

# Efecto del ácido oleico sobre la comunicación intercelular en astrocitos de rata durante el desarrollo

Effect of oleic acid on gap junction communication in rat astrocytes during development

LAVADO, E.; SÁNCHEZ-ABARCA, L. I.; TABERNERO, A.; BOLAÑOS, J. P. y MEDINA, J. M.  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Farmacia. Universidad de Salamanca. Edificio Departamental. Avda. del Campo Charro. 37007 Salamanca. España.

## RESUMEN

El papel del ácido oleico en la permeabilidad de las uniones intercelulares fue estudiado en astrocitos de rata en cultivo primario. La incubación con ácido oleico causó una inhibición de forma dosis-dependiente, alcanzando un máximo del 79.5% a 50  $\mu\text{M}$ . La inhibición de la permeabilidad de las uniones comunicantes por el ácido oleico fue reversible y fue prevenida por la albúmina. La potencia de compuestos relacionados con el ácido oleico en inhibir la permeabilidad de las uniones comunicantes fue: ácido araquidónico > ácido oleico > alcohol oleico > ácido palmitoleico > ácido esteárico > octanol > ácido caprílico > ácido palmítico > metil-oleil éster. El ácido oleico y el ácido araquidónico, pero no el oleil-metil éster, aumentaron la captación de glucosa por los astrocitos. Nuestros resultados sugieren que la inhibición de la permeabilidad de las uniones comunicantes está asociada con el incremento de la captación de glucosa. Por tanto, nuestros resultados sugieren que en el período perinatal, el ácido oleico puede ser un mediador fisiológico para la diferenciación de los astrocitos por su capacidad de modular la permeabilidad a través de las uniones comunicantes.

**Palabras Clave:** Amarillo de Lucifer. Astrocitos. Captación de glucosa. Células de la glía. Comunicación intercelular.

## ABSTRACT

The role of oleic acid in the modulation of gap junction permeability was studied in cultured rat astrocytes by the scrape-loading/Lucifer yellow transfer technique. Incubation with oleic acid caused a dose-dependent inhibition of gap junction permeability by 79.5% at 50  $\mu\text{M}$  and no further inhibition was observed by increasing the oleic acid concentration up to 100  $\mu\text{M}$ . The oleic acid-mediated inhibition of gap junction permeability was reversible and was prevented by bovine serum albumin (BSA). The potency of oleic acid-related compounds in inhibiting gap junction permeability was arachidonic acid > oleic acid > oleyl alcohol > palmitoleic acid > stearic acid > octanol > caprylic acid > palmitic acid > methyl-oleyl ester. Oleic acid and arachidonic acid, but not methyl-oleyl ester, increased glucose uptake by astrocytes. Our results support the

hypothesis that the inhibition of gap junction permeability is associated with the increase in glucose uptake. We suggest that during the perinatal period, oleic acid may be a physiological mediator in astrocyte differentiation by regulating intercellular communication.

**Key Words:** Astrocytes. Intercellular communication. Lucifer yellow. Glial cells. Glucose uptake.

Recibido: 12-12-96

Aceptado: 20-12-96

BIBLID [0004-2927(1996) 37:4; 739-751]

## INTRODUCCIÓN

El desarrollo de los astrocitos se produce durante el período perinatal. Una de las características de estas células es que están acopladas a través de canales intermembrana conocidos como uniones comunicantes (1, 2). Sin embargo, ésta comunicación no es operativa hasta el comienzo de la diferenciación (3). Estos canales intercelulares permiten el paso de iones y moléculas pequeñas, tales como segundos mensajeros (4) o metabolitos energéticos (5) entre las células (6, 7). Numerosos factores fisiológicos han sido descritos como reguladores de la permeabilidad de las uniones comunicantes en astrocitos, por ejemplo, la endotelina (8), la noradrenalina o el ácido araquidónico (9). Aunque el mecanismo final de la inhibición de las uniones comunicantes no es conocido, podría estar mediado por el ácido araquidónico (8, 9). Durante el período perinatal el recién nacido sufre una hipoxia transitoria que aumenta los niveles de ácido araquidónico en el cerebro por activación de la PLA2. Así, la privación de oxígeno, activa esta enzima que produce como consecuencia la liberación de ácido araquidónico (10) y probablemente también ácido oleico. El ácido araquidónico y el ácido oleico son ácidos grasos cis-insaturados cuyo interés en la transmisión de señales intracelulares ha aumentado debido a su implicación en la proliferación celular (11, 12). Una de las características del ácido oleico y araquidónico es su capacidad para activar la proteína kinasa C (13). Esta activación inhibe la permeabilidad de las uniones comunicantes en astrocitos (14). Además, la proliferación celular está relacionada con la inhibición de la permeabilidad de las uniones comunicantes (15) y en algunos casos está mediada por la proteína kinasa C (16-18). Por tanto, nos propusimos investigar el efecto del ácido oleico en la permeabilidad de las uniones comunicantes en astrocitos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### *Productos*

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), penicilina, estreptomicina, poli-L-lisina, DNasa, albúmina y los colorantes fluorescentes amarillo de lucifer y dextrano de rodamina 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). La 2-Deoxy-D-[U-<sup>14</sup>C]glucosa fue suministrada por ARC (American Radiolabeled Chemicals Inc., St. Louis, Mo., U.S.A.). Otros productos utilizados en la preparación de disoluciones procedieron de las casas Sigma Chemical Co (St. Louis, Mo., U.S.A) y Merck (Darmstadt, Alemania).

### *Animales*

Se emplearon ratas albinas Wistar, alimentadas ad libitum con una dieta estándar sólida (49.8% carbohidratos, 23.5% proteínas, 3.7% lípidos, 5.5% minerales, vitaminas y aminoácidos). Las ratas se mantuvieron en un ritmo de luz-oscuridad de 12 horas.

### *Cultivos Celulares*

Para la realización del cultivo primario de astrocitos, se emplearon cerebros de rata de 1 día de vida postnatal siguiendo el método descrito por Vicario y col. (19). Las células del glioma C6 se sembraron en placas y se crecieron en idéntico medio de cultivo hasta alcanzar la confluencia (3 días aproximadamente).

### *Comunicación intercelular*

La permeabilidad a través de las uniones comunicantes fue determinada por la técnica del "scrape-loading/dye transfer" descrita por El-Fouly y col. (20). Tras lavar las células se añadió sobre la monocapa de astrocitos una solución del colorante fluorescente amarillo de lucifer (1 mg/ml) y, con ayuda de un bisturí se realizó un corte sobre la monocapa de astrocitos en el centro de la placa. El amarillo de lucifer es un colorante altamente fluorescente que pasa a las células adyacentes a través de las uniones comunicantes y no puede atravesar la membrana plasmática. En algunos experimentos se utilizó una

mezcla de amarillo de lucifer (1 mg/ml) y dextrano de rodamina (1 mg/ml, peso molecular 10 KDa). Después de 2 min, la solución colorante fue retirada y las células fueron lavadas. Ocho min después del corte, fueron tomadas fotomicrografías (Kodak Tmax 400 ASA) utilizando un microscopio invertido de fluorescencia con los filtros adecuados (Diaphot, Nikon). La intensidad del área de fluorescencia fue cuantificada mediante el análisis de las imágenes por ordenador, utilizando un programa adecuado (NIH Image, Wayne Rasband, National Institutes of Health, U.S.A.) (21). La fluorescencia basal se obtuvo cuantificando la intensidad de fluorescencia en placas sin colorante y su valor fue sustraído del resto de las condiciones. La permeabilidad se expresó como porcentaje de área fluorescente respecto al control llevado a cabo en el mismo experimento. Los datos son medias de tres preparaciones de astrocitos.

### *Tratamientos celulares*

Los compuestos probados fueron el octanol (50-200  $\mu\text{M}$ ), el ácido caprílico (50-200  $\mu\text{M}$ ), el ácido palmitoleico (25-150  $\mu\text{M}$ ), el ácido palmítico (25-150  $\mu\text{M}$ ), el ácido oleico (10-100  $\mu\text{M}$ ), el ácido esteárico (50-200  $\mu\text{M}$ ), el oleil alcohol (25-100  $\mu\text{M}$ ), metil- oleil éster (50-200  $\mu\text{M}$ ), oleil-Coa (50-200  $\mu\text{M}$ ) y el ácido araquidónico (25-100  $\mu\text{M}$ ). Estos compuestos fueron disueltos en DMSO, excepto el ácido esteárico y el ácido araquidónico que fueron disueltos en etanol. El efecto de estos compuestos en la permeabilidad de las uniones intercelulares fue probado añadiendo a las soluciones iónicas la concentración deseada.

Para probar la reversibilidad tiempo dependiente de la inhibición de la permeabilidad de las uniones comunicantes causada por el ácido oleico se incubaron varias placas con ácido oleico (50  $\mu\text{M}$ ) en la solución iónica durante 10 min. Después se lavaron las células con un exceso de solución iónica y se incubaron en DMEM a 37 °C en una atmósfera de un 95% de aire y un 5% de  $\text{CO}_2$ . A diferentes tiempos, se utilizaron placas para la determinación de la permeabilidad tal y como se describió anteriormente. En otra serie de experimentos las células fueron incubadas con ácido oleico (50  $\mu\text{M}$ ) tal y como se describió anteriormente, pero las soluciones iónicas contenían albúmina en concentraciones crecientes; después se determinó la permeabilidad.

### *Captación de glucosa*

La captación de 2-Deoxiglucosa se determinó en astrocitos, en células C6 y en astrocitos disociados como se describe por Yu y col (22). Las células se

incubaron durante 1h en DMEM que contenía 2-deoxi-[U-<sup>14</sup>C]glucosa (0.15  $\mu$ Ci/ml; 60 d.p.m/nmol de glucosa) y los compuestos a ensayar.

### *Determinaciones Analíticas*

La concentración de proteínas fue determinada por el método de Lowry y col. (23), utilizando albúmina como estándar. Los tratamientos estadísticos se hicieron mediante el test de significación de la t de Student. En todos los casos,  $p < 0.05$  fue considerada significativa.

## RESULTADOS

### *Efecto del Ácido Oleico y otros Compuestos Relacionados sobre la Permeabilidad de las Uniones comunicantes en Astrocitos de Rata en Cultivo Primario.*

Los astrocitos están ampliamente acoplados a través de las uniones comunicantes como puede demostrarse mediante la técnica de difusión del amarillo de lucifer (Fig. 1a). Sin embargo, cuando se utiliza dextrano de rodamina, cuyo peso molecular impide la difusión a través de estos canales, el área de fluorescencia quedó restringida a las células próximas al corte, por tanto cargadas con el colorante (Fig. 1b). El tratamiento de los astrocitos con ácido oleico (30  $\mu$ M) redujo el área de fluorescencia (Fig. 1c) quedando el amarillo de lucifer confinado en las células próximas al corte.

Con objeto de investigar el mecanismo de acción del ácido oleico sobre la reducción de la permeabilidad de las uniones comunicantes, se estudió la posible relación estructura-actividad. Como se muestra en la Fig. 2, el área fluorescente se redujo de forma dosis dependiente en presencia de octanol, ácido caprílico, ácido palmitoleico, ácido palmítico, ácido oleico, ácido esteárico, alcohol oleico y ácido araquidónico. Sin embargo, el oleil-CoA y el metil-oleil éster no tuvieron efecto sobre la transferencia del amarillo de lucifer. Con los compuestos ensayados se obtuvieron curvas dosis respuestas que se ajustaron a una ecuación de segundo orden usando el programa de ordenador adecuado. A partir de esta ecuación, fue calculada la concentración de compuesto que produjo el 50% de inhibición de la transferencia de amarillo de lucifer ("K<sub>i</sub> aparente"). De acuerdo con estos valores, establecimos un orden de potencia inhibitoria sobre la transferencia del amarillo de lucifer para todos los compuestos ensayados, esta es ácido araquidónico > ácido oleico > alcohol oleico > ácido palmitoleico > ácido esteárico > octanol > ácido caprílico > ácido palmítico > metil-oleil éster (Fig. 3).

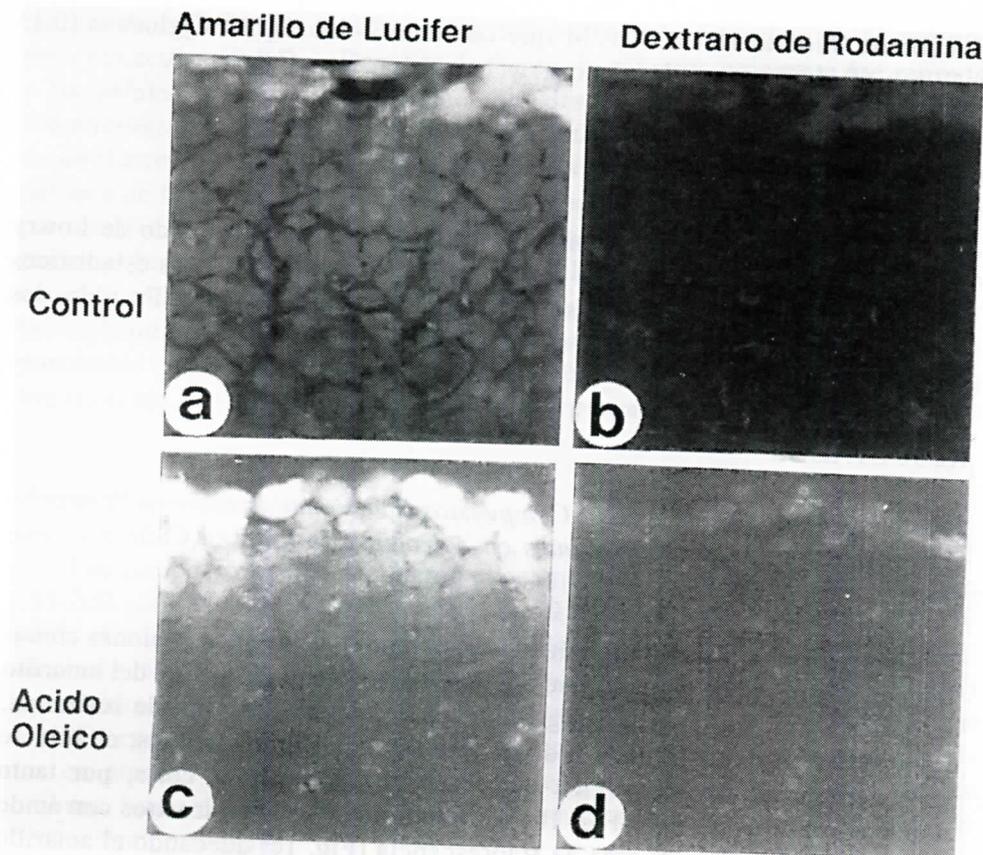


Fig. 1.—Fotomicrografía de fluorescencia de cultivo de astrocitos de rata tras la técnica “Scrape-loading/Lucifer yellow transfer” con una mezcla de amarillo de Lucifer y dextrano de rodamina. Los astrocitos se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente ( $\approx 22^\circ\text{C}$ ), en solución iónica, en ausencia (a, b) o en presencia (c, d) de ácido oleico ( $30\ \mu\text{M}$ ). La técnica “Scrape-loading” fue llevada a cabo según se describe en Materiales y Métodos. Las micrografías fueron tomadas del mismo área utilizando filtros adecuados para visualizar el amarillo de Lucifer (a, b) o dextrano de rodamina (b, d).

*Reversibilidad Tiempo-Dependiente de la Inhibición de la Permeabilidad de las Uniones comunicantes por el Ácido oleico en Astrocitos de Rata en Cultivo Primario.*

Con objeto de investigar si la inhibición de la transferencia del amarillo de lucifer causada por el ácido oleico era reversible o no, los astrocitos tratados con ácido oleico durante 10 min, fueron lavados e incubados en DMEM a  $37^\circ\text{C}$ . A distintos tiempos se determinó la permeabilidad de las uniones comunicantes al amarillo de lucifer (Fig. 4). 30 min después del

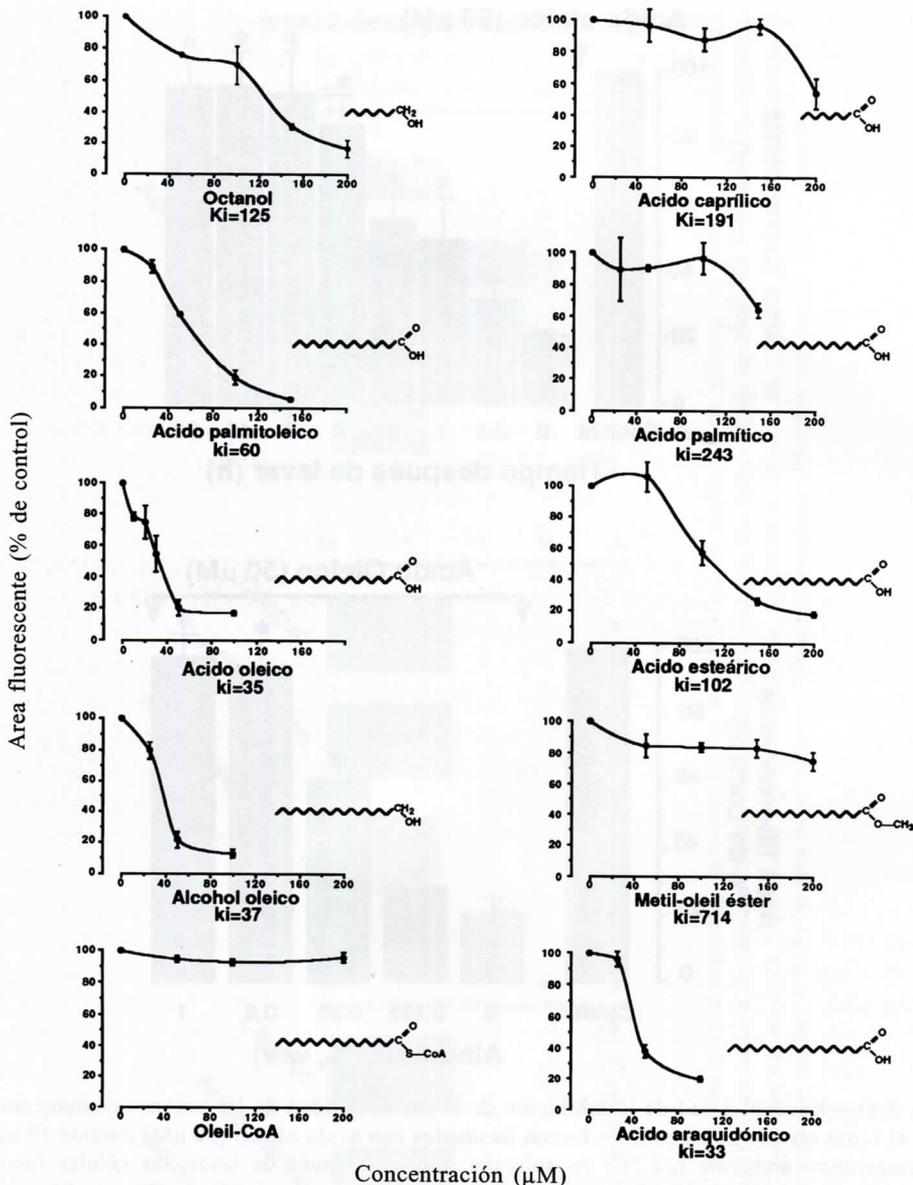


Fig. 2.—Efecto del ácido oleico y compuestos relacionados estructuralmente sobre la permeabilidad de las uniones comunicantes en cultivos de astrocitos. Los astrocitos fueron incubados utilizando concentraciones crecientes de los compuestos. Indicados en soluciones iónicas. La permeabilidad de las uniones comunicantes (expresadas como porcentaje de área fluorescente) fue determinada por la técnica “scrape-loading/Lucifer yellow transfer” como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados fueron expresados como un porcentaje del control y son medias  $\pm$  SEM de tres experimentos. Se muestra la estructura y la constante de inhibición aparente de cada compuesto.

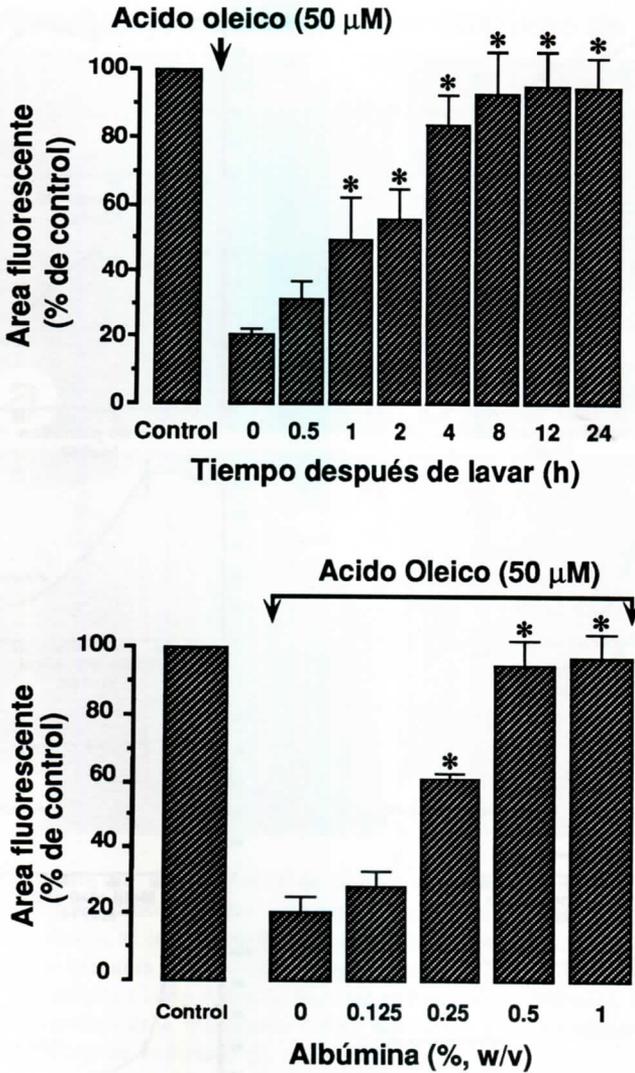


Fig. 3.a).—Reversibilidad de la inhibición de la permeabilidad de las uniones comunicantes por el ácido oleico. Los astrocitos fueron incubados con ácido oleico (50  $\mu$ M) durante 10 min a temperatura ambiente (22 °C) en solución iónica. Después de lavar, las células fueron incubadas en DMEM a 37 °C en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub>. A diferentes tiempos, algunas placas fueron utilizadas para determinar la permeabilidad de las uniones intercelulares. b) Prevención de la inhibición de la permeabilidad de las uniones comunicantes causada por el ácido oleico por la albúmina. Los astrocitos fueron incubados con ácido oleico (50  $\mu$ M) en presencia de concentraciones crecientes de albúmina durante 10 min a temperatura ambiente (22 °C). La permeabilidad de las uniones comunicantes está expresada como porcentaje de área de fluorescencia tal y como se describe en Material y Métodos. Los resultados están expresados como porcentajes del control y son medias  $\pm$  SEM de tres experimentos. \*Significativamente diferente respecto a las 0 h o 0% de albúmina.

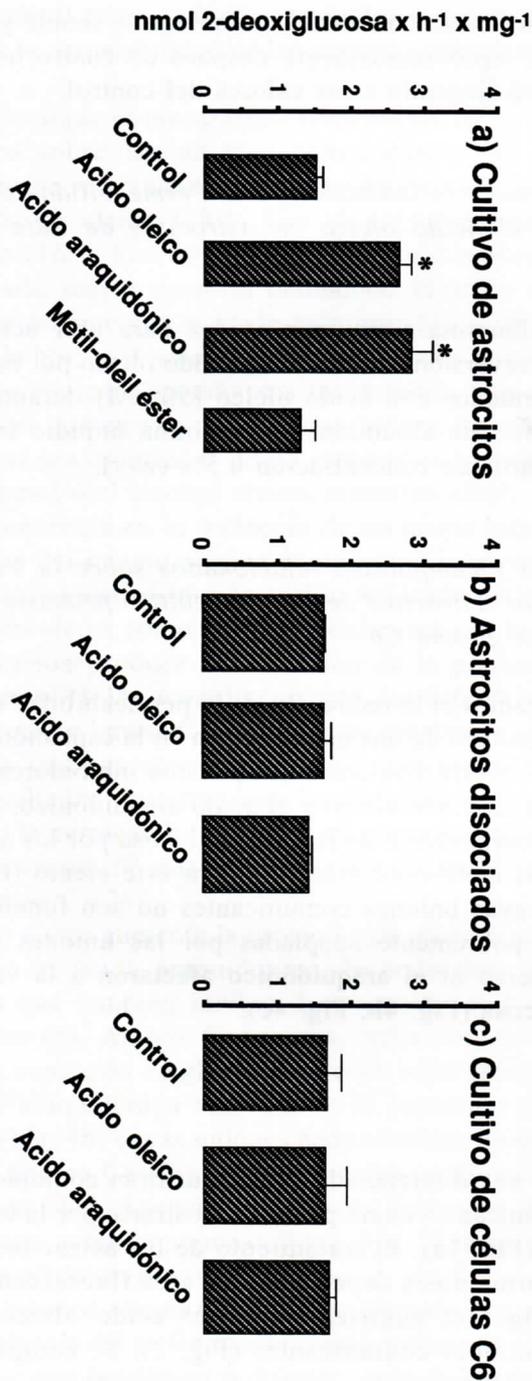


Fig. 4.—Efecto del ácido oleico y compuestos relacionados en la velocidad de captación de glucosa en cultivo de astrocitos (a), astrocitos disociados (b) o en cultivo de células C6 (c). La captación de glucosa fue determinada midiendo la velocidad de captación de la 2-deoxi-[U-<sup>14</sup>C]glucosa en ausencia o presencia de los compuestos indicados a 50  $\mu$ M, tal y como se describe en Material y Métodos. Los resultados son medias  $\pm$  SEM de tres experimentos. \*Significativamente diferente comparado con el control.

tratamiento, el área fluorescente comenzó a restablecerse siendo ya significativa al cabo de 1 hora. Aproximadamente después de cuatro horas la permeabilidad se restableció llegando a los valores del control.

### *Efecto de la Albúmina sobre la Inhibición de la Permeabilidad de las Uniones comunicantes por el Ácido oleico en Astrocitos de Rata en Cultivo Primario*

Debido a que la albúmina tiene gran avidez para unir ácidos grasos, investigamos la posible reversión del efecto del ácido oleico por esta proteína. Los astrocitos fueron tratados con ácido oleico (50  $\mu\text{M}$ ) durante 10 min y concentraciones crecientes de albúmina. La albúmina impidió la inhibición por el ácido oleico a partir de concentración 0.5% (w/v).

### *Efecto del Ácido oleico y compuestos relacionados sobre la Velocidad de captación de glucosa por Astrocitos de Rata en cultivo primario, Astrocitos disociados y Células del glioma C6*

Finalmente investigamos si la reducción de la permeabilidad causada por el ácido oleico se acompañaba de una estimulación en la captación de glucosa por los astrocitos como ocurre con otros compuestos inhibidores (5). Como se muestra en la Fig. 4a, el ácido oleico y el ácido araquidónico, aumentaron significativamente la incorporación de la 2-deosiglucosa por los astrocitos en cultivo. Sin embargo, el metil-oleil éster, no tuvo este efecto (Fig. 4a). En astrocitos disociados, cuyas uniones comunicantes no son funcionales o en células C6, que están pobremente acopladas por las uniones comunicantes (24), ni el ácido oleico ni el araquidónico afectaron a la velocidad de captación de 2-dexiglucosa (Fig. 4b, Fig. 4c).

## DISCUSIÓN

Los astrocitos, una vez diferenciados, se encuentran comunicados a través de las uniones comunicantes como puede demostrarse por la transferencia del amarillo de lucifer (Fig. 1a). El tratamiento de los astrocitos con ácido oleico disminuyó de forma dosis dependiente el área fluorescente ocupada por este colorante (Fig. 1c) sugiriendo que el ácido oleico reduce la permeabilidad de las uniones comunicantes (Fig. 2). Se comprobó que el ácido oleico unido a la albúmina fue inactivo, sugiriendo que sólo el ácido oleico libre produce inhibición de la permeabilidad. Además, la inhibición fue

reversible con el tiempo. Estos resultados sugieren que el efecto del ácido oleico sobre la permeabilidad de las uniones comunicantes es fisiológicamente relevante.

Para investigar el mecanismo responsable de la inhibición que causa el ácido oleico sobre las uniones comunicantes, se ensayaron compuestos estructuralmente relacionados con el ácido oleico. Como se muestra en la Fig. 2 y 3, el ácido oleico (18:1;  $k_i \approx 35 \mu\text{M}$ ) fue más potente que el ácido palmitoleico (16:1;  $k_i \approx 60$ ), sugiriendo que a mayor longitud de la cadena hidrocarbonada, mayor potencia inhibidora. El ácido esteárico (18:0;  $k_i \approx 102 \mu\text{M}$ ) fue más potente que el ácido palmítico (16:0;  $k_i \approx 243 \mu\text{M}$ ) (Fig. 2 y 3). Esto apoya la hipótesis anterior y dado que estos dos ácidos grasos son menos potentes que sus correspondientes insaturados, sugiere que la presencia de dobles enlaces aumenta la potencia inhibidora. En cuanto al grupo funcional, no parece que sea esencial el grupo carbonílico ya que derivados alcohólicos, como el octanol o el alcohol oleico, muestran efecto inhibidor. Sin embargo sí lo es la presencia en la molécula de un grupo hidroxílico libre, ya que la esterificación del mismo origina compuestos inactivos.

En cuanto al mecanismo de acción del ácido oleico, ha sido sugerido que tanto el ácido oleico como el araquidónico activan la proteína kinasa C, (25) y esta activación produce la inhibición de la permeabilidad de las uniones comunicantes (14). De acuerdo con esto, los ésteres oleicos son incapaces de activar la proteína kinasa C, los cuales no mostraron efecto sobre la permeabilidad de las uniones comunicantes en nuestros experimentos. Finalmente, nuestros resultados muestran que la albúmina previene el efecto del ácido oleico sobre la permeabilidad de las uniones comunicantes, lo cual concuerda con la observación de que sólo el ácido oleico libre es capaz de activar la proteína kinasa C (26).

El ácido oleico aumentó la captación de glucosa por los astrocitos (Fig. 4), al igual que el ácido araquidónico, la endotelina y otros compuestos no fisiológicos que también inhiben la permeabilidad a través de las uniones comunicantes (5). Ambos fenómenos, reducción de la permeabilidad y aumento en la captación de glucosa, parecen estar asociados, ya que ni el ácido oleico ni el araquidónico aumentaron la captación de glucosa en astrocitos disociados (Fig. 4b) cuyas uniones comunicantes no son funcionales, ni en las células del glioma C6 (Fig. 4c), las cuales están poco acopladas a través de estas uniones (24). Además, los ésteres derivados del ácido oleico que no tuvieron efecto sobre la permeabilidad (Fig. 2) tampoco aumentaron la incorporación de glucosa (Fig. 4).

Así, sugerimos que el ácido oleico liberado por acción de la PLA2 en el período de hipoxia del recién nacido, como ocurre con el ácido araquidónico (10), podría ejercer una función en la diferenciación de los astrocitos como modulador de la permeabilidad de las uniones comunicantes. Además, el ácido oleico

aumenta el nivel de proliferación celular (11, 12) mientras que la comunicación celular a través de las uniones comunicantes está implicada en el control de procesos proliferativos (27). El aumento de la captación de glucosa es un factor crítico para la proliferación celular ya que es esencial para proveer las ribosas fosfato necesarias para la síntesis de ácidos nucleicos. De hecho, una molécula de ribosa fosfato es necesaria para cada base de ácido nucleico sintetizada y todo el genoma se duplica en cada división celular. Esto concuerda con nuestros resultados que muestran que la inhibición de la permeabilidad de las uniones comunicantes produce un incremento en la captación de glucosa por los astrocitos y su metabolismo a través del ciclo de las pentosas fosfato (Fig. 4;(5)). Sin embargo, aún se desconoce el mecanismo que asocia la inhibición de la permeabilidad a través de las uniones comunicantes con la proliferación.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el F.I.S.S.S. y la Junta de Castilla y León, España; E.L. y L.I.S. son becarios de la Universidad de Salamanca y del M.E.C., respectivamente. A.T. disfruta de una Acción de Reincorporación del M.E.C. Agradecemos al Dr. E. Fernández sus útiles discusiones, a Dña. T. del Rey y a D. J. Villoria su asistencia técnica.

## BIBLIOGRAFÍA

- (1) MUGNAINI, E. In: *In Astrocytes* (1986). FEDOROFF, S., VERNADAKIS, A. (Ed), Vol. 1, pp. 329-371, Academic Press, Inc., New York.
- (2) YAMAMOTO, T., OCHALSKI, A., HERTZBERG, E. L., NAGY, J. I.: *J Comp Neurol* (1990), **302**: 853-883.
- (3) BINMOLLER, F. J., MULLER, C. M.: *Glia* (1992), **6**: 127-137.
- (4) SAEZ, J. C., CONNOR, J. A., SPRAY, D. C., BENNETT, M. V. L.: *Proc Natl Acad Sci USA* (1989), **86**: 2708-2712.
- (5) TABERNERO, A., GIAUME, C., MEDINA, J. M.: *Glia* (1996), **16**: 187-195.
- (6) LOEWENSTEIN, W. R.: *Cell* (1987), **48**: 725-726.
- (7) KUMAR, N. M., GIGULA, N. B.: *Cell* (1996), **84**: 381-388.
- (8) GIAUME, C., CORDIER, J., GLOWINSKI, J.: *Eur J Neurosci* (1992), **4**: 877-881.
- (9) GIAUME, C., MARIN, P., CORDIER, J., GLOWINSKI, J., PREMONT, J.: *Proc Acad Sci USA* (1991), **88**: 5577-5581.
- (10) YAVIN, E., KUNIEVSKY, B., BAZAN, N. G., HAREL, S.: *Adv Exp Med Biol* (1992), **318**: 315-323.
- (11) CHAJES, V., SATTTLER, W., STRANZL, A., KOSTNER, G. M.: *Breast Cancer Res Treat* (1995), **34**: 199-212.
- (12) FISHER, W. E., BOROS, L. G., SCHIRMER, W. J.: *Surgery* (1995), **118**: 453-458.
- (13) KHAN, W. A., BLOBE, G. C., HANNUN, Y. A.: *Cell Signalling* (1995), **7**: 171-184.