

Efecto del contacto intercelular sobre el metabolismo de lactato en astrocitos de rata en cultivo

Effect of cell-to-cell contact on the metabolism of rat cultured astrocytes

SÁNCHEZ-ABARCA, L. I.; ORFAO *, A.; TABERNERO, A. y MEDINA, J. M.
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Farmacia. Universidad de Salamanca. Edificio Departamental. Avda. Campo Charro, s/n. 37007 Salamanca. España.

RESUMEN

Durante la proliferación y diferenciación celular se producen drásticos cambios en el metabolismo de la célula. Estos cambios pueden estar ocasionados por los distintos requerimientos del ciclo celular, así como por las demandas metabólicas de la diferenciación. En este trabajo investigamos el efecto del contacto intercelular sobre la utilización de lactato en astrocitos de rata en cultivo. Para ello, se cultivaron durante 14 días astrocitos procedentes de neonatos de rata, momento en que se disociaron y se resembraron, para de este modo, interrumpir el contacto intercelular. Se determinó la velocidad de oxidación y lipogénesis de lactato en cada uno de los tres días posteriores a la resiembra. Después de resembrar, la velocidad de oxidación y lipogénesis disminuyó aproximadamente un 40%. Un día después de resembrar, los valores de oxidación observados después de 14 días en cultivo primario fueron recuperados, aunque estos valores de oxidación decrecen apreciablemente 3 días después. Estos resultados sugieren que la utilización de lactato es inhibida cuando se pierde el contacto intercelular.

Palabras clave: Astrocitos. Contacto intercelular. Metabolismo. Lactato. Proliferación.

ABSTRACT

Striking changes in metabolism are observed due to cell proliferation and differentiation. These changes may be partly accounted for by cell cycle requirements although differentiation relies on metabolic changes. In this work, we attempted to investigate the effect of cell-to-cell contact on lactate utilization as a source of energy and carbon skeletons. After 14 days in primary culture, astrocytes were replated and the rates of lactate oxidation and lipogenesis were followed over 3d after replating. Under these circumstances, the rate of lactate utilization decreased by about 40% as compared to that observed after 14d in primary culture. One day after replating, the rates of lactate oxidation observed

* Servicio de Citometría. Universidad de Salamanca. Salamanca. España.

after 14 days in primary culture were regained. However, the rate of lactate oxidation decreased sharply 3 days after replating. these results suggest that lactate oxidation is inhibited when cell-to-cell contact is disrupted.

Key words: Astrocytes. Cell-to-cell contact. Metabolism. Lactate. Proliferation.

Recibido: 12-12-96.

Aceptado: 20-12-96.

BIBLID [0004-2927(1996) 37:4; 719-728]

INTRODUCCIÓN

Los astrocitos constituyen la glía mayoritaria del sistema nervioso central. En la rata, estas células comienzan a aparecer durante la etapa embrionaria y permanecen proliferando hasta que comienza la diferenciación después del nacimiento (1). Una de las características de estas células es que se encuentran altamente comunicadas entre si a través de canales intermembrana denominados uniones comunicantes o "gap junctions" (2). Por tanto, el contacto intercelular en los astrocitos adquiere especial relevancia, ya que es un paso previo para establecer la comunicación y por tanto la diferenciación (3).

Durante los últimos años se ha puesto de manifiesto la importancia del lactato como sustrato metabólico para el cerebro durante el período perinatal (ver revisión: (4)). En concreto, los astrocitos quiescentes, en cultivo primario, utilizan el lactato como sustrato preferente, tanto para la obtención de energía como de esqueletos carbonados (5, 6). Sin embargo durante el período postnatal temprano parte de los astrocitos se encuentran en activa proliferación, mientras que otros establecen contactos intercelulares y comienzan a diferenciarse (7). Cabe esperar que el metabolismo celular experimente notables cambios dependiendo del estado celular. Estos cambios pueden estar justificados por los requerimientos del ciclo celular, así como por las demandas metabólicas de la célula en diferenciación. Por todo ello, decidimos investigar el efecto de la proliferación y el contacto intercelular en la utilización de lactato como sustrato energético y lipogénico en astrocitos de rata en cultivo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), penicilina, estreptomycin, pol-L-lisina, DNasa y albúmina fueron suministrados por Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo., U.S.A.). El suero fetal de ternero (FCS) y la tripsina se

obtuvieron de Serva Boëhringer Ingelheim (Heidelberg, Alemania). Otros productos utilizados en la preparación de disoluciones procedieron de las casas Sigma Cheemical Co. (St. Louis, Mo., U.S.A.) y Merck (Darmstadt, Alemania).

Métodos

Para la preparación de cultivos primarios de astrocitos se emplearon neonatos de rata albina Wistar de 0-24 h de vida postnatal tal y como se ha descrito previamente (5). Las células se cultivaron en DMEM suplementado con un 10% de FCS. Después de 14 días *in vitro* (14 DIV), los astrocitos formaban una monocapa de células quiescentes (5). Con objeto de impedir el contacto intercelular, la monocapa de astrocitos de 14 DIV se disoció y resembró. A las células se les permitió fijarse en las placas de cultivo durante 14 horas, momento que fue considerado día 0 después de resembrar y se mantuvieron tres días más en cultivo. Las diferentes poblaciones celulares de astrocitos y su ciclo celular fueron analizados mediante citometría de flujo. Al menos 10000 eventos por experimento fueron analizados en un citómetro FACScan. La diferente morfología, tamaño y autofluorescencia de los astrocitos tipo-1 y tipo-2 hizo posible su identificación mediante citometría de flujo (8). La determinación de las diferentes fases del ciclo celular se realizó en núcleos teñidos con yoduro de propidio siguiendo el método de Vindelov et al (9). La velocidad de oxidación y lipogénesis a partir de lactato fueron determinadas durante cada uno de los tres días posteriores a la resiembra siguiendo el método previamente descrito (10). Los astrocitos se incubaron durante 1 hora a 37°C en PBS que contenía lactato 10,5 mM y aproximadamente 100 DPM/nmol de [U-¹⁴C]-lactato en presencia o ausencia de un 2% albúmina bovina (BSA) o dicloroacetato (DCA) 1 mM. Se determinó la velocidad de oxidación de lactato mediante la cuantificación del [¹⁴CO₂] liberado durante la incubación. Asimismo, se determinó la velocidad de síntesis de lípidos a partir de lactato, cuantificando la radioactividad existente en el extracto lipídico.

RESULTADOS

Para estudiar el efecto del contacto intercelular sobre el metabolismo de lactato empleamos como control astrocitos quiescentes (14 DIV) que disociamos y resembramos como se indica en la sección de "material y métodos". En primer lugar comprobamos la composición del cultivo a distintos momentos después de resembrar. La figura 1 muestra que el cultivo de astrocitos de 14 DIV está compuesto aproximadamente por un 40% de astrocitos tipo-1, un

POBLACIONES DE ASTROCITOS

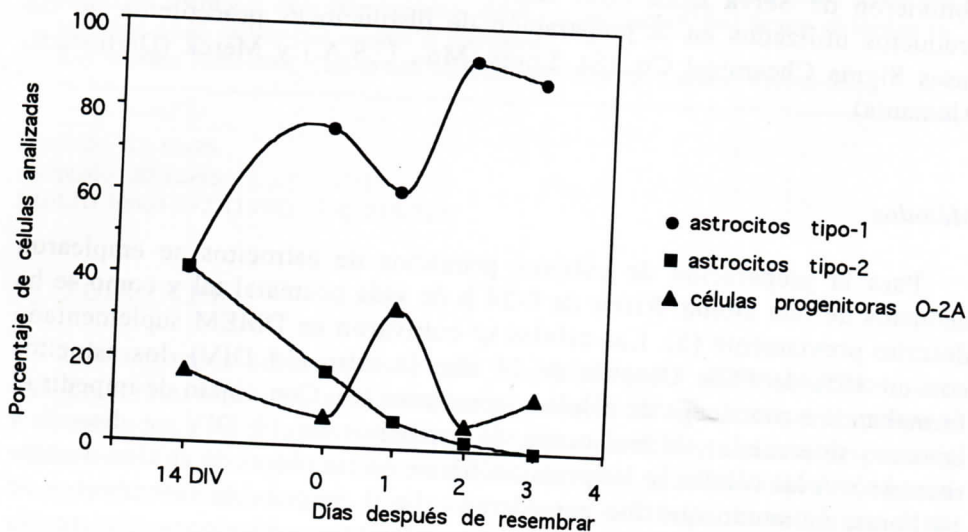


Fig. 1.—Porcentaje de las distintas poblaciones de astrocitos seguidas por citometría de flujo. Las suspensiones celulares de astrocitos fueron analizadas en los tiempos indicados mediante citometría de flujo como se describe en (. Los resultados se expresan como porcentaje de células analizadas. Los astrocitos tipo-1 aparecen representados por ●, los tipo-2 por ■ y las células progenitoras O-2A por ▲.

40% de astrocitos tipo-2, y un 20% de células progenitoras O-2A. La resiembra de las células provocó un enriquecimiento en el porcentaje de astrocitos tipo-1 que se mantuvo hasta el tercer día después de la resiembra. El ciclo celular fue analizado mediante citometría de flujo (figura 2). La pérdida del contacto celular indujo la proliferación de los astrocitos. Así, 0 días después de la resiembra se observó un incremento del porcentaje de células en fase de síntesis de DNA (fase S) y mitosis (G2/M) y una disminución de la fase de reposo (G0/G1). Como se puede apreciar, un día después de la resiembra la velocidad de proliferación disminuyó ligeramente, probablemente debido a la recuperación del contacto intercelular.

Una vez conocida la composición y estado proliferativo del cultivo de astrocitos tras interrumpir el contacto intercelular abordamos el estudio de su capacidad para metabolizar lactato. La velocidad de oxidación y lipogénesis de lactato disminuyó aproximadamente un 40% inmediatamente después de la resiembra (figura 3). Sin embargo un día después, la velocidad de oxidación de lactato recuperó los valores anteriores a la resiembra. La velocidad de lipogénesis aumentó un día después de resemar respecto al día 0, pero no recuperó los valores obtenidos a 14 DIV. Los días segundo y tercero después de resemar, la oxidación de lactato decreció ligeramente, mientras que la

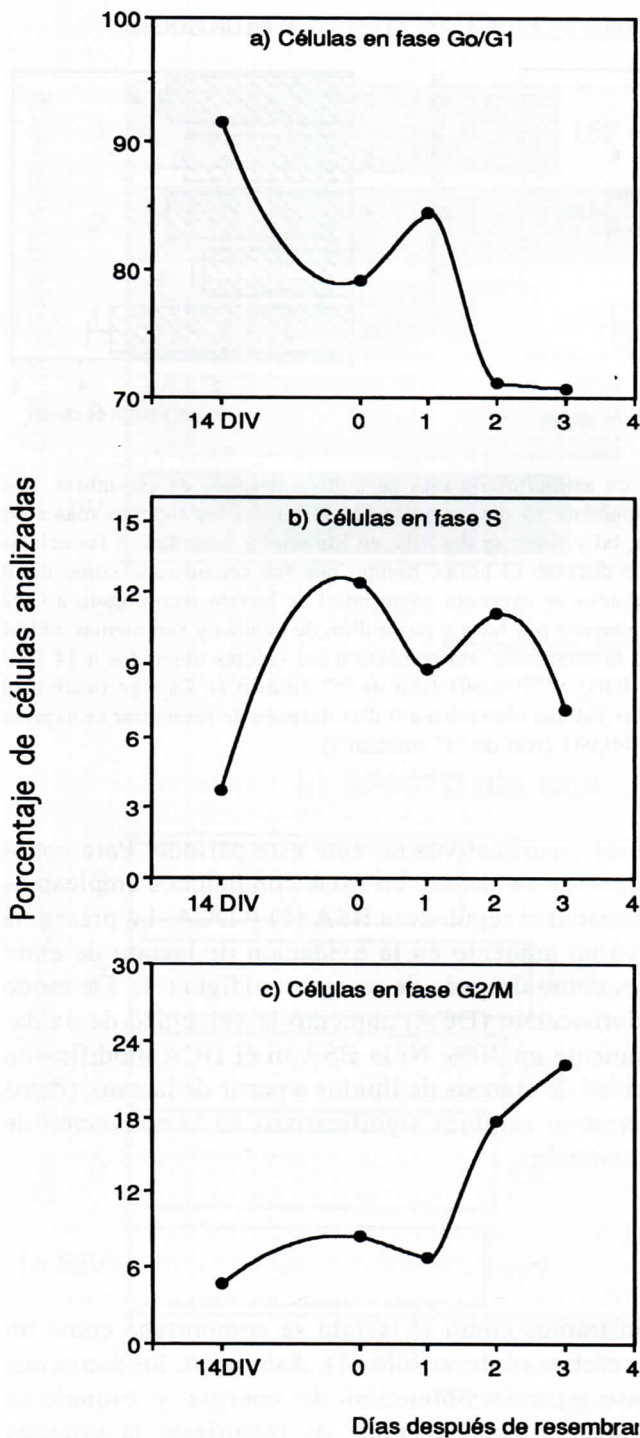


Fig. 2.—Porcentaje de astrocitos en diferentes fases del ciclo celular fueron analizadas por citometría de flujo, utilizando núcleos teñidos con yoduro de propidio. Los resultados se expresan como porcentaje de células en fase GO/G1 (a), fase S (b), y fase G2/M (c).

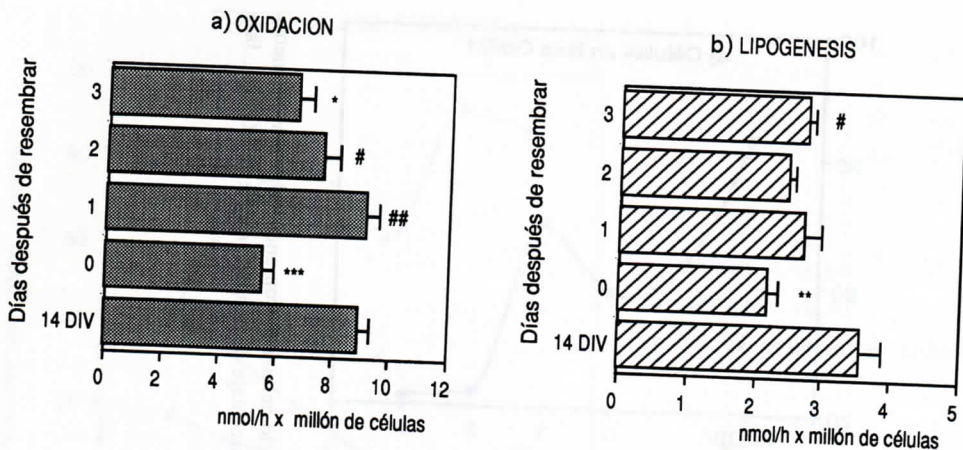


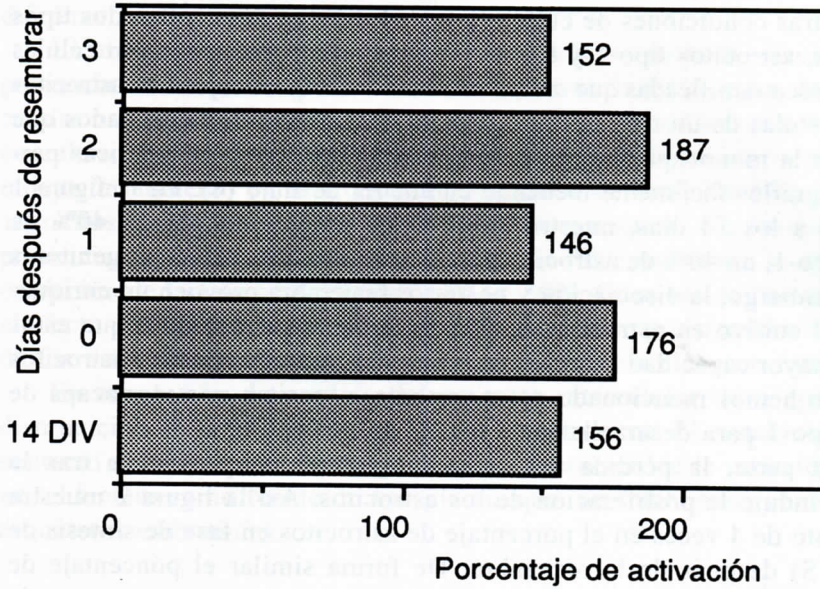
Fig. 3.—Utilización de lactato en astrocitos de rata en cultivo después de resemar. Los astrocitos fueron incubados después de 14 días in vitro (14 DIV) y a los tiempos marcados después de disociar y resemar, tal y como se describe en Material y Métodos. A las células se les permitió fijarse a la placa durante 14 horas, tiempo que fue considerado como día 0 después de resemar. Los resultados se expresan como nmol de lactato incorporado a CO₂ (a: oxidación) o lípidos (b: lipogénesis) por hora y por millón de células y son medias \pm SEM (n=4-14). La significatividad de la diferencia con respecto a los valores obtenidos a 14 DIV se expresa como *P<0,05; **P<0,01; ***P>0,001 (test de "t" Student's). La significatividad de la diferencia con respecto a los valores obtenidos a 0 días después de resemar se expresa como #P<0,05; ##P<0,01; ###P>0,001 (test de "t" Student's).

lipogénesis no sufrió cambios significativos durante este período. Para conocer la regulación de la utilización de lactato en estas condiciones empleamos dos agentes con conocida capacidad reguladora BSA (5) y DCA. La presencia de albúmina (BSA) provocó un aumento en la oxidación de lactato de entre un 50 y un 90%, tanto antes como después de resemar (figura 4). De modo similar la presencia de dicloroacetato (DCA) aumentó la velocidad de oxidación de lactato aproximadamente un 30%. Ni la BSA ni el DCA modificaron significativamente la velocidad de síntesis de lípidos a partir de lactato, (datos no mostrados). No se observaron cambios significativos en la activación de estos agentes debido a la resiembra.

DISCUSIÓN

En trabajos previos mostramos como el lactato se comportaba como un sustrato preferente para el cerebro en desarrollo (4). Asimismo, los astrocitos quiescentes utilizan lactato para la obtención de energía y esqueletos carbonados (5). En el presente trabajo se pone de manifiesto la estrecha

a) EFECTO DE LA ALBUMINA



b) EFECTO DEL DCA

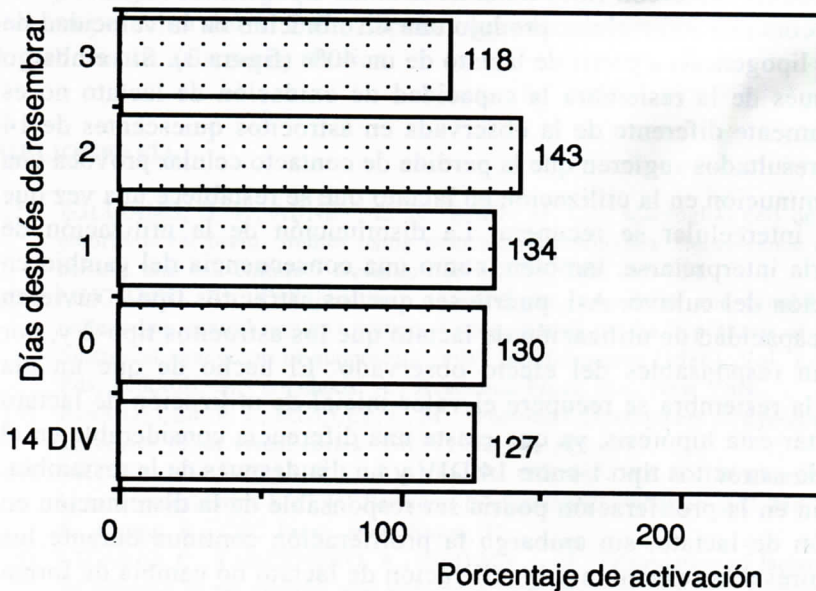


Fig. 4.—Efecto de la BSA y del DCA sobre la oxidación de lactato en astrocitos de rata en cultivo después de resembrar. Los astrocitos se incubaron después de 14 días *in vitro* (14 DIV) y a los tiempos indicados después de resembrar en presencia o en ausencia de albúmina bovina (BSA) al 2% ó dicloroacetato (DCA) 1 mM. A las células se les permitió fijarse a la placa durante 14 horas, tiempo que fue considerado día 0 después de resembrar. Los resultados se expresaron como porcentaje con respecto a los astrocitos no tratados (n=4-14).

relación entre el contacto intercelular y la utilización de lactato en astrocitos en cultivo.

En nuestras condiciones de cultivo a los 14 días, se desarrollan dos tipos de astrocitos, astrocitos tipo-1 y tipo-2 (8). Los astrocitos tipo-1 son células poligonales poco ramificadas que crecen formando una monocapa. Los astrocitos tipo-2 son células de un tamaño muy inferior, profusamente ramificados que crecen sobre la monocapa de astrocitos tipo-1 (7). Estas características permiten distinguirlos fácilmente mediante citometría de flujo (8). En la figura 1 puede verse a los 14 días, nuestro cultivo está compuesto por un 40% de astrocitos tipo-1, un 40% de astrocitos tipo-2 y el resto de células progenitoras O-2A. Sin embargo, la disociación y posterior resiembra provocó un enriquecimiento del cultivo en astrocitos tipo-1, probablemente debido a que estos tienen una mayor capacidad de adhesión a la placa, mientras que los astrocitos tipo-2, como hemos mencionado anteriormente, necesitan una monocapa de astrocitos tipo-1 para desarrollarse.

Por otra parte, la pérdida del contacto intercelular provocada tras la disociación indujo la proliferación de los astrocitos. Así la figura 2 muestra un incremento de 4 veces en el porcentaje de astrocitos en fase de síntesis de DNA (fase S) después de la resiembra. De forma similar el porcentaje de células en fase de mitosis (fase G2/M) aumenta tras la disociación y se puede observar que el efecto está más retrasado que la inducción de la síntesis de DNA.

El lactato es utilizado por los astrocitos de 14 días en cultivo como un excelente sustrato tanto con fines oxidativos como lipogénicos (figura 3). La pérdida del contacto intercelular produjo una disminución en la velocidad de oxidación y lipogénesis a partir de lactato de un 40% (figura 3). Sin embargo un día después de la resiembra la capacidad de oxidación de lactato no es significativamente diferente de la observada en astrocitos quiescentes de 14 DIV. Estos resultados sugieren que la pérdida de contacto celular provoca una drástica disminución en la utilización de lactato que se restablece una vez que el contacto intercelular se recupera. La disminución de la utilización de lactato podría interpretarse, también, como una consecuencia del cambio en la composición del cultivo. Así, podría ser que los astrocitos tipo-1 tuvieran una menor capacidad de utilización de lactato que los astrocitos tipo-2 y, por tanto, fueran responsables del efecto observado. El hecho de que un día después de la resiembra se recupere el valor inicial de utilización de lactato hace descartar esta hipótesis, ya que existe una diferencia considerable en el porcentaje de astrocitos tipo 1 entre 14 DIV y un día después de la resiembra. La inducción en la proliferación podría ser responsable de la disminución en la utilización de lactato, sin embargo la proliferación continua durante los días posteriores a la resiembra y la utilización de lactato no cambia de forma paralela a este efecto. Un día después de la resiembra los valores de oxida-

ción de lactato no son significativamente diferentes de los observados a los 14 DIV y sin embargo el porcentaje de células en proliferación es muy diferente.

La utilización de lactato puede ser regulada por distintos efectores. Así la presencia de albúmina produce un aumento en la utilización de lactato en células aisladas de cerebro de rata (11), así como en neuronas y en astrocitos en cultivo primario (5). La figura 4 muestra como la presencia de albúmina indujo un aumento en la oxidación de lactato de entre un 50 y un 90% en astrocitos tanto antes como después de la resiembra. De modo similar la presencia de dicloroacetato, activador de la PDH, aumentó la velocidad de oxidación de lactato aproximadamente un 30%. Estos resultados sugieren que el efecto de la albúmina es independiente del estado proliferativo o quiescente de los astrocitos y apuntan a la PDH como enzima clave en este proceso.

En conclusión, la pérdida del contacto intercelular lleva aparejada una disminución en la utilización de lactato en astrocitos. El restablecimiento del contacto entre astrocitos consigue una recuperación de la capacidad de utilizar el lactato como fuente de energía aunque, no totalmente, como fuente de esqueletos carbonados.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el F.I.S.S.S. y la C.I.C.Y.T. L.I.S.-A. es becario de la Universidad de Salamanca. A. T. disfruta de una Acción de Reincorporación del M.E.C., España. Agradecemos a Dña. T. del REY y a D. J. Villoria su asistencia técnica.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) WILLIAMS, B. P., ABNEY, E. R., RAFF, M. C.: "Macroglial cell development in embryonic rat brain: studies using monoclonal antibodies, fluorescence activated cell sorting, and cell culture". *Develop Biol* (1985), **112**: 126-134.
- (2) MUGNAINI, E.: "Cell junctions of astrocytes, ependyma and related cells in the mammalian central nervous system, with emphasis on the hypothesis of a generalized functional syncytium of supporting cells" In: *Astrocytes* (1986), Vol. 1, pp. 329-371, Eds. Fedoroff, S., Vernadakis, A., Academic Press, Inc., New York.
- (3) BINMOLLER, F. J., MULLER, C. M.: "Postnatal-development of dye-coupling among astrocytes in rat visual-cortex". *Glia* (1992), **6**: 127-137.
- (4) MEDINA, J. M., VICARIO, C., JUANES, M., FERNÁNDEZ, E.: "Biochemical adaptations to early extrauterine life". In: *Perinatal Biochemistry* (1992), pp. 233-258, Eds. Herrera, E., Knopp, R., CRC Press, Boca Raton, FL.
- (5) VICARIO, C., TABERNERO, A., MEDINA, J. M.: "Regulation of lactate metabolism by albumin in rat neurons and astrocytes from primary culture". *Pediatr Res* (1993), **34**: 709-715.