweeps continuos, adquiridos en el momento indicado en el curso temporal). **E)** Curso temporal promediado y trazos representativos que muestran el efecto del lactato en presencia de D-APV (50  $\mu$ M). **F)** Gráficos de caja que resumen los cambios en la amplitud de los C/A EPSCs durante la perfusión de lactato y a los 30 min para los experimentos realizados con BAPTA o D-APV (ANOVA de una vía, SNK, \*\*\*  $p < 0.001$ ). Barras de calibración para panel A, 20 pA / 25 ms; para panel D y E: 25 pA / 25 ms.

## Sección 8.02 La potenciación inducida por lactato es mediada por la activación de un receptor de lactato

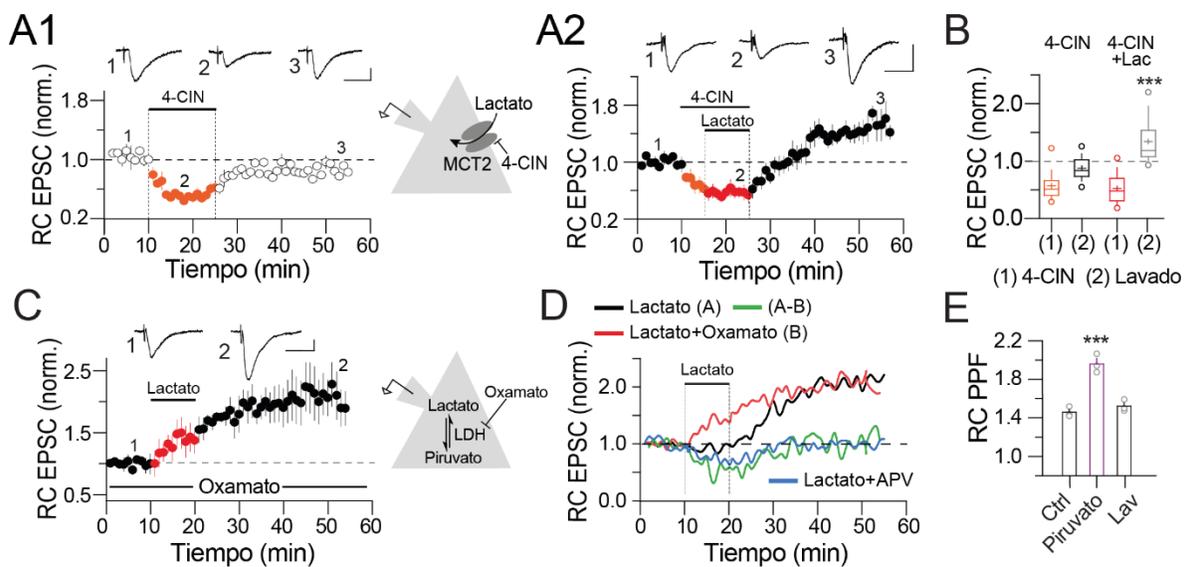
Enseguida, nos preguntamos cuáles eran los mecanismos del lactato por los cuales inducía dichos fenómenos. El lactato cuenta con un mecanismo de transporte que le permite entrar en las neuronas, una vez dentro se oxida para cubrir la demanda de ATP. Para demostrar si la potenciación sináptica era secundaria al transporte y metabolismo de lactato, bloqueamos el transportador neuronal de lactato (MCT2) con 4-CIN (0.5 mM). El 4-CIN por sí solo induce la disminución de la amplitud de los C/A-EPSCs de manera transitoria (amplitud de los C/A EPSCs durante la perfusión de 4-CIN =  $53.8 \pm 2.9\%$  de la respuesta inicial,  $p < 0.01$ ; a los 30 min de lavado =  $98.5 \pm 4.5\%$  de la respuesta inicial,  $n = 3$ ; figura 12A1). Además, la depresión transitoria inducida por 4-CIN no modificó el C/A PPR (RC PPR durante la perfusión de 4-CIN =  $1.4 \pm 0.06$ ,  $n = 5$ ; datos no mostrados), lo que demuestra que la captación de lactato a través del MCT2 funciona como un combustible para el metabolismo neuronal. A continuación, en presencia de 4-CIN, se aplicó lactato (2 mM). Como se resume en la Fig. 12B, la perfusión de 4-CIN disminuyó la amplitud de la RC EPSC. Sin embargo, la posterior perfusión de lactato provocó un aumento sostenido de la amplitud de los C/A EPSCs (C/A EPSC en presencia de 4-CIN + lactato =  $61.2 \pm 3.6\%$  de la respuesta inicial,  $p < 0.05$ ; a los 35 min de lavado =  $137.9 \pm 5.2\%$ ,  $p < 0.05$ ;  $n = 5$ ; Figura 12 A1-2). La combinación de 4-CIN + lactato también previno el aumento del PPR observado cuando se perfunde lactato solo (C/A PPR en presencia de 4-CIN + lactato =  $1.5 \pm 0.1$ ,  $p = 0.061$ ,  $n = 5$ ). Estos experimentos muestran que la potenciación sináptica mediada por lactato extracelular se inicia a través de una vía independiente a su transporte al interior de la célula a través del MCT2.

A pesar de que con este experimento podemos concluir que el lactato no requiere ser transportado a través del MCT2 a la neurona postsináptica para inducir LTP, debemos considerar que el lactato puede incorporarse al medio intracelular a través de otros mecanismos como panexinas o incluso canales de potasio. Para responder esta interrogante, en otra serie de experimentos las rebanadas fueron preincubadas con oxamato (10 mM), el inhibidor de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH). En esta condición, la perfusión de lactato indujo una LTP tan pronto estuvo en contacto con la rebanada en el perfusado (C/A EPSC a 35 min después del lavado de lactato =  $207.2 \pm 13.8$  %,  $p < 0.05$  vs basal,  $n = 4$ ; Fig. 12C). Sin embargo, la preincubación con oxamato previno el aumento del PPR durante la perfusión de lactato (C/A PPR control =  $1.43 \pm 0.05$ ; durante la perfusión de lactato =  $1.41 \pm 0.06$ ,  $p = 0.57$ ; datos no mostrados), lo que respalda la idea de que el lactato induce la potenciación postsináptica de forma independiente del metabolismo y al mismo tiempo ejerce una modulación presináptica del glutamato tras ser metabolizado.

En la Figura 12D, se muestra el curso temporal de este experimento y se compara con la potenciación sináptica inducida por lactato (línea negra). La potenciación sináptica en presencia de oxamato muestra una cinética de inducción más rápida que su contraparte sin oxamato, además de que el análisis de facilitación por pulso pareado sugiere un mecanismo netamente postsináptico. El tratamiento con oxamato previene la inducción del fenómeno presináptico, es decir la disminución transitoria de la amplitud de los C/A-EPSCs.

Para separar la modulación presináptica y postsináptica que ejerce el lactato sobre la transmisión sináptica, realizamos una resta aritmética entre el curso temporal obtenido cuando se perfundió lactato solo (Fig. 12D, línea continua) y la respuesta obtenida de las rebanadas pretratadas con oxamato y lactato (línea roja). Los valores residuales de esta resta (línea verde) muestran una depresión transitoria que regresa al valor de la basal. Esta resta indica tanto la contribución metabólica como la modulación presináptica de la liberación de glutamato ejercida por el lactato. Curiosamente, la cinética de la gráfica residual mostró un curso temporal similar al observado cuando las rebanadas son perfundidas con D-APV (línea azul; ver también Fig. 11E), un tratamiento farmacológico que

bloquea la potenciación sináptica, pero desenmascara la contribución presináptica de lactato para modular la liberación de neurotransmisores. Otra forma de corroborar que el efecto presináptico del lactato era debido a su transporte y metabolismo, decidimos analizar el PPR durante la presencia de piruvato (2 mM) un metabolito de lactato. El piruvato incrementó de manera transitoria el PPR que regresó a la basal una vez que fuera lavado del medio. De hecho, esta manipulación corrobora la teoría de que el lactato controla la liberación de neurotransmisores a nivel presináptico al mismo tiempo que desencadena la potenciación postsináptica.



**Figura 12. La potenciación sináptica es independiente del metabolismo del lactato. A1)** Curso temporal y trazos de corriente representativos adquiridos en el momento indicado del gráfico que muestra el efecto del 4-CIN (0.5 mM) sobre los C/A EPSCs. **A2)** Curso temporal promediado y trazos representativos adquiridos en el momento indicado que muestran los efectos de 4-CIN y la posterior perfusión de lactato (2 mM) sobre los C/A EPSCs. La perfusión de 4-CIN deprimió la respuesta evocada y en combinación con el lactato, se desencadena la potenciación sináptica. **B)** Gráficos de caja que resumen las acciones de 4-CIN o 4-CIN + lactato durante la perfusión de los fármacos (lavado) y a los 30 min (lavado) en la amplitud de C/A EPSC (ANOVA de una vía, SNK, \*  $p < 0.001$ ). **C)** Curso temporal promediado y trazos representativos adquiridos en el momento indicado en el curso temporal. Antes del comienzo del experimento, las rebanadas se preincubaron (15-20 min) con el bloqueador no competitivo de la enzima lactato deshidrogenasa, oxamato (10 mM), para bloquear la conversión de lactato en piruvato. El oxamato no interfirió con la potenciación

sináptica inducida con lactato. **D)** Secuencia temporal de la contribución presináptica y postsináptica predecible del lactato a la potenciación sináptica. La línea continua muestra el curso temporal de la amplitud normalizada de la C/A EPSC durante la línea de base, la perfusión de lactato y el lavado de lactato. Línea roja, evolución temporal de la respuesta C/A EPSC normalizada preincubada con oxamato. La resta de los valores normalizados de lactato menos los valores obtenidos con oxamato (línea verde). Este curso de tiempo muestra cinéticas similares a las observadas cuando se perfundió lactato en presencia de D-APV (línea azul). **E)** Efecto de la perfusión de piruvato sobre el PPR de las respuestas evocadas en la sinapsis C/A CA3, el piruvato tiene acciones presinápticas similares al lactato. Barras de calibración: Panel A: 20 pA / 25 ms; panel B: 50 pA / 25 ms; panel C y D: 20 pA / 20 ms.

Este experimento nos confirma que la potenciación sináptica no tiene un origen metabólico y que el lactato (y no otra molécula) es el responsable del fenómeno. Esto además nos sugiere que el lactato está actuando por la cara extracelular de la neurona postsináptica, activando al receptor HCA1, el cual es afín a lactato a las concentraciones probadas. Si esta afirmación es cierta, un agonista del receptor HCA1 debería inducir LTP en esta sinapsis tal y como lo hace el lactato.

En la siguiente serie de experimentos, se perfundió ácido 3,5-dihidroxibenzóico (3,5-DHBA, 0.5 mM), agonista selectivo del HCA1. El 3,5-DHBA promovió la potenciación de la sinapsis C/A siguiendo una cinética similar a la observada para lactato + oxamato, la potenciación sináptica inicia tan pronto el agonista se halla en contacto con la rebanada (figura 13A), además al no observar cambios en el índice de facilitación por pulso pareado, se sugiere un mecanismo netamente postsináptico de inducción de la potenciación (figura 13C).

Debido a que el HCA1 es un receptor acoplado a proteína  $G_{\alpha i/o}$  (Liu et al., 2009; Lauritzen et al., 2014), bloqueamos la cascada de señalización intracelular iniciada por la activación de esta proteína. Para ello, incluimos toxina pertussis (PT; 100 ng / ml) en la pipeta antes de hacer el sello. Después de romper del sello y tener la configuración de célula completa, se dejó que la PT se dializara por al menos 15-20 min. Inesperadamente, la PT no abolió la potenciación sináptica inducida por la perfusión de lactato (C/A EPSC a 35 min de

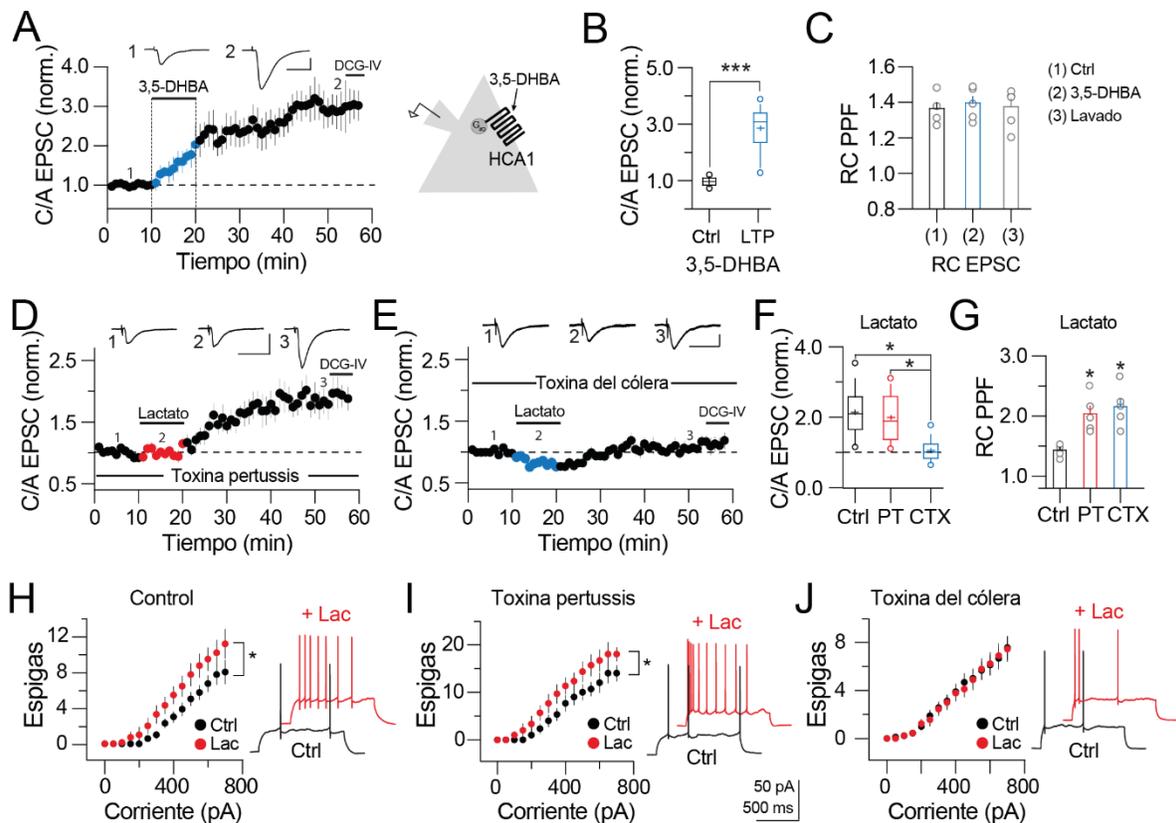
lavado =  $199.88 \pm 6.96\%$ ,  $p < 0.001$ ,  $n = 8$ ; Figuras 13D y 13F). Además, la diálisis intracelular de la PT tampoco indujo cambios sobre el aumento del PPR durante la perfusión de lactato (C/A PPR control =  $1.44 \pm 0.09$ ; durante la perfusión de lactato =  $2.05 \pm 0.12$ ,  $p = 0.06$ ; durante el lavado =  $1.42 \pm 0.07$ ;  $n = 8$ ; Figura 13G).

Debido a que nuestro resultado anterior indica que el lactato actúa a través de una cascada de señalización diferente, exploramos la posible participación de proteínas G estimuladoras. Un reporte anterior encontró que el lactato también activa un receptor acoplado a proteína Gs (Tang et al., 2014). Por lo tanto, bloqueamos el mecanismo de transducción dependiente de Gs cargando las pipetas con toxina del cólera (CTX,  $2.5 \mu\text{g} / \text{ml}$ ). Al igual que en el experimento anterior, la CTX se dializó durante 15-20 min antes de la perfusión de lactato (2 mM). Bajo esta condición experimental, el lactato no logró inducir la potenciación sináptica (C/A EPSCs a 35 min =  $107.6 \pm 3.5\%$ , n.s.,  $n = 9$ ; Figs. 13E y 13F). A pesar de la falta de potenciación, observamos un aumento transitorio en el PPR que volvió a los niveles basales a los 30 min posteriores al lavado de lactato (PPR control =  $1.4 \pm 0.1$ , durante la perfusión de lactato =  $2.16 \pm 0.13$ ,  $p < 0.05$ ; durante el lavado =  $1.39 \pm 0.1$ . Fig. 13G).

Recientemente demostramos que la perfusión de lactato reduce el número de potenciales de acción de las células piramidales de CA1 obtenidos con un pulso cuadrado de corriente (Herrera-López y Galván, 2018). Por lo tanto, para establecer si el lactato controla la salida de las neuronas piramidales de CA3 mediante la activación de un receptor postsináptico, se evaluó el disparo en las neuronas piramidales de CA3 antes y después de la perfusión de lactato. Inesperadamente, el lactato aumentó el número de potenciales de acción de las neuronas de CA3. Como se resume en la Fig. 13H, en condiciones control, las neuronas respondieron con un número máximo de AP de  $8 \pm 1.3$  potenciales de acción. La perfusión de lactato (2 mM) aumentó la descarga de AP a  $11.1 \pm 1.6$  espigas (ANOVA de una vía, SNK,  $p < 0.05$ ,  $n = 8$ ; Fig. 5H).

El aumento de potenciales de acción en presencia de lactato también se observó en las neuronas piramidales de CA3 previamente dializadas con PT (descarga de AP basal = 14

$\pm 1.6$  espigas; descarga de AP en presencia de lactato [2 mM] =  $18 \pm 1.4$  espigas,  $p < 0.05$ ;  $n = 5$ ; figura 13I). La descarga de AP aumentada inducida con lactato se abolió en las células piramidales de CA3 que fueron dializadas con CTX (descarga de AP inicial =  $7.1 \pm 1$  espigas; descarga de AP en presencia de lactato [2 mM] =  $7 \pm 1$  espigas, ns,  $n = 10$ ; Fig. 13J). Estos resultados demuestran que las neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo expresan un receptor sensible al lactato acoplado a una proteína Gs y sugieren que el hipocampo expresa varios subtipos de receptores de lactato acoplados a diferentes efectores de señalización (Lauritzen et al., 2014; Castillo et al., 2015; Herrera- López y Galván, 2018).



**Figura 13. La potenciación sináptica implica la activación de proteínas Gs.** **A)** Curso temporal promedio y trazos representativos adquiridos en el tiempo indicado que muestran los efectos del 3,5-DHBA (0.5 mM) sobre los C/A EPSCs. Los símbolos azules representan perfusión de 3,5-DHBA (10 min). **B)** Gráficos de caja que resumen la magnitud de la potenciación sináptica inducida con 3,5-DHBA. **C)** Análisis del PPR durante la basal (1), perfusión de 3,5-DHBA (2) y a los 35 min de lavado (3). **D)** Curso temporal promedio y trazos representativos adquiridos en el tiempo

indicado que muestran los efectos de la diálisis intracelular de la toxina pertussis (PT, 100 ng / ml) y la perfusión de lactato (símbolos rojos). **E)** Curso temporal promedio y trazos representativos de células cargadas intracelularmente con toxina del cólera (CTX, 2.5  $\mu$ g / ml). CTX abolió la potenciación sináptica cuando se perfundió lactato 2 mM (símbolos azules). Las respuestas sinápticas de las células cargadas con PT o CTX fueron insensibles a la aplicación de DCG-IV 5  $\mu$ M (barra sólida en los gráficos del curso temporal). **F)** Diagramas de caja que resumen el cambio en la amplitud de los C/A EPSCs durante la perfusión de lactato, en control y en células cargadas con toxina pertussis o toxina del cólera (cajas rojas y azules, respectivamente). **G)** Análisis del PPR en condiciones control (barra sólida), durante la perfusión de lactato en células cargadas con toxina pertussis (barra roja) o toxina del cólera (barra azul) (ANOVA de una vía, SNK, \*  $p < 0.05$ ). **H – J)** Curvas F/I que muestran el número de potenciales de acción (espigas) provocados en respuesta a las inyecciones de corriente indicadas y los efectos del lactato (2 mM) en células de control, células cargadas con toxina pertussis o toxina del cólera. La toxina del cólera previno el aumento del número de potenciales de acción en respuesta a la perfusión de lactato (ANOVA de una vía, SNK, \*  $p < 0.05$ ).

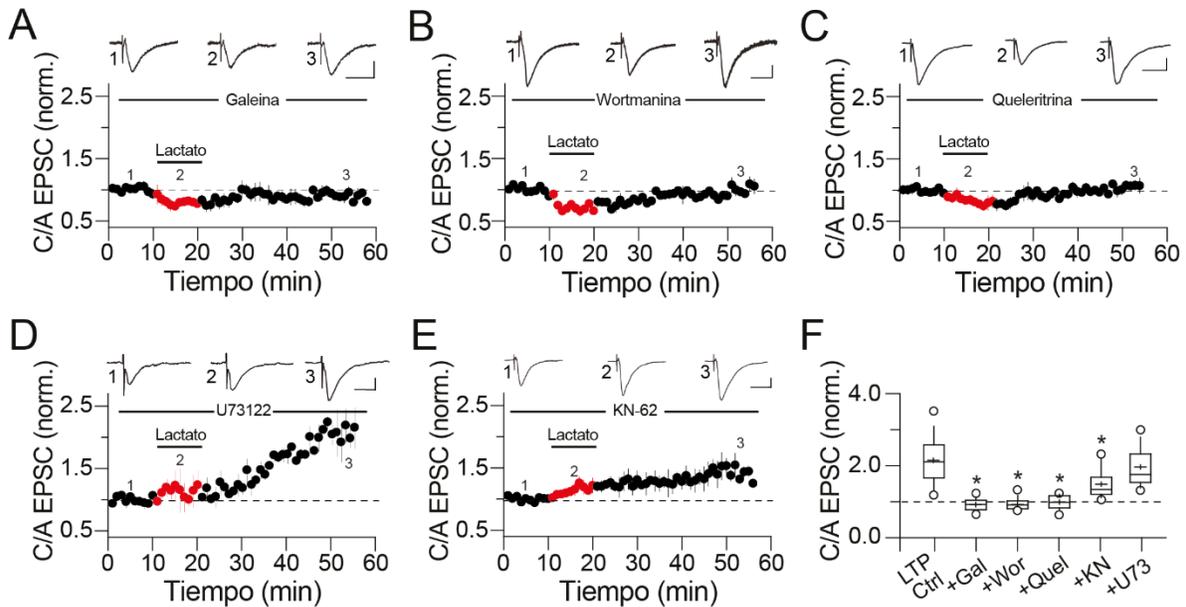
### Sección 8.03 Vías de señalización intracelular necesarias para la potenciación sináptica

Una vez activados, los receptores acoplados a proteína G pueden disociarse en subunidades  $G\alpha$  y  $G\beta\gamma$  libres (ver el modelo propuesto en la Fig. 17). El complejo  $G\beta\gamma$  es un potente estimulador de diferentes canales iónicos y cascadas de señalización implicadas en la plasticidad sináptica (MacDonald et al., 2007). Por lo tanto, exploramos la participación del complejo  $G\beta\gamma$  en la potenciación sináptica mediada por lactato. Primero, incluimos galeína 10  $\mu$ M (inhibidor de  $G\beta\gamma$ ) en la pipeta de patch para prevenir la interacción de  $G\beta\gamma$  con PLC o PI-3-K. La diálisis intracelular de la galeína bloqueó la potenciación sináptica (C/A EPSC a 35 min de lavado de lactato =  $96.3 \pm 4.12\%$  de la respuesta inicial,  $n = 6$ ; Fig. 14A). Curiosamente, la galeína no interfirió con el aumento del PPR durante la perfusión de lactato (C/A PPR control =  $1.38 \pm 0.04$ , durante la perfusión de lactato =  $1.89 \pm 0.13$ ,  $p < 0.05$ ; durante el lavado =  $1.32 \pm 0.05$ ). Debido a que las subunidades  $G\beta\gamma$  activan, entre otras, la cascada de señalización de PI-3-K (Kurosu et al., 1997; Luttrell et al., 1995), exploramos a continuación la participación de esta cinasa. En las neuronas dializadas somáticamente con

el inhibidor de PI-3-K wortmanina (10  $\mu$ M), la perfusión de lactato (2 mM) no desencadenó la potenciación sináptica (C/A EPSC a 35 min de lavado de lactato =  $92.67 \pm 2.6\%$  de la respuesta inicial,  $n = 5$ ; Fig. 14B). Las células cargadas con wortmanina y expuestas a lactato mostraron un aumento del PPR (C/A PPR control =  $1.35 \pm 0.06$ ; durante la perfusión de lactato =  $1.86 \pm 0.05$ ,  $p < 0.05$ ; durante el lavado =  $1.39 \pm 0.05$ ; datos no mostrados).

Dado que la vía de señalización de PI-3-K puede activar PKC de una manera dependiente o independiente de PLC, también exploramos la contribución específica de estas vías. La diálisis intracelular del inhibidor de PLC, U73122 (10  $\mu$ M) no interfirió ni con la potenciación sináptica ni con el aumento transitorio del PPR (C/A EPSC en células cargadas con U73122 a 35 min de lavado de lactato =  $196 \pm 9.1\%$ ,  $p > 0.05$ ,  $n = 4$ ; Fig. 14E. PPR control =  $1.38 \pm 0.05$ ; durante la perfusión de lactato =  $1.98 \pm 0.13$ ,  $p < 0.05$ ; durante el lavado =  $1.4 \pm 0.05$ ; datos no mostrados). Contrario a esta observación, la diálisis intracelular de queleritina (10  $\mu$ M) abolió la potenciación sináptica inducida con lactato (C/A EPSC a 35 min de lavado de lactato =  $107.6 \pm 3.5\%$ , n.s.,  $n = 9$ ; Fig. 14C). Estos datos indican que la activación de PKC, mediada por el complejo  $G\beta\gamma$ , es independiente de la actividad de PLC y de la producción adicional de diacilglicerol.

Por otra parte, la actividad CaMKII es un paso necesario para la inducción de LTP dependiente de NMDAR en la sinapsis C/A (Lisman et al., 2012). Por tal razón, evaluamos la participación de la actividad de CaMKII en la potenciación sináptica mediada por lactato. Para ello, cargamos las células piramidales de CA3 con el bloqueador de CaMKII, KN-62 (10  $\mu$ M). Curiosamente, la diálisis de KN-62 redujo parcialmente la magnitud de la potenciación sináptica (C/A EPSC en células cargadas con KN-62 =  $148.6 \pm 6.03\%$  de la respuesta inicial,  $p < 0.05$ ,  $n = 4$ ; Fig. 14E). La reducción parcial de la potenciación sináptica cuando se bloquea CaMKII sugiere una contribución limitada de esta cascada de señalización durante la inducción de esta forma de plasticidad sináptica. Los gráficos de caja de la Fig. 14F resumen los efectos de los diferentes inhibidores de quinasas sobre la potenciación sináptica medida a los 35 min de lavado con lactato. La contribución de las cascadas de señalización necesarias para la inducción de la potenciación sináptica mediada por lactato se resume en el modelo propuesto en la Fig. 16.



**Figura 14. Cascadas de señalización intracelular necesarias para la potenciación sináptica.**

Cursos temporales promedio y trazos representativos adquiridos en el tiempo indicado que muestran los efectos de diferentes bloqueadores de vías de señalización intracelular. Los fármacos se incluyeron en la pipeta de patch y la diálisis del fármaco duró de 10 a 15 minutos antes de la manipulación experimental. **A)** Inclusión de galeína (10  $\mu$ M; inhibidor de subunidades G $\beta$ \gamma), **B)** wortmanina (10  $\mu$ M; inhibidor de PI-3-K), **C)** queleritrina (10  $\mu$ M; inhibidor de PKC), **D)** U73122 (10  $\mu$ M; inhibidor de PLC) y **E)** KN-62 (10  $\mu$ M; inhibidor de CaMKII). Mientras que la potenciación sináptica fue insensible al bloqueo de PLC, la respuesta mostró una sensibilidad parcial al bloqueo postsináptico de CaMKII. **F)** Gráficos de caja que resumen la magnitud de la potenciación sináptica inducida con lactato (2 mM) en células cargadas con los fármacos indicados.

#### Sección 8.04 El lactato promueve un incremento específico en el acople EPSP-espiga de las células piramidales CA3

Si la potenciación de una sinapsis se acompaña de una mayor probabilidad de generación de potenciales de acción predicha por una descarga repetitiva de EPSPs, entonces el aumento transitorio de lactato extracelular debería aumentar la probabilidad de generación de potenciales de acción. Según nuestros resultados, el aumento en la probabilidad de disparo debería restringirse a la sinapsis C/A ya que es la única que presenta potenciación sináptica tras la perfusión de lactato. Para probar esta predicción, evocamos

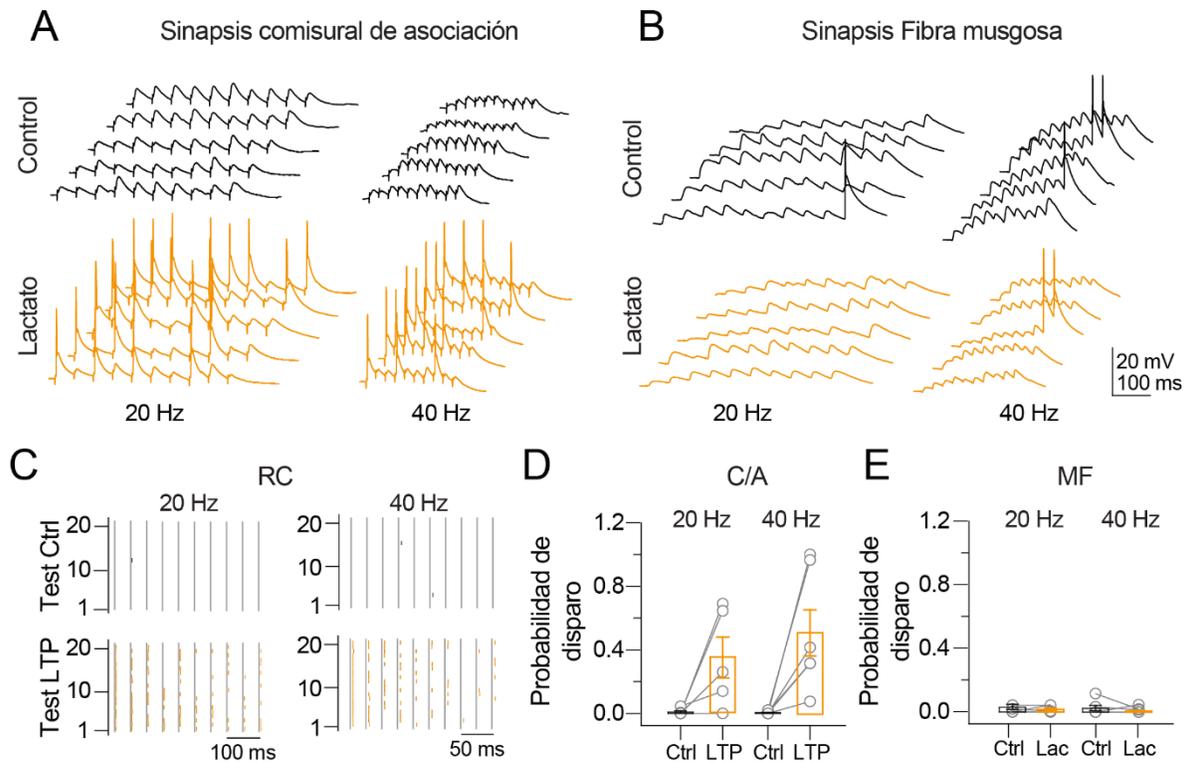
trenes de C/A EPSP o MF EPSP (20 o 40 Hz; 20 trenes a intervalos de 10 s) sobre las neuronas piramidales de CA3 en modo current-clamp. En condiciones control, la estimulación repetitiva a 20 Hz de la sinapsis C/A provocó un tren de EPSPs sin espigas (probabilidad de espigas en la sinapsis C/A =  $0.83 \pm 0.7\%$ ; Fig. 15A, panel izquierdo).

Como se predijo, la probabilidad de disparo aumentó drásticamente después de la perfusión de lactato y el lavado (probabilidad de disparo de C/A a los 35 minutos de lavado de lactato =  $45.5 \pm 15\%$ ; Fig. 15A, panel derecho y Fig. 15D). El aumento de la probabilidad de disparo también se observó cuando la frecuencia de estimulación se estableció en 40 Hz (probabilidad de disparo de C/A a 40 Hz =  $44.6 \pm 14\%$ ;  $n = 6$ ,  $p < 0.05$ , prueba t de Student pareada; Fig. 15A, paneles inferiores y Fig. 15D). El gráfico de la Fig. 15C resume la probabilidad de disparo aumentada de la sinapsis C/A después de la potenciación sináptica mediada por lactato, cada línea representa un potencial de acción individual evocado a lo largo del tren.

A diferencia de las respuestas mediadas por la sinapsis C/A, las respuestas mediadas por MF se caracterizan por una fuerte facilitación dependiente de la frecuencia (Salin et al., 1996). Esta característica fue notable en condiciones de control, ya que la estimulación a 20 o 40 Hz provocó un aumento sostenido de la amplitud de MF EPSP que ocasionalmente producía potenciales de acción (véanse los trazos control adquiridos a 20 y 40 Hz en la Fig. 15B).

Como se predijo, la perfusión de lactato no aumentó la probabilidad de generación de potenciales de acción (probabilidad de disparo de control de frecuencia intermedia a 20 Hz =  $0.79 \pm 0.8\%$ ; 35 min después del lavado de lactato =  $0.28 \pm 0.57\%$ . Probabilidad de disparo control a 40 Hz =  $1.7 \pm 0.77\%$ ; 35 min después del lavado con lactato =  $0.92 \pm 0.8\%$ ;  $n = 6$ ; ns, prueba t de Student pareada; Figuras 15B y 15E). Asimismo, se observó que la perfusión y el lavado de lactato causaron una leve disminución en las respuestas facilitadas provocadas por la estimulación repetitiva de MF, como se ilustra en los trazos de voltaje de la Figura 15B. Juntos, estos experimentos demuestran que un aumento transitorio del

lactato extracelular aumenta la probabilidad de disparo de las neuronas piramidales de CA3, un fenómeno que ocurre de una manera específica de la sinapsis.



**Figura 15. El lactato desencadena un aumento específico de la sinapsis en la probabilidad de disparo en CA3 PC.** Los trenes de estimulación aplicados a las sinapsis C/A o MF se realizaron a 20 y 40 Hz para cada condición experimental. **A)** Trenes representativos de C/A EPSP antes y 30 min después de la perfusión de lactato, evocados a 20 Hz (panel izquierdo) y 40 Hz (panel derecho). La perfusión de lactato aumentó la incidencia de picos en el tren de C/A EPSPs (trazos naranjas). **B)** Trazos representativos de MF EPSP antes y 30 min después de la perfusión de lactato, evocados a 20 y 40 Hz. El lactato no aumentó la incidencia de picos en la respuesta sináptica. **C)** Gráfico representativo construido a partir de los datos representado en el panel A. El lactato aumenta el número de espigas (paneles inferiores, trazos naranjas). **D – E)** Gráficos de barras que muestran la probabilidad de disparo en condiciones control (barra negra) y en presencia de lactato (barra naranja) para las sinapsis C/A y MF. Los símbolos grises representan experimentos individuales y las barras la respuesta promedio.

## Sección 8.05 El efecto presináptico observado en presencia de lactato es consecuencia de la activación de receptores de adenosina.

Finalmente, nos interesó analizar el mecanismo por el cual el lactato promueve la disminución de los EPSCs evocados en ambas sinapsis. Partiendo del experimento en el que el tratamiento de las rebanadas con oxamato, previo a la perfusión de lactato exógeno, previno la disminución de la amplitud de los EPSCs inducida a través de un mecanismo presináptico (ver figura 12 panel D).

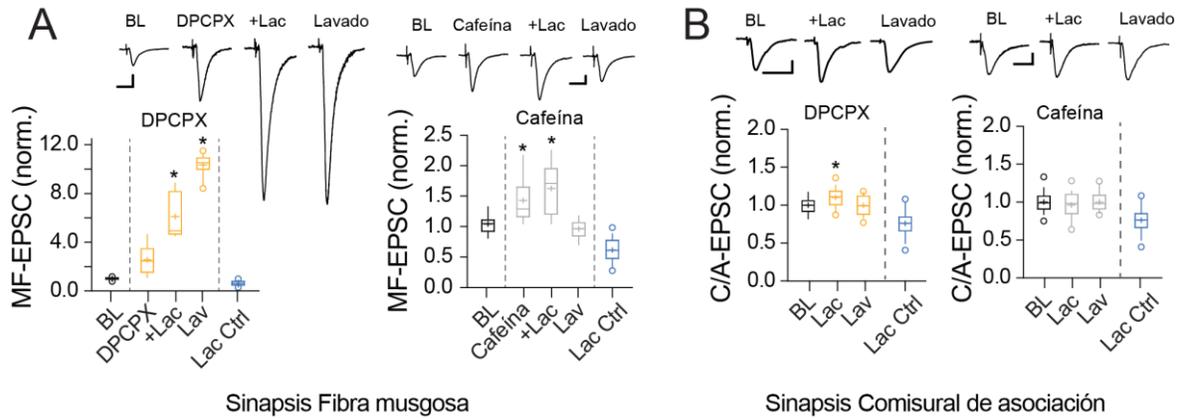
Como el oxamato inhibe el metabolismo de lactato, la hipótesis que nos planteamos fue que un metabolito era responsable de las acciones a nivel presináptico. Probamos con el tratamiento de las rebanadas con un antagonista de los receptores A1 de adenosina acoplados a proteína  $G_{i/o}$ , que se sabe tienen localización presináptica en las sinapsis MF- y C/A-CA3 (Debanne et al., 1996; Thompson et al., 1992).

El tratamiento con DPCPX (1  $\mu$ M), antagonista de los receptores A1, induce un incremento de los MF-EPSCs de  $254.6 \pm 35\%$  que incrementa hasta  $610.1 \pm 59\%$  en presencia de lactato (2 mM). Este valor llega hasta  $1034 \pm 16\%$  después de lavar tanto el DPCPX como el lactato (figura 16A,  $*p < 0.05$  vs BL, ANOVA de una vía, Dunn).

Pensando en que el incremento observado en presencia de DPCPX pudiera estar mediado por la acción de adenosina sobre otros receptores diferentes al A1, decidimos utilizar cafeína para inhibir todos los receptores de adenosina y aislar los posibles efectos de otros receptores que estuvieran sinergizando con la adenosina. Al tratar las rebanadas con cafeína (50  $\mu$ M), se observa un incremento de  $142.87 \pm 35\%$ , el cual es bastante menor al inducido por DPCPX, además el tratamiento con lactato no logra inducir un incremento adicional (amplitud del MF-EPSC en presencia de cafeína y lactato =  $162.47 \pm 41\%$ , figura 16A,  $*p < 0.05$  vs BL, ANOVA de una vía, Dunn).

En el caso de la sinapsis C/A, el tratamiento con DPCPX o cafeína no mostraron ningún efecto sobre la amplitud de los EPSCs, lo que coincide con los reportes previos que mencionan que el tono de adenosina en esta sinapsis no es tan importante como en la fibra

musgosa (Moore et al., 2003). Cuando se combina el DPCPX con lactato, se observa un incremento transitorio de la amplitud respuesta sináptica (amplitud del C/A-EPSC en presencia de DPCPX y lactato =  $110.4 \pm 2\%$ , figura 16B, panel izquierdo,  $*p < 0.05$  vs BL, ANOVA de una vía, Dunn), que se previene en presencia de cafeína (amplitud del C/A-EPSC en presencia de cafeína y lactato =  $96.17 \pm 3.2\%$ , figura 16B, panel derecho,  $*p < 0.05$  vs BL, ANOVA de una vía, Dunn).



**Figura 16. La adenosina derivada del metabolismo de lactato es responsable de la depresión presináptica transitoria en CA3. A)** El tratamiento de las rebanadas con DPCPX ( $1 \mu\text{M}$ ), un antagonista de los receptores A1 de adenosina, induce un incremento en la amplitud de los EPSCs evocados en la sinapsis MF-CA3, que aumenta aún más en presencia de lactato y no regresa a valores basales tras el lavado (panel izquierdo). Algo similar se observa al usar el antagonista no selectivo de los receptores a adenosina, cafeína ( $50 \mu\text{M}$ ). La cafeína incrementa la amplitud de los MF-EPSCs y además previene un mayor incremento en presencia de lactato. Este efecto es transitorio (panel derecho). **B)** El tratamiento de las rebanadas con DPCPX, induce un incremento modesto pero significativo en la amplitud de los EPSCs evocados en la sinapsis C/A-CA3 en presencia de lactato, y regresa a valores basales tras el lavado. La cafeína previene el incremento de la amplitud de los C/A-EPSCs. En cada panel, se adiciona el boxplot relativo al efecto del lactato observado en las figuras 1 y 3, con fines comparativos.

## Artículo IX. Discusión

En este trabajo mostramos que el L-lactato es capaz de inducir potenciación sináptica dependiente de la activación de los receptores NMDA en las neuronas piramidales del área CA3 del hipocampo por estimulación de las fibras comisurales de asociación, pero no en la sinapsis formada por las FM. Esta potenciación tiene origen en la neurona postsináptica, requiere del incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y se inicia por la activación de un receptor acoplado a proteína  $G_s$ . Estos resultados se resumen en la figura 17.

Uno de los primeros fenómenos que llama nuestra atención respecto a la potenciación sináptica es su especificidad, ya que solo se observa en la sinapsis C/A. ¿Por qué si se trata de un fenómeno de inducción postsináptica no se observa en la sinapsis FM-CA3? Los sitios de inducción de la plasticidad, es decir las espinas dendríticas de las neuronas piramidales están anatómicamente segregados, además de ser sumamente compartamentalizados (Evstratova and Tóth, 2014; Pelkey and McBain, 2008). Además, tienen diferencias notables, la principal es la presencia de receptores NMDA. Mientras que la sinapsis C/A es rica en receptores NMDA, la sinapsis FM carece prácticamente de estos receptores. Si bien es cierto que se ha reportado la existencia de LTP de origen NMDA en la sinapsis FM-CA3, que además es de inducción postsináptica (Kwon and Castillo, 2008), los autores mencionan que los protocolos clásicos para inducir LTP no alcanzan a inducir la plasticidad a través de los NMDARs dada su baja densidad en la postsinapsis.

Un aumento transitorio en el lactato extracelular desencadena la potenciación sináptica de la transmisión glutamatérgica en las neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo. Debido a que la potenciación está restringida a la sinapsis colateral recurrente y ausente en las fibras musgosas, esta nueva forma de plasticidad sináptica es específica de la sinapsis. Más allá de su conocida función metabólica, este trabajo de investigación demostró que el lactato activa un receptor que induce potenciación sináptica en una preparación que mantiene su conectividad neuronal.

## Sección 9.01      Requisitos para la inducción de potenciación sináptica a largo plazo

Nuestras manipulaciones experimentales mostraron que el lactato induce actividad pre y postsináptica en las neuronas piramidales de la región CA3. Por un lado, la perfusión de lactato modificó PPF y CV-2, lo que sugiere un control presináptico de la transmisión glutamatérgica, en las MF y en las terminales colaterales recurrentes. Por otro lado, la ausencia de potenciación cuando los canales postsinápticos operados por voltaje fueron silenciados, o las manipulaciones farmacológicas utilizadas para bloquear la activación de las cascadas de señalización intracelular, indican que el lactato tiene un locus postsináptico para la potenciación sináptica.

Una creciente evidencia indica que el lactato extracelular modula múltiples propiedades electrofisiológicas (Bozzo et al., 2013; Gilbert et al., 2006; Herrera-López and Galván, 2018), la liberación de neurotransmisores (Tang et al., 2014) y controla la concentración intracelular de calcio (Requardt et al., 2012; Takata et al., 2001). De acuerdo con esta evidencia, nuestros resultados apoyan la noción de que el lactato opera como un "gliotransmisor" (Bergersen and Gjedde, 2012; Sotelo-Hitschfeld et al., 2012; Steinman et al., 2016; Tang et al., 2014) para modular la fuerza sináptica que converge en las neuronas piramidales de la región CA3. Curiosamente, y a pesar de la evidencia que indica que la formación de memoria requiere el metabolismo del lactato (Newman et al., 2011; Suzuki et al., 2011). Sin embargo, nuestros resultados no respaldan la noción de que el lactato desencadena la potenciación sináptica a través de una vía metabólica puesto que la presencia de oxamato no previno la inducción de potenciación sináptica.

Nuestros experimentos también revelaron que el lactato tiene una acción bifásica en la transmisión sináptica. Primero, depresión de la transmisión glutamatérgica, seguida de potenciación (en la sinapsis C/A) o depresión transitoria de la transmisión glutamatérgica (en la sinapsis MF). Debido a que en el área del hipocampo CA3, las oscilaciones gamma mediadas por interneuronas GABAérgicas están moduladas por el lactato y el  $\beta$ -hidroxibutirato del cuerpo cetónico (Galow et al., 2014; Vodovozov et al., 2018), la

depresión parcial observada en la transmisión glutamatérgica podría ser consecuencia de la modulación de la transmisión GABAérgica. Sin embargo, esto es poco probable ya que nuestras manipulaciones se realizaron en presencia de picrotoxina. Por otro lado, cuando las rebanadas del hipocampo se preincubaron con oxamato para evitar la conversión de lactato a piruvato y viceversa, se evitaron tanto la depresión parcial como los cambios en el PPF (ver Fig. 4A). Este resultado apunta a una acción metabólica relacionada con el lactato que controla la liberación presináptica de glutamato, una posibilidad que exige una mayor investigación.

Mecánicamente, encontramos que la potenciación requiere despolarización postsináptica coincidente y disponibilidad de canales operados por voltaje durante la elevación de lactato. De hecho, la falta de potenciación observada cuando las células se mantuvieron a  $-100$  mV, cargadas con BAPTA o cuando se bloquearon los NMDAR, indica que la elevación de calcio es un paso necesario para la potenciación sináptica. Estos datos también sugieren que la fuente principal de entrada de calcio ocurre a través de la activación de NMDAR. Este mecanismo plausible es una reminiscencia del LTP evocado eléctricamente, dependiente de NMDAR inducido en las sinapsis C/A de las PC CA3 (Debanne et al., 1998; Nakazawa et al., 2002), un proceso que también requiere actividad CaMKII (Lu and Hawkins, 2006) y actividad de PKC (Hussain and Carpenter, 2005; Kamiya et al., 1988; Kwon and Castillo, 2008). Debido a que PKC potencia las corrientes NMDAR mediante un mecanismo que promueve la velocidad de apertura del canal del receptor NMDA (Lan et al., 2001; Liao et al., 2001), una posibilidad para explicar las respuestas NMDAR mejoradas es que la activación de PKC potencia las corrientes NMDAR. De acuerdo con esta idea, PKC reduce la afinidad del NMDAR por  $Mg^{2+}$  (Chen and Huang, 1992), un fenómeno que puede ser iniciado por GPCR (Lu et al., 1999) ver panel A del modelo en la figura 17.

Se ha establecido un vínculo entre el lactato y los NMDAR. En reportes anteriores, el lactato ha demostrado ser capaz de aumentar las corrientes de NMDA al aumentar la relación  $NADH/NAD^+$  como consecuencia de su metabolismo (Jourdain et al., 2018; Yang et al., 2014). El cambio en el estado redox debido a la perfusión de lactato es suficiente para

potenciar la amplitud de las corrientes de NMDA porque estos receptores tienen un sensor redox intracelular en la subunidad NR1 (Sullivan et al., 1994), esta acción podría estar directamente relacionada con la inducción de LTP visto en nuestros experimentos; sin embargo, la potenciación sináptica muestra un mecanismo diferente, el cual es independiente del metabolismo del lactato, siendo improbable que esté relacionado con algún cambio en el estado redox intracelular. Esta afirmación está respaldada por el hecho de que ni el bloqueo de MCT2 ni la inhibición de LDH lograron prevenir la potenciación que el cambio en el potencial redox intracelular está íntimamente ligado a la acción de esta enzima. Además, informes anteriores (Yang et al., 2014) han demostrado que es necesaria una concentración diez veces mayor para inducir cambios significativos en el estado redox que la que usamos: 1 y 2 mM.

### Sección 9.02 Las células piramidales de CA3 expresan un receptor de lactato atípico

Otro hallazgo destacado es que el lactato activa receptores postsinápticos sensibles al 3,5-DHBA, el agonista del receptor de lactato HCA1 (Liu et al., 2012). Sin embargo, la potenciación sináptica inducida con 3,5-DHBA no modificó el PPF ni el  $CV^{-2}$  de las respuestas glutamatérgicas evocadas en la sinapsis C/A. La falta de cambios en PPF,  $CV^{-2}$ , y la sensibilidad a la toxina del cólera en lugar de la toxina pertussis, indica que las células piramidales de CA3 expresan un receptor de lactato o multímero de receptores acoplado a un sistema efector que estimula la proteína Gs. En una publicación reciente, De Castro et al. (2019) demostraron en neuronas corticales primarias que el receptor HCA1 señala a través de un sistema  $G\alpha / G\beta\gamma$ . Sin embargo, la activación de HCA1 cortical con lactato o 3,5-DHBA disminuye la frecuencia de EPSC en miniatura, la concentración de calcio intracelular y la descarga potencial de acción (De Castro et al., 2019; véase también Bozzo et al., 2013), descartando la posibilidad de que el receptor de lactato expresado por las PC CA3 pueda ser el mismo receptor expresado por las neuronas corticales primarias.

En otro estudio, Tang et al. (2014) encontraron un receptor de lactato que aumenta tanto el calcio intracelular como la descarga de las neuronas del locus coeruleus. Estos

autores propusieron la existencia de una variante del receptor HCA1 que se acopla a una cascada de señalización diferente o bien la existencia de otro receptor que reconoce lactato y señales a través del sistema de señalización adenilato ciclasa, cAMP y PKA. Sin embargo, la potenciación sináptica en la sinapsis C/A no involucra esta cascada de señalización (Weisskopf et al., 1994); por lo tanto, es difícil verificar que los receptores expresados en el locus coeruleus y el área CA3 sean los mismos receptores. Por último, otra posibilidad a través de la cual el lactato podría actuar en CA3 es que, tras la activación, el HCA1 promueva la formación de multímeros homo- o heterómeros, un fenómeno que altera la afinidad por las proteínas G (Gaitonde and González-Maeso, 2017; Smith and Milligan, 2010; Vilardaga et al., 2010). Esta posibilidad ha sido sugerida previamente para el receptor HCA1 (Kuei et al., 2011); y ocurre para los receptores HCA2 y HCA3 (Mandrika et al., 2010). A pesar de estas posibilidades, la identificación adecuada del receptor expresado por neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo requiere más investigación. Del mismo modo, nuestros resultados abren la posibilidad de que diferentes receptores de lactato acoplados a múltiples vías de señalización puedan expresarse en las células piramidales del hipocampo.

En las neuronas piramidales de la región CA1, la activación del receptor de lactato disminuye la descarga de disparo de una manera dependiente de la toxina pertussis (Herrera-López y Galván, 2018). Por lo tanto, el hallazgo de que el lactato (o 3,5-DHBA) aumentó la descarga de disparo de PC con CA3 fue, de hecho, inesperado. Sin embargo, Angamo et al. (2016) demostraron que el 3,5-DHBA aumenta la espiga poblacional de la respuesta sináptica evocada sobre las neuronas piramidales. Del mismo modo, Tang et al. (2014) demostraron que el lactato promueve la acumulación de calcio y aumenta la descarga de activación de las neuronas del locus coeruleus. Aunque no medimos los niveles de calcio intracelular, demostramos que el bloqueo de NMDAR o la quelación de calcio intracelular con BAPTA bloquea la potenciación sináptica mediada por el lactato. Los efectos mencionados anteriormente son consistentes con nuestras observaciones.

Otra observación intrigante es la acción moduladora del lactato en la transmisión sináptica mediada por MF. Si HCA1 se expresa en las terminales presinápticas (como lo

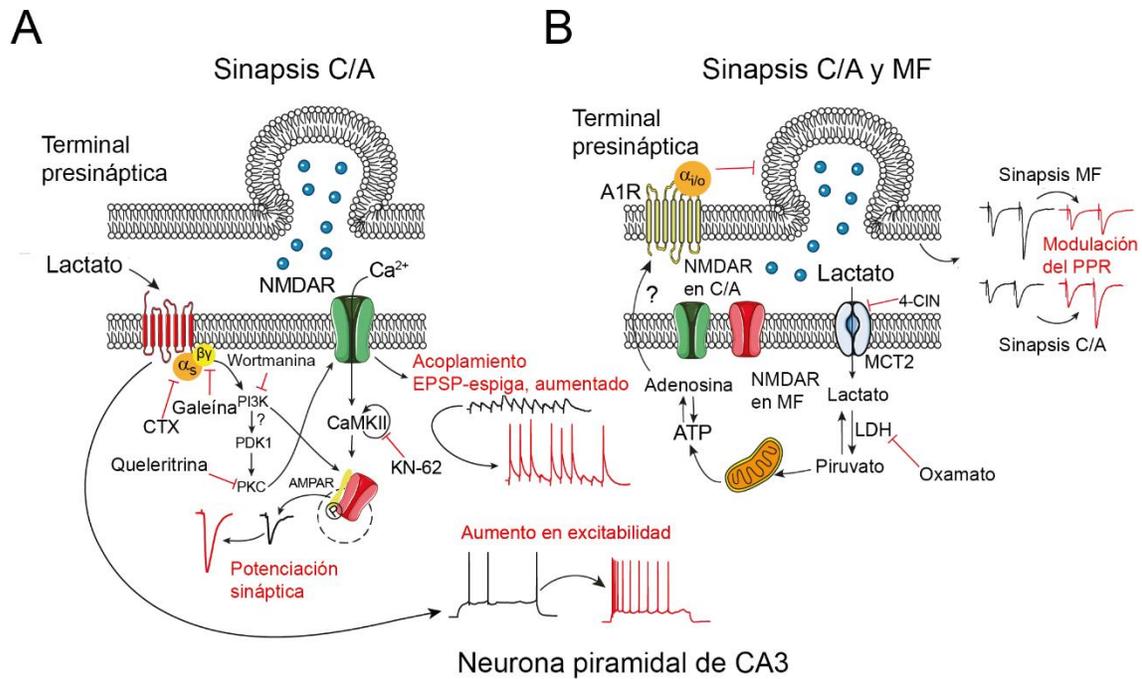
indican los cambios en PPF y  $CV^{-2}$ ), ¿por qué el lactato no desencadena la potenciación presináptica de MF? Encontramos dos posibilidades que pueden explicar esta disparidad. Por un lado, el receptor HCA1 está acoplado a una proteína  $G_{i/o}$ , que inhibe la vía adenilato ciclasa-cAMP-PKA, un paso necesario para la inducción de MF LTP (Weisskopf et al., 1994). Es posible que el acoplamiento negativo del receptor de lactato a esta cascada de señalización restrinja la inducción de potenciación en la sinapsis de MF mientras facilita la potenciación en el terminal C/A.

Por otro lado, la interacción entre HCA1 y el receptor de adenosina A1 se demostró recientemente (De Castro et al., 2019). La activación de HCA1 y una interrelación adicional con el receptor A1 dan como resultado una excitabilidad disminuida. Si este es el caso, el aumento de la activación del receptor A1 reduciría la excitabilidad en las terminales de botones musgosos gigantes y restringiría la potenciación presináptica de la MF (Moore et al., 2003). Esta afirmación es soportada con el experimento hecho en presencia del antagonista A1 (DPCPX) en el que la combinación de este con el lactato parece inducir un proceso de plasticidad a largo plazo, sin embargo, aún es necesario realizar controles extras ya que pareciera que el solo antagonismo de los receptores A1 pudiera inducir el proceso de plasticidad.

### Sección 9.03 El lactato incrementa el acoplamiento EPSP-espiga de las células piramidales de CA3

Si el fortalecimiento de una sinapsis se acompaña de una mayor probabilidad de generación de potenciales de acción predicha por una descarga repetitiva de EPSPs (acoplamiento EPSP-espiga), entonces el aumento transitorio de lactato extracelular debería aumentar, de una manera específica de la sinapsis, la probabilidad de potenciales de acción de las neuronas piramidales de CA3. De manera notable, la generación de potenciales de acción aumentó en respuesta al lactato. Este fenómeno se observó tanto a nivel sináptico como somático. Aunque la respuesta es la misma, es decir, una mayor descarga de potenciales de acción, el mecanismo de activación es bastante diferente. Por un lado, nuestros datos muestran que el lactato aumenta el acoplamiento EPSP-espiga, un

fenómeno restringido a la sinapsis C/A. Por otro lado, encontramos un aumento de la excitabilidad intrínseca en respuesta a la inyección somática de corriente. El primero implica la modulación pre y postsináptica de los receptores de neurotransmisores y quizás los canales iónicos, mientras que el segundo implica la modulación somática de las conductancias iónicas que dan forma a la salida de PC. Un informe anterior demostró que la activación somática de las neuronas CA3 regula negativamente los canales de potasio de tipo D (Kv1.2) ubicados en las dendritas apicales distales, un mecanismo dependiente del  $\text{Ca}^{2+}$  y de las proteínas tirosina quinasas (PTK). La regulación a la baja de los canales de Kv promueve una mayor excitabilidad somática (Hyun et al., 2013). Dado que el lactato promueve la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  para inducir la potenciación sináptica, el lactato puede activar un mecanismo de señalización de PTK que, a su vez, podría facilitar cambios en la expresión de los canales de potasio tipo D ubicados en las sinapsis distales de CA3 PC, es decir, sinapsis colaterales recurrentes. Si este es el caso, queda por demostrar si el lactato ejerce una modulación dendrítica de los canales de potasio, como un mecanismo plausible subyacente al acoplamiento EPSP-espiga. Por otro lado, un número creciente de trabajos demostró que el lactato modula múltiples canales iónicos y modifica la descarga de disparo y la excitabilidad intrínseca (Angamo et al., 2016; Bozzo et al., 2013; Herrera-López and Galván, 2018; Jorwal and Sikdar, 2019; Parsons and Hirasawa, 2010; Rannou et al., 2012). Por lo tanto, es razonable suponer que el lactato puede ejercer acciones específicas sobre una entrada sináptica (C/A) y simultáneamente ejercer acciones moduladoras sobre las conductancias iónicas que dan forma a la descarga del potencial de acción.



**Figura 17. Modelo propuesto del mecanismo celular de inducción de potenciación sináptica. A)**

Representación esquemática de la potenciación sináptica mediada por lactato en la sinapsis RC de las células piramidales CA3. El lactato activa un receptor de siete dominios transmembranales, acoplado a proteína Gs. La activación de este receptor induce un cambio conformacional que activa el sistema efector Gs y promueve la separación de las subunidades βγ. A su vez, las subunidades βγ activan la vía de señalización de inositol-1,4,5-trifosfato 3-quinasa (PI3-K), que a su vez promueve la activación de la proteína quinasa C (PKC), probablemente a través de PDK1, un rico dominio de homología pleckstrina, -proteína residual capaz de responder al fosfatidilinositol (3,4,5) -trifosfato (PIP3). PI-3-K también puede facilitar la incorporación de receptores AMPA en la sinapsis, para inducir y mantener la potenciación. Es probable que la forma activa de PKC fosforila el NMDAR y promueva la entrada de Ca<sup>2+</sup>, que a su vez activa CaMKII para mejorar la fuerza sináptica de las sinapsis C/A. Se representa en color verde el receptor NMDA y en salmón, el receptor AMPA. En rojo, de siete dominios transmembranales, un receptor putativo acoplado a proteína Gs, que reconoce lactato. **B)** Modulación presináptica del lactato en las sinapsis C/A y MF. Tras su acumulación, el lactato se transporta al medio intracelular a través del transportador de monocarboxilatos membranal 2 (MCT2) y se metaboliza a piruvato por la enzima lactato deshidrogenasa (LDH). Después de este paso metabólico, el piruvato ingresa al ciclo de Krebs para sintetizar ATP y, en segundo lugar, adenosina. Dado que las terminales C/A y MF expresan el receptor inhibitorio de adenosina A1, la activación del receptor A1 puede ser responsable de la

depresión de la transmisión sináptica observada durante la perfusión de lactato. Se requieren más experimentos para probar esta hipótesis. Centro inferior: A nivel postsináptico, la perfusión de lactato aumenta la descarga de potencial de acción de CA3 PC, mediante un mecanismo sensible a la toxina del cólera. Las conductancias subyacentes moduladas por el lactato extracelular que opera el aumento de la excitabilidad intrínseca quedan por determinar.

#### Sección 9.04 Implicaciones fisiológicas

En el hipocampo, la concentración extracelular de lactato fluctúa en el rango milimolar bajo, entre 1 y 1.4 mM (Abi-Saab et al., 2002; Harada et al., 1993, 1992; Merboldt et al., 1992; Prichard et al., 1991); y la actividad fisiológica, como la activación de la corteza entorrinal o la estimulación astrocítica, induce la acumulación de lactato que se desarrolla a los pocos segundos de la activación neural (Hu and Wilson, 1997; Sotelo-Hitschfeld et al., 2012). Por otro lado, la red excitadora predominante del área CA3 surge de los axones colaterales de las células piramidales CA3, una red recurrente con fuerza sináptica altamente modificable y que depende principalmente de NMDAR (Fellini et al., 2009; Ishizuka et al., 1990; Nakazawa et al., 2003; Weisskopf and Nicoll, 1995). Diversos modelos computacionales apuntan a los circuitos C/A del área CA3 como la red autoasociativa que subyace a la finalización del patrón, la capacidad de recuperar información completa sobre la base de señales de recuperación incompletas almacenadas en el área CA3 del hipocampo (Leutgeb and Leutgeb, 2007; McNaughton and Morris, 1987; Treves and Rolls, 1994). Debido a que nuestras observaciones experimentales demuestran que el lactato favorece la potenciación en las sinapsis C/A mientras que no tiene un efecto a largo plazo en la transmisión de MF, planteamos la hipótesis de que los aumentos transitorios en el lactato extracelular favorecen el proceso mnemónico de finalización del patrón al fortalecer las sinapsis C/A y facilitar la salida de las células piramidales CA3 sin comprometer la transmisión sináptica mediada por las fibras musgosas provenientes del giro dentado.

## Artículo X. Conclusiones

El lactato funciona como neuromodulador específico ya que induce potenciación sináptica en las fibras comisurales de asociación-CA3 mediante la activación de un receptor acoplado a proteína Gs.

La especificidad del lactato se logra gracias a su metabolismo, ya que la adenosina producida actúa sobre receptores A1 presinápticos en las fibras musgosas, previniendo la inducción de potenciación sináptica.

## Artículo XI. Perspectivas

- El estudio más profundo de estas y otras vías de señalización implicadas en el proceso de potenciación sináptica del lactato, mediante técnicas bioquímicas, y modelos genéticos como un ratón knock-out para el receptor HCA1.
- El estudio a profundidad de la naturaleza bioquímica y estructural del receptor putativo a lactato descrito en esta tesis.
- Dado que el lactato potenció la sinapsis C/A-CA3, que se relaciona con el proceso de terminación de patrones, se pretende realizar estudios conductuales para conocer las implicaciones del lactato en esta forma de memoria.
- Estudiar más a fondo el mecanismo detrás del cual el lactato afecta la liberación de neurotransmisores a nivel presináptico en las sinapsis estudiadas en CA3.

- Estudiar si el efecto presináptico se asocia con impedimento en la generación de nuevas memorias a corto plazo y en particular con el proceso de separación de patrones a nivel conductual, en el cual está implicada la sinapsis MF-CA3.

## Artículo XII. Bibliografía

Abi-Saab, W.M., Maggs, D.G., Jones, T., Jacob, R., Srihari, V., Thompson, J., Kerr, D., Leone, P., Krystal, J.H., Spencer, D.D., During, M.J., Sherwin, R.S., 2002. Striking differences in glucose and lactate levels between brain extracellular fluid and plasma in conscious human subjects: effects of hyperglycemia and hypoglycemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 22, 271–279. <https://doi.org/10.1097/00004647-200203000-00004>

Angamo, E.A., Roesner, J., Liotta, A., Kovacs, R., Heinemann, U., 2016. A neuronal lactate uptake inhibitor slows recovery of extracellular ion concentration changes in the hippocampal CA3 region by affecting energy metabolism. *J. Neurophysiol.* 116, 2420–2430. <https://doi.org/10.1152/jn.00327.2016>

Barros, L.F., 2013. Metabolic signaling by lactate in the brain. *Trends Neurosci.* 36, 396–404. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.04.002>

Bergersen, L.H., 2007. Is lactate food for neurons? Comparison of monocarboxylate transporter subtypes in brain and muscle. *Neuroscience* 145, 11–9. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.11.062>

Bergersen, L.H., Gjedde, A., 2012. Is lactate a volume transmitter of metabolic states of the brain? *Front. Neuroenergetics* 4, 1–6. <https://doi.org/10.3389/fnene.2012.00005>

Bittner, C.X., Valdebenito, R., Ruminot, I., Loaiza, A., Larenas, V., Sotelo-Hitschfeld, T., Moldenhauer, H., San Martín, A., Gutiérrez, R., Zambrano, M., Barros, L.F., 2011. Fast and reversible stimulation of astrocytic glycolysis by K<sup>+</sup> and a delayed and persistent effect of glutamate. *J. Neurosci.* 31, 4709–4713. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5311-10.2011>

Bozzo, L., Puyal, J., Chatton, J.-Y., 2013. Lactate modulates the activity of primary cortical neurons through a receptor-mediated pathway. *PLoS One* 8, 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071721>

Brocard, F., Shevtsova, N.A., Bouhadfane, M., Tazerart, S., Heinemann, U., Rybak, I.A., Vinay, L., 2013. Activity-Dependent Changes in Extracellular Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup> Reveal Pacemakers in the Spinal Locomotor-Related Network. *Neuron* 77, 1047–1054. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>

Brooks, G., 2009. Cell-cell and intracellular lactate shuttles. *J. Physiol.* 587, 5591–600. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.178350>

- Carrard, A., Elsayed, M., Margineanu, M., Boury-Jamot, B., Fragnière, L., Meylan, E.M., Petit, J.M., Fiumelli, H., Magistretti, P.J., Martin, J.L., 2018. Peripheral administration of lactate produces antidepressant-like effects. *Mol. Psychiatry* 23, 392–399. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.179>
- Chen, L., Huang, L.-Y.M., 1992. Protein kinase C reduces Mg<sup>2+</sup> block of NMDA-receptor channels as a mechanism of modulation. *Lett. to Nat.* 356, 521–523.
- Debanne, D., Gähwiler, B.H., Thompson, S.M., 1998. Long-term synaptic plasticity between pairs of individual CA3 pyramidal cells in rat hippocampal slice cultures. *J. Physiol.* 507, 237–247. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1998.237bu.x>
- Debanne, D., Guérineau, N.C., Gähwiler, B.H., Thompson, S.M., 1996. Paired-pulse facilitation and depression at unitary synapses in rat hippocampus: quantal fluctuation affects subsequent release. *J. Physiol.* 491, 163–176. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1996.sp021204>
- Dienel, G., 2015. The metabolic trinity, glucose-glycogen-lactate, links astrocytes and neurons in brain energetics, signaling, memory, and gene expression. *Neurosci. Lett.* <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.02.052>
- Erllichman, J.S., Hewitt, A., Damon, T.L., Hart, M., Kuraszcz, J., Li, A., Leiter, J.C., 2008. Inhibition of monocarboxylate transporter 2 in the retrotrapezoid nucleus in rats: a test of the astrocyte-neuron lactate-shuttle hypothesis. *J. Neurosci.* 28, 4888–4896. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5430-07.2008>
- Evstratova, A., Tóth, K., 2014. Information processing and synaptic plasticity at hippocampal mossy fiber terminals. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 28. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00028>
- Fellini, L., Florian, C., Courtney, J., Rouillet, P., 2009. Pharmacological intervention of hippocampal CA3 NMDA receptors impairs acquisition and long-term memory retrieval of spatial pattern completion task. *Learn. Mem.* 16, 387–394. <https://doi.org/10.1101/lm.1433209>
- Fox, P., Raichle, M., Mintun, M., Dence, C., 1988. Nonoxidative glucose consumption during focal physiologic neural activity. *Science.* 241, 462–464. <https://doi.org/10.1126/science.3260686>
- Fox, P.T., Raichle, M.E., 1986. Focal physiological uncoupling of cerebral blood flow and oxidative metabolism during somatosensory stimulation in human subjects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 1140–1144. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.4.1140>
- Freund, T.F., Buzsáki, G., 1996. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6, 347–470. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1063\(1996\)6:4<347::AID-HIPO1>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1063(1996)6:4<347::AID-HIPO1>3.0.CO;2-I)
- Gaitonde, S.A., González-Maeso, J., 2017. Contribution of heteromerization to G protein-coupled receptor function. *Curr. Opin. Pharmacol.* 32, 23–31. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2016.10.006>

- Galow, L. V., Schneider, J., Lewen, A., Ta, T.T., Papageorgiou, I.E., Kann, O., 2014. Energy substrates that fuel fast neuronal network oscillations. *Front. Neurosci.* 8, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00398>
- Gilbert, E., Tang, J.M., Ludvig, N., Bergold, P.J., 2006. Elevated lactate suppresses neuronal firing in vivo and inhibits glucose metabolism in hippocampal slice cultures. *Brain Res.* 1117, 213–223. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.07.107>
- Gold, A.E., Kesner, R.P., 2005. The role of the CA3 subregion of the dorsal hippocampus in spatial pattern completion in the rat. *Hippocampus* 15, 808–814. <https://doi.org/10.1002/hipo.20103>
- Hagena, H., Manahan-Vaughan, D., 2011. Learning-facilitated synaptic plasticity at CA3 mossy fiber and commissural-associational synapses reveals different roles in information processing. *Cereb. Cortex* 21, 2442–2449. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhq271>
- Harada, M., Chienko, O., Teiji, S., Tsuyoshi, M., 1992. Cerebral extracellular glucose and lactate concentrations during and after moderate hypoxia in glucose- and saline-infused rats. *Anesthesiology* 77, 728–34. <https://doi.org/10.1167/8.5.1>
- Harada, M., Sawa, T., Okuda, C., Matsuda, T., Tanaka, Y., 1993. Effects of glucose load on brain extracellular lactate concentration in conscious rats using a microdialysis technique. *Horm. Metab. Res.* 25, 560–563. <https://doi.org/10.1055/s-2007-1002177>
- Harris, E.W., Cotman, C.W., 1986. Long-term potentiation of guinea pig mossy fiber responses is not blocked by N-methyl d-aspartate antagonists. *Neurosci. Lett.* 70, 132–137. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(86\)90451-9](https://doi.org/10.1016/0304-3940(86)90451-9)
- Herrera-López, G., Galván, E.J., 2018. Modulation of hippocampal excitability via the hydroxycarboxylic acid receptor 1. *Hippocampus* 28, 557–567. <https://doi.org/10.1002/hipo.22958>
- Hu, Y., Wilson, G.S., 1997. A temporary local energy pool coupled to neuronal activity: fluctuations of extracellular lactate levels in rat brain monitored with rapid-response enzyme-based sensor. *J. Neurochem.* 69, 1484–1490. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.69041484.x>
- Hussain, R.J., Carpenter, D.O., 2005. A Comparison of the Roles of Protein Kinase C in Long-Term Potentiation in Rat Hippocampal Areas CA1 and CA3. *Cell. Mol. Neurobiol.* 25, 649–661. <https://doi.org/10.1007/s10571-005-4045-8>
- Hyun, J.H., Eom, K., Lee, K.H., Ho, W.K., Lee, S.H., 2013. Activity-dependent downregulation of D-type K<sup>+</sup> channel subunit Kv1.2 in rat hippocampal CA3 pyramidal neurons. *J. Physiol.* 591, 5525–5540. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.259002>
- Ishizuka, N., Weber, J., Amaral, D.G., 1990. Organization of intrahippocampal projections originating from CA3 pyramidal cells in the rat. *J. Comp. Neurol.* 295, 580–623. <https://doi.org/10.1002/cne.902950407>

- Jorwal, P., Sikdar, S.K., 2019. Lactate reduces epileptiform activity through HCA1 and GIRK channel activation in rat subicular neurons in an in vitro model. *Epilepsia* 60, 2370–2385. <https://doi.org/10.1111/epi.16389>
- Jourdain, P., Rothenfusser, K., Ben-Adiba, C., Allaman, I., Marquet, P., Magistretti, P.J., 2018. Dual action of L-Lactate on the activity of NR2B-containing NMDA receptors: from potentiation to neuroprotection. *Sci. Rep.* 8, 13472. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31534-y>
- Kamiya, H., Ozawa, S., 1999. Dual mechanism for presynaptic modulation by axonal metabotropic glutamate receptor at the mouse mossy fibre-CA3 synapse. *J. Physiol.* 518 (2), 497–506. [https://doi.org/PHY\\_9145](https://doi.org/PHY_9145) [pii]
- Kamiya, H., Sawada, S., Yamamoto, C., 1988. Additive feature of long-term potentiation and phorbol ester-induced synaptic enhancement in the mossy fiber-CA3 synapse. *Exp. Neurol.* 102, 314–317. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(88\)90225-7](https://doi.org/10.1016/0014-4886(88)90225-7)
- Kandel, E.R., 2001. The molecular biology of memory storage: A dialogue between gene and synapses. *Science.* 294, 1030–1038. <https://doi.org/10.1126/science.1067020>
- Katz, B., Miledi, R., 1968. The Role of Calcium in Neuromuscular facilitation. *J. Physiol.* 195, 481–492. <https://doi.org/10.1016/b978-1-4832-8322-7.50066-2>
- Kety, S.S., 1957. THE GENERAL METABOLISM OF THE BRAIN IN VIVO, in: RICHTER, D. (Ed.), *Metabolism of the Nervous System*. Pergamon, pp. 221–237. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-08-009062-7.50026-6>
- Kuei, C., Yu, J., Zhu, J., Wu, J., Zhang, L., Shi, A., Mirzadegan, T., Lovenverg, T., Liu, C., 2011. Study of GPR81, the Lactate Receptor, from Distant Species Identifies Residues and Motifs Critical for GPR81 Functions. *Mol. Pharmacol.* 80, 848–858. <https://doi.org/10.1124/mol.111.074500>
- Kurosu, H., Maehama, T., Okada, T., Yamamoto, T., Hoshino, S.I., Fukui, Y., Ui, M., Hazeki, O., Katada, T., 1997. Heterodimeric phosphoinositide 3-kinase consisting of p85 and p110 $\beta$  is synergistically activated by the  $\beta\gamma$  subunits of G proteins and phosphotyrosyl peptide. *J. Biol. Chem.* 272, 24252–24256. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.39.24252>
- Kwon, H.B., Castillo, P.E., 2008. Long-Term Potentiation Selectively Expressed by NMDA Receptors at Hippocampal Mossy Fiber Synapses. *Neuron* 57, 108–120. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.11.024>
- Lan, J.Y., Skeberdis, V. a., Jover, T., Grooms, S.Y., Lin, Y., Araneda, R.C., Zheng, X., Bennett, M.V.L., Zukin, R.S., 2001. Protein kinase C modulates NMDA receptor trafficking and gating. *Nat. Neurosci.* 4, 382–390. <https://doi.org/10.1038/86028>
- Lauritzen, K.H., Morland, C., Puchades, M., Holm-Hansen, S., Hagelin, E.M., Lauritzen, F., Attramadal, H., Storm-Mathisen, J., Gjedde, A., Bergersen, L.H., 2014. Lactate Receptor Sites Link Neurotransmission, Neurovascular Coupling, and Brain Energy Metabolism. *Cereb. Cortex* 10, 2784–95. <https://doi.org/10.1093/cercor/bht136>

- Lee, D.K., Nguyen, T., Lynch, K.R., Cheng, R., Vanti, W.B., Arkhitko, O., Lewis, T., Evans, J.F., George, S.R., O'Dowd, B.F., 2001. Discovery and mapping of ten novel G protein-coupled receptor genes. *Gene* 275, 83–91.
- Lerchundi, R., Fernández-Moncada, I., Contreras-Baeza, Y., Sotelo-Hitschfeld, T., Mächler, P., Wyss, M.T., Stobart, J., Baeza-Lehnert, F., Alegría, K., Weber, B., Barros, L.F., 2015. NH<sub>4</sub><sup>+</sup> triggers the release of astrocytic lactate via mitochondrial pyruvate shunting. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 11090–11095. <https://doi.org/10.1073/pnas.1508259112>
- Leutgeb, S., Leutgeb, J.K., 2007. Pattern separation, pattern completion, and new neuronal codes within a continuous CA3 map. *Learn. Mem.* 14, 745–757. <https://doi.org/10.1101/lm.703907>
- Liao, G.-Y., Wagner, D.A., Hsu, M.H., Leonard, J.P., 2001. Evidence for Direct Protein Kinase-C Mediated Modulation of N-Methyl-D-aspartate Receptor Current.
- Liu, C., Kuei, C., Zhu, J., Yu, J., Zhang, L., Shih, A., Mirzadegan, T., Shelton, J., Sutton, S., Connelly, M.A., Lee, G., Carruthers, N., Wu, J., Lovenberg, T.W., 2012. 3,5-Dihydroxybenzoic Acid, a Specific Agonist for Hydroxycarboxylic Acid 1, Inhibits Lipolysis in Adipocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 341, 794–801.
- Liu, C., Wu, J., Zhu, J., Kuei, C., Yu, J., Shelton, J., Sutton, S.W., Li, X., Yun, S.J., Mirzadegan, T., Mazur, C., Kamme, F., Lovenberg, T.W., 2009. Lactate inhibits lipolysis in fat cells through activation of an orphan G-protein-coupled receptor, GPR81. *J. Biol. Chem.* 284, 2811–22. <https://doi.org/10.1074/jbc.M806409200>
- Lomo, T., 2003. The discovery of long-term potentiation. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 358, 617–620. <https://doi.org/10.1098/rstb.2002.1226>
- Lu, F.M., Hawkins, R.D., 2006. Presynaptic and postsynaptic Ca<sup>2+</sup> and CamKII contribute to long-term potentiation at synapses between individual CA3 neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 4264–4269. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508162103>
- Lu, W.Y., Xiong, Z.G., Lei, S., Orser, B. a, Dudek, E., Browning, M.D., MacDonald, J.F., 1999. G-protein-coupled receptors act via protein kinase C and Src to regulate NMDA receptors. *Nat. Neurosci.* 2, 331–338. <https://doi.org/10.1038/7243>
- Luttrell, L.M., Van Biesen, T., Hawes, B.E., Koch, W.J., Touhara, K., Lefkowitz, R.J., 1995. G(βγ) subunits mediate mitogen-activated protein kinase activation by the tyrosine kinase insulin-like growth factor 1 receptor. *J. Biol. Chem.* <https://doi.org/10.1074/jbc.270.28.16495>
- Maddock, R.J., Buonocore, M.H., Copeland, L.E., Richards, L., 2009. Elevated brain lactate responses to neural activation in panic disorder: a dynamic 1H-MRS study. *Mol. Psychiatry* 14, 537–545. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4002137>
- Magistretti, P.J., Allaman, I., 2015. A Cellular Perspective on Brain Energy Metabolism and Functional Imaging. *Neuron* 86, 883–901. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.03.035>

- Mandrika, I., Petrovska, R., Klovins, J., 2010. Evidence for constitutive dimerization of niacin receptor subtypes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 395, 281–287. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.04.011>
- Margineanu, M.B., Mahmood, H., Fiumelli, H., Magistretti, P.J., 2018. L-Lactate Regulates the Expression of Synaptic Plasticity and Neuroprotection Genes in Cortical Neurons: A Transcriptome Analysis. *Front. Mol. Neurosci.* 11, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00375>
- McNaughton, B.L., Morris, R.G.M., 1987. Hippocampal synaptic enhancement and information storage within a distributed memory system. *Trends Neurosci.* 10, 408–415. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(87\)90011-7](https://doi.org/10.1016/0166-2236(87)90011-7)
- Merboldt, K.-D., Bruhn, H., Hanicke, W., Michaelis, T., Frahm, J., 1992. Decrease of glucose in the human visual cortex during photic stimulation. *Magn. Reson. Med.* 25, 187–194. <https://doi.org/10.1002/mrm.1910250119>
- Mishra, R.K., Kim, S., Guzman, S.J., Jonas, P., 2016. Symmetric spike timing-dependent plasticity at CA3-CA3 synapses optimizes storage and recall in autoassociative networks. *Nat. Commun.* 7, 1–11. <https://doi.org/10.1038/ncomms11552>
- Moore, K.A., Nicoll, R.A., Schmitz, D., 2003. Adenosine gates synaptic plasticity at hippocampal mossy fiber synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 14397–14402. <https://doi.org/10.1073/pnas.1835831100>
- Mosienko, V., Teschemacher, A.G., Kasparov, S., 2015. Is L-lactate a novel signaling molecule in the brain? *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 35, 1069–1075. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2015.77>
- Nakazawa, K., Quirk, M., Chitwood, R., 2002. Requirement for hippocampal CA3 NMDA receptors in associative memory recall. *Science.* 297, 211–218. <https://doi.org/10.1126/science.1071795.Requirement>
- Nakazawa, K., Sun, L.D., Quirk, M.C., Rondi-Reig, L., Wilson, M. a., Tonegawa, S., 2003. Hippocampal CA3 NMDA receptors are crucial for memory acquisition of one-time experience. *Neuron* 38, 305–315. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00165-X](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00165-X)
- Neves, G., Cooke, S.F., Bliss, T.V.P., 2008. Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 65–75. <https://doi.org/10.1038/nrn2303>
- Newman, L., Korol, D.L., Gold, P.E., 2011. Lactate produced by glycogenolysis in astrocytes regulates memory processing. *PLoS One* 6, 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028427>
- Parsons, M.P., Hirasawa, M., 2010. ATP-sensitive potassium channel-mediated lactate effect on orexin neurons: implications for brain energetics during arousal. *J. Neurosci.* 30, 8061–70. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5741-09.2010>

- Pelkey, K. a, McBain, C.J., 2008. Target-cell-dependent plasticity within the mossy fibre-CA3 circuit reveals compartmentalized regulation of presynaptic function at divergent release sites. *J. Physiol.* 586, 1495–502. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.148635>
- Pellerin, L., Magistretti, P.J., 2012. Sweet sixteen for ANLS. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 32, 1152–1166. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2011.149>
- Pellerin, L., Magistretti, P.J., 1994. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 10625–10629. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.22.10625>
- Pierre, K., Pellerin, L., 2005. Monocarboxylate transporters in the central nervous system: distribution, regulation and function. *J. Neurochem.* 94, 1–14. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03168.x>
- Prichard, J., Rothmans, D., Novotny, E., Petroff, O., Kuwabara, T., Avisonf, M., Howseman, A., li, C.H., Shulman, R., 1991. Lactate rise detected by <sup>1</sup>H NMR in human visual cortex during physiologic stimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 5829–5831.
- Rae, C., Nasrallah, F., Bröer, S., 2009. Metabolic effects of blocking lactate transport in brain cortical tissue slices using an inhibitor specific to MCT1 and MCT2. *Neurochem. Res.* 34, 1783–1791. <https://doi.org/10.1007/s11064-009-9973-0>
- Rafiki, A., Boulland, J.L., Halestrap, A.P., Ottersen, O.P., Bergersen, L., 2003. Highly differential expression of the monocarboxylate transporters MCT2 and MCT4 in the developing rat brain. *Neuroscience* 122, 677–688. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2003.08.040>
- Rannou, F., Leschiera, R., Giroux-Metges, M., Pennec, J.P., 2012. Effects of lactate on the voltage-gated sodium channels of rat skeletal muscle: modulating current opinion. *J. Appl. Physiol.* 112, 1454–65. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00944.2011>
- Rebola, N., Carta, M., Lanore, F., Blanchet, C., Mulle, C., 2011. NMDA receptor-dependent metaplasticity at hippocampal mossy fiber synapses. *supplementary. Nat. Neurosci.* 14, 691–693. <https://doi.org/10.1038/nn.2809>
- Rebola, N., Carta, M., Mulle, C., 2017. Operation and plasticity of hippocampal CA3 circuits: implications for memory encoding. *Nat. Rev. Neurosci.* 18, 208–220. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.10>
- Rebola, N., Lujan, R., Cunha, R., Mulle, C., 2008. Adenosine A2A receptors are essential for long-term potentiation of NMDA-EPSCs at hippocampal mossy fiber synapses. *Neuron* 57, 121–34. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.11.023>
- Requardt, R.P., Hirrlinger, P.G., Wilhelm, F., Winkler, U., Besser, S., Hirrlinger, J., 2012. Ca<sup>2+</sup> signals of astrocytes are modulated by the NAD<sup>+</sup>/NADH redox state. *J. Neurochem.* 120, 1014–25. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2012.07645.x>

Rouach, N., Koulakoff, A., Abudara, V., Willecke, K., Giaume, C., 2008. Astroglial Metabolic Networks Sustain Hippocampal Synaptic Transmission. *Science* 322, 1551–1555. <https://doi.org/10.1126/science.1164022>

Ruminot, I., Gutierrez, R., Pena-Munzenmayer, G., Anazco, C., Sotelo-Hitschfeld, T., Lerchundi, R., Niemeyer, M.I., Shull, G.E., Barros, L.F., 2011. NBCE1 Mediates the Acute Stimulation of Astrocytic Glycolysis by Extracellular K<sup>+</sup>. *J. Neurosci.* 31, 14264–14271. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2310-11.2011>

Sloviter, R.S., 1991. Feedforward and feedback inhibition of hippocampal principal cell activity evoked by perforant path stimulation: GABA-mediated mechanisms that regulate excitability in vivo. *Hippocampus* 1, 31–40. <https://doi.org/10.1002/hipo.450010105>

Smith, N.J., Milligan, G., 2010. Allosteric at G protein-coupled receptor homo- and heteromers: Uncharted pharmacological landscapes. *Pharmacol. Rev.* 62, 701–725. <https://doi.org/10.1124/pr.110.002667>

Sotelo-Hitschfeld, T., Fernández-Moncada, I., Barros, L.F., 2012. Acute feedback control of astrocytic glycolysis by lactate. *Glia* 60, 674–680. <https://doi.org/10.1002/glia.22304>

Steinman, M.Q., Gao, V., Alberini, C.M., 2016. The Role of Lactate-Mediated Metabolic Coupling between Astrocytes and Neurons in Long-Term Memory Formation. *Front. Integr. Neurosci.* 10, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fnint.2016.00010>

Sullivan, J.M., Traynelis, S.F., Chen, H.S.V., Escobar, W., Heinemann, S.F., Lipton, S.A., 1994. Identification of two cysteine residues that are required for redox modulation of the NMDA subtype of glutamate receptor. *Neuron* 13, 929–936. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(94\)90258-5](https://doi.org/10.1016/0896-6273(94)90258-5)

Suzuki, A., Stern, S., Bozdagi, O., Huntley, G.W., Walker, R.H., Magistretti, P.J., Alberini, C.M., 2011. Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation. *Cell* 144, 810–23. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.018>

Takata, T., Sakurai, T., Yang, B., Yokono, K., Okada, Y., 2001. Effect of lactate on the synaptic potential, energy metabolism, calcium homeostasis and extracellular glutamate concentration in the dentate gyrus of the hippocampus from guinea-pig. *Neuroscience* 104, 371–8.

Tang, F., Lane, S., Korsak, A., Paton, J.F.R., Gourine, A. V, Kasparov, S., Teschemacher, A.G., 2014. Lactate-mediated glia-neuronal signalling in the mammalian brain. *Nat. Commun.* 5, 1–13. <https://doi.org/10.1038/ncomms4284>

Thompson, S.M., Haas, H.L., Gähwiler, B.H., 1992. Comparison of the actions of adenosine at pre- and postsynaptic receptors in the rat hippocampus in vitro. *J. Physiol.* 451, 347–363. <https://doi.org/10.1002/cncy.20162>

Treves, A., Rolls, E., 1994. Computational analysis of the role of the hippocampus in memory. *Hippocampus* 4, 374–391.

- van Strien, N.M., Cappaert, N.L.M., Witter, M.P., 2009. The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 272–82. <https://doi.org/10.1038/nrn2614>
- Villardaga, J.P., Agnati, L.F., Fuxe, K., Ciruela, F., 2010. G-protein-coupled receptor heteromer dynamics. *J. Cell Sci.* 123, 4215–4220. <https://doi.org/10.1242/jcs.063354>
- Vodovozov, W., Schneider, J., Elzoheiry, S., Hollnagel, J.O., Lewen, A., Kann, O., 2018. Metabolic modulation of neuronal gamma-band oscillations. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 470, 1377–1389. <https://doi.org/10.1007/s00424-018-2156-6>
- Wang, T.A., Yu, Y. V, Govindaiah, G., Ye, X., 2012. Circadian Rhythm of Redox State Regulates Excitability in Suprachiasmatic Nucleus Neurons. *Science.* 337, 839–842.
- Weisskopf, M.G., Castillo, P.E., Zalutsky, R.A., Nicoll, R.A., 1994. Mediation of hippocampal mossy fiber long-term potentiation by cyclic AMP. *Science.* 265, 1878–1882. <https://doi.org/10.1126/science.1064285>
- Weisskopf, M.G., Nicoll, R.A., 1995. Presynaptic changes during mossy fibre LTP revealed by NMDA receptor-mediated synaptic responses. *Nature* 376, 256–259. <https://doi.org/10.1038/376256a0>
- Yang, J., Ruchti, E., Petit, J.-M., Jourdain, P., Grenningloh, G., Allaman, I., Magistretti, P.J., 2014. Lactate promotes plasticity gene expression by potentiating NMDA signaling in neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 12228–12233. <https://doi.org/10.1073/pnas.1322912111>
- Yoshino, M., Sawada, S., Yamamoto, C., Kamiya, H., 1996. A metabotropic glutamate receptor agonist DCG-IV suppresses synaptic transmission at mossy fiber pathway of the guinea pig hippocampus. *Neurosci. Lett.* 207, 70–72.
- Zucker, R.S., Regehr, W.G., 2002. Short-term synaptic plasticity. *Annu. Rev. Physiol.* 64, 355–405. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.64.092501.114547>