

Resonancia Magnética Nuclear para el estudio del metabolismo

Metabolismo de la glucosa en el cerebro

Ramón Tamarit Agustí

Enero 2010

1 Propuesta de tema.

1.1 Motivación

Poco o nada sabemos sobre las implicaciones metabólicas de multitud de enfermedades del Sistema Nervioso y en concreto del cerebro. Como afirman algunos autores, el cerebro es un órgano “plástico”, que responde a estímulos que le envían otros órganos (sensoriales o no), procesa la información por “*aprendizaje*”, y emite una respuesta. El mantenimiento de toda esta maquinaria metabólica requiere de un consumo de energía química superior al de otros órganos. La glucosa es el sustrato en el que se basan indirectamente todas las reacciones metabólicas que precisan energía en el cerebro. Se ha comprobado que existe una correlación entre los niveles de actividad funcional y los niveles de captación de glucosa y de fosforilación en el sistema nervioso, así como de todos y cada uno de los metabolitos que resultan de la degradación oxidativa del mismo.

La “Resonancia Magnética Nuclear” RMN es una de las técnicas experimentales en biomedicina que mayor desarrollo ha cobrado en los últimos años, debido principalmente a que es una técnica no invasiva que ofrece información detallada de los sustratos y metabolitos in vivo. En particular, es posible seguir tanto la cinética como la compartimentalización de las reacciones mediante la transfusión de los sustratos marcados con ^{13}C .

La serie de artículos elegidos para la discusión versan sobre la utilidad de la RMN para:

- detectar el “consumo” de glucosa y metabolitos relacionados,
- determinar la cinética y regulación de las distintas reacciones implicadas,
- modelizar los “espacios” o “compartimentos” en los que ocurren las reacciones,

Otros parámetros, como la influencia de la señalización por receptores, el transporte intra-celular de intermedios, o la regulación génica de los enzimas, no son directamente detectables por la RMN. Sin embargo, si que es posible evaluarlos con la ayuda de otras técnicas experimentales y de modelos computacionales. Como se puede comprobar en los artículos, los autores siempre intentan en mayor o menos medida, incluir estos parámetros en el razonamiento final.

1.2 Selección de artículos

La bibliografía existente sobre el tema es amplia, lo que lleva a la confusión. Se pueden encontrar innumerables reviews sobre el tema, cada uno con una orientación diferente. Me centraré casi exclusivamente en tres:

[Metabolic and hemodynamic events after changes in neuronal activity: current hypotheses, theoretical predictions and in vivo NMR experimental findings.](#)

Mangia S, Giove F, Tkáč I, Logothetis NK, Henry PG, Olman CA, Maraviglia B, Di Salle F, Uğurbil K. J Cereb Blood Flow Metab. 2009 Mar;29(3):441-63. Epub 2008 Nov 12. Review. PMID: 19002199 [PubMed - indexed for MEDLINE] [Related articles](#) [Free article](#)

[Cerebral glucose metabolism and the glutamine cycle as detected by in vivo and in vitro ¹³C NMR spectroscopy.](#)
García-Espinosa MA, Rodrigues TB, Sierra A, Benito M, Fonseca C, Gray HL, Bartnik BL, García-Martín ML, Ballesteros P, Cerdán S.
Neurochem Int. 2004 Jul-Aug;45(2-3):297-303. Review.PMID: 15145545 [PubMed - indexed for MEDLINE][Related articles](#)

[Cellular mechanisms of brain energy metabolism and their relevance to functional brain imaging.](#)
Magistretti PJ, Pellerin L.
Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 1999 Jul 29;354(1387):1155-63. Review.PMID: 10466143 [PubMed - indexed for MEDLINE][Related articles](#) [Free article](#)

El review de Manglia es el último publicado, y explica de forma escueta y clara todos los procesos de transporte y compartimentalización. El artículo-review de Garcia-Espinosa me parece muy interesante, aparte de por ser españoles, por la claridad con la que se exponen las dificultades experimentales. Por último, el review de Magistretti es todo un clásico, los fundamentos metabólicos están perfectamente descritos.

Igualmente he seleccionado dos artículos experimentales publicados en 2009 que versan sobre aspectos inexplorados (y nombrados) en los reviews anteriores.

[The human brain utilizes lactate via the tricarboxylic acid cycle: a ¹³C-labelled microdialysis and high-resolution nuclear magnetic resonance study.](#)
Gallagher CN, Carpenter KL, Grice P, Howe DJ, Mason A, Timofeev I, Menon DK, Kirkpatrick PJ, Pickard JD, Sutherland GR, Hutchinson PJ.
Brain. 2009 Oct;132(Pt 10):2839-49. Epub 2009 Aug 20.PMID: 19700417 [PubMed - in process][Related articles](#)

[Simultaneous measurement of neuronal and glial metabolism in rat brain in vivo using co-infusion of \[^{1,6-¹³C₂\]}glucose and \[^{1,2-¹³C₂\]}acetate.](#)
Deelchand DK, Nelson C, Shestov AA, Uğurbil K, Henry PG.
J Magn Reson. 2009 Feb;196(2):157-63. Epub 2008 Nov 7.PMID: 19027334 [PubMed - indexed for MEDLINE][Related articles](#) [Free article](#)

Dado lo disperso y amplio del tema, mantendré una recopilación en PubMed ([WebCite 2](#)) que puedan aportar datos o conceptos no aclarados en los anteriores artículos.

1.3 Citas Electrónicas

WebCite 1

Resonancia magnética nuclear. (2009, 15) de diciembre. *Wikipedia, La enciclopedia libre*. Fecha de consulta: 21:29, diciembre 20, 2009 from http://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Resonancia_magn%C3%A9tica_nuclear&oldid=32232811

WebCite 2

Bibliografía actualizada en PubMed

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/myncbi/collections/public/1rKC76Zl6pD3Uu8GfUjP5kJQw/>

2 Desarrollo del trabajo

2.1 Objeto y alcance del trabajo.

Tanto los fundamentos como los detalles del metabolismo de la glucosa están perfectamente explicados en los tres reviews mencionados. No obstante, hay diversos reviews posteriores que recogen los resultados actualizados a 2009, si fuera necesario incluiré las citas necesarias. En el presente trabajo, tras una breve introducción al tema, discutiré únicamente las conclusiones y metodología de los dos artículos experimentales mencionados anteriormente.

2.2 El cerebro y su metabolismo.

El cráneo es la estructura ósea que contiene al cerebro. El cerebro contiene principalmente: tejido cerebral (86%), sangre (4%) y líquido cefalorraquídeo (10%). El tejido cerebral constituye el 2% del peso corporal, pero es el elemento con mayor volumen intracraneal (86%). Contiene 75% de agua y está formado por esencialmente neuronas y células glia.

Las neuronas en un humano sano son aproximadamente 10000 millones y tienen como función: regular toda la actividad sensorial, motora y neurovegetativa del organismo mediante la generación, canalización y transmisión de impulsos eléctricos.

Las células glia son células nodriza o “acompañantes” del sistema nervioso que desempeñan la función de soporte de las neuronas. Las glia intervienen activamente en el procesamiento cerebral de la información controlando el micro-ambiente celular. Regulando por ejemplo la composición iónica del ambiente, los niveles de neurotransmisores y el suministro de citoquinas y otros factores de crecimiento. La proporción de neuronas y de células gliales en el cerebro varía entre las diferentes especies (aprox. 10:1 en la mosca doméstica, 1:1 en el hombre)

2.2.1 Transmisión de la señal en las neuronas. El Potencial De Acción.

En estado de reposo los iones de K^+ difunden a través de la membrana plasmática desde el citoplasma hacia el líquido tisular, Resultado en una diferencia de potencial estable de alrededor de -80 mV (potencial de reposo)

Al transmitirse la señal eléctrica, aumenta permeabilidad de la membrana plasmática a los iones de Na^+ y difunden desde el líquido tisular hacia el citoplasma celular. Esto induce la despolarización progresivamente y se produce un aumento potencial de acción que es de aproximadamente +40 mv. El incremento de potencial es muy breve (5 nseg) ya que la permeabilidad de la membrana a los iones de Na^+ cesa y aumenta la permeabilidad de los iones K^+ .

Una vez generado el potencial de acción se propaga por la membrana plasmática, alejándose del sitio de iniciación y es conducido a lo largo de las neuritas como el impulso nervioso. Una vez que el impulso nervioso se ha difundido por una región de la membrana plasmática, no puede provocarse otro potencial en forma inmediata. La duración de este estado no excitable se denomina período refractario.

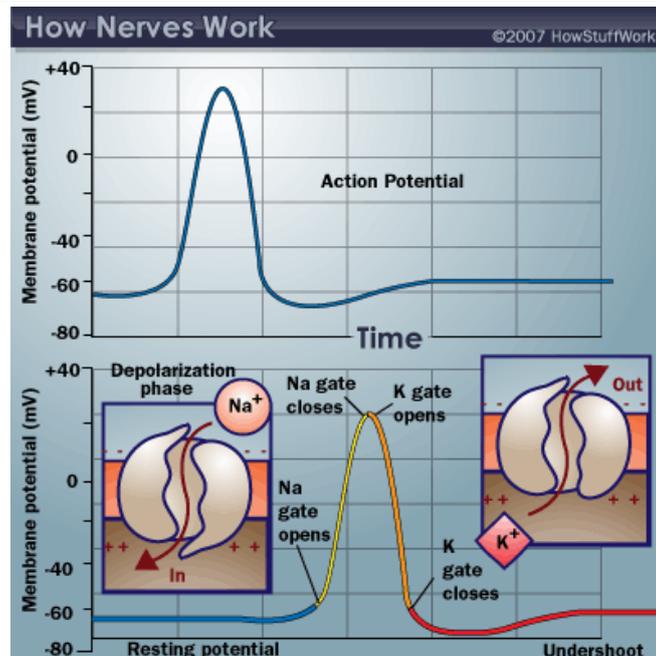


Figura 1.- El potencial de acción en las neuronas

2.2.2 La corteza cerebral

La corteza cerebral es un revestimiento del “hemisferio” cerebral. La corteza cerebral es una mezcla de células nerviosas, fibras nerviosas, neuroglia y vasos y capilares sanguíneos.

2.2.3 El Cerebro

El cerebro es un importante consumidor de energía. Utiliza una cuarta parte de la glucosa consumida por el organismo. El metabolismo cerebral para cumplir con la función reguladora de las neuronas requiere del aporte de sustratos energéticos: Glucógeno, Glucosa y Oxígeno.

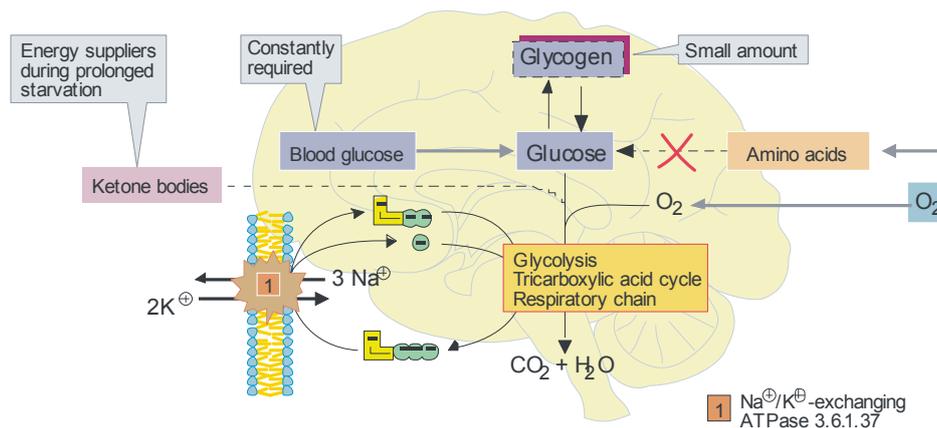


Figura 2. Sustratos energéticos del cerebro

Fundamentalmente, los requerimientos energéticos del SNC provienen, casi exclusivamente, de la glucogenolisis del glucógeno almacenado en el hígado y el músculo. Esta energía le permite regular las múltiples conexiones sinápticas, los canales iónicos regulados por voltaje y receptores, así como la síntesis, transporte, almacenamiento y liberación de diversas sustancias. Los requerimientos de energía del cerebro son importantes, sin embargo el pool de sustratos generadores de energía (glucógeno, glucosa, oxígeno) son pequeños. Por tanto el funcionamiento normal del cerebro depende del equilibrio entre el aporte y la demanda

de sustratos energéticos, así como de la adecuada eliminación de los productos de deshecho originados por su metabolismo.

La principal fuente de energía del cerebro es la hidrólisis de moléculas de ATP. A su vez, el mecanismo más importante para la producción de ATP es el metabolismo de la glucosa (Esquema 1).

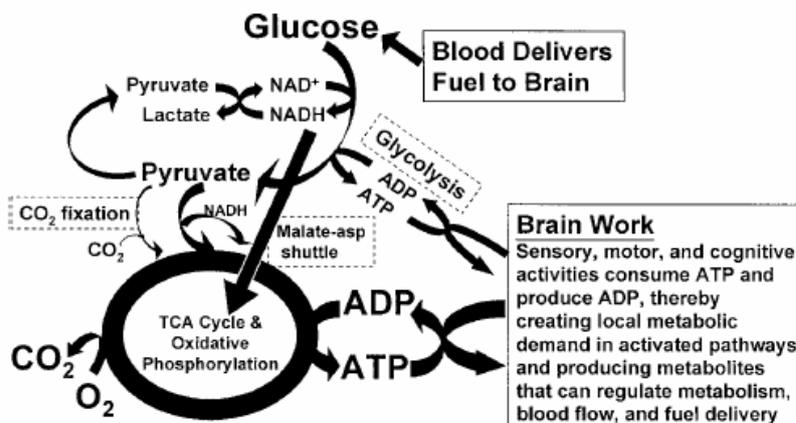


FIG. 1. ATP-ADP cycling links brain function and glucose metabolism. Functional tasks activate neuronal signaling and consumption of neuronal and glial ATP, thereby stimulating glucose utilization (CMR_{glc}) in specific brain structures. By-products of metabolism stimulate local blood flow to increase local delivery of glucose and oxygen. Cytoplasmic NADH is oxidized via lactate dehydrogenase and/or the malate-aspartate (asp) shuttle (see Fig. 4 and text), depending on conditions in the cell. Both the glycolytic pathway (glucose to pyruvate) and pyruvate oxidation in the tricarboxylic acid (TCA) cycle generate ATP for working brain. The glycolytic pathway can be rapidly activated, whereas the TCA cycle has the highest energy yield (see Fig. 2). (Adapted from G. A. Dienel. Energy generation in the central nervous system. In "Cerebral Blood Flow and Metabolism, 2nd ed." (L. Edvinsson and D. Krause, eds.), 2002, Lippincott Williams & Wilkins. ©)

Esquema 1.- Uso de ATP por el cerebro.

2.2.4 Metabolismo de la Glucosa

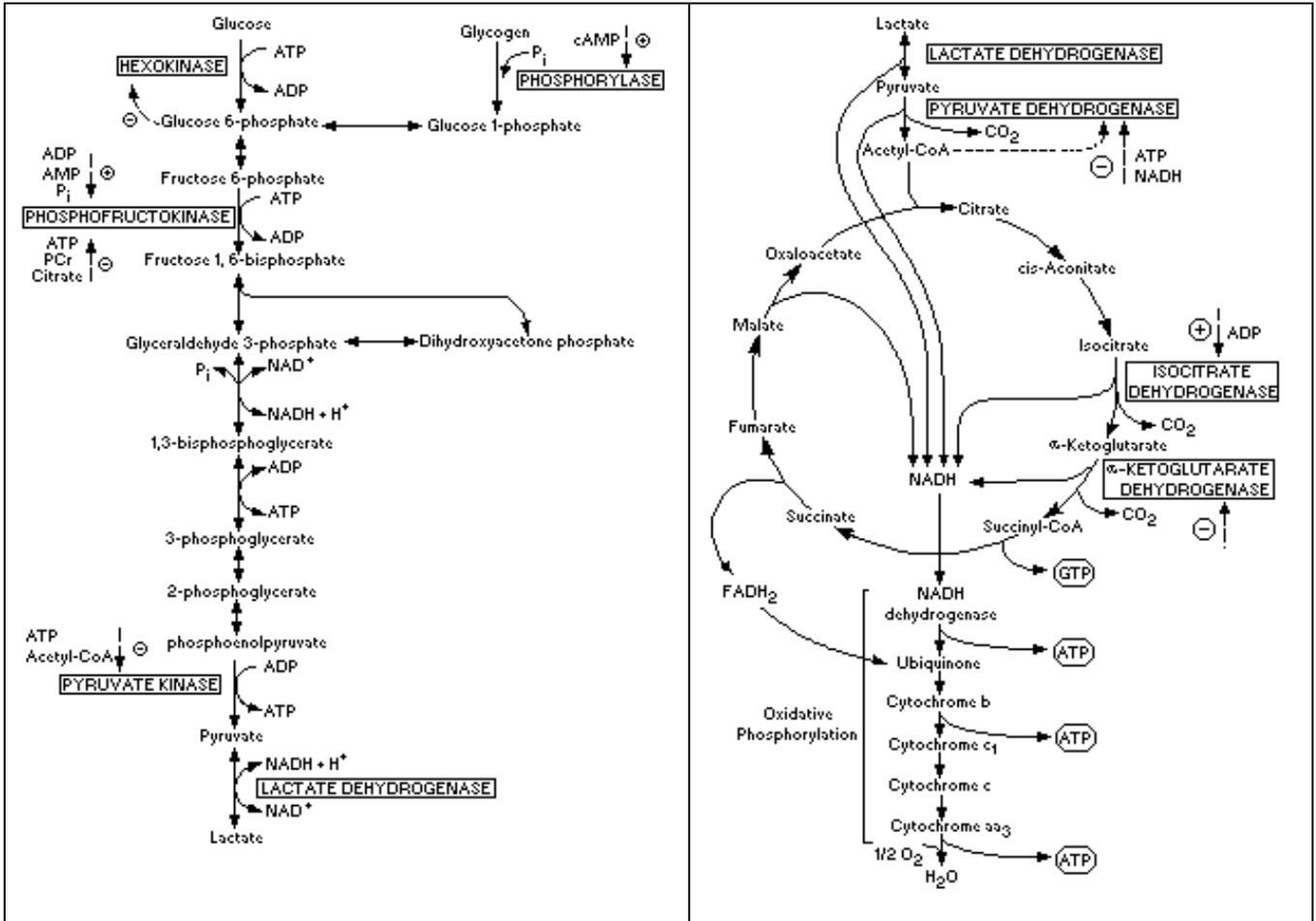
La glucosa es transportada por difusión facilitada desde la sangre hacia el SNC. El mecanismo de transporte es competitivo y saturable. En reposo, el cerebro extrae aproximadamente alrededor de 10% de la glucosa transportada por la sangre.

El metabolismo de la glucosa se realiza mediante dos mecanismos (Esquema 2):

- Anaeróbico (citoplasma), que lleva a la producción de ácido pirúvico y ácido láctico
- Aeróbico (mitocondrial) que caracteriza el metabolismo del ácido pirúvico a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos y de la cadena respiratoria.

La fase anaeróbica (ciclo de Embden-Meyerhof) produce poca energía, ya que sólo se obtienen 2 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa degradada. En cambio la oxidación subsiguiente del ácido pirúvico (ciclo de Krebs), produce 36 moléculas de ATP. De esta forma, el metabolismo aeróbico de la glucosa produce 18 veces más energía que el metabolismo anaeróbico.

El cerebro usa el 20% de la glucosa total metabolizada principalmente a través de la glucólisis acoplada al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) y al ciclo de las pentosas. En las neuronas el mejor sustrato oxidativo es la glutamina y el mejor sustrato hipogénico es el lactato.



Glucólisis - Ruta de Embden-Meyerhof.

La entrada de glucosa está regulada por la hexoquinasa, una enzima inhibida por la glucosa-6-fosfato. Otros dos enzimas importantes en la regulación de la glucólisis son la fosfofructoquinasa y la piruvato quinasa. Sus actividades son controladas por los niveles de fosfatos energéticos, así como del citrato y acetil-CoA. El piruvato, a través de la lactato deshidrogenasa, se encuentra en equilibrio dinámico con el lactato, esta reacción es fundamental para regenerar el NAD +.

Ciclo de los ácidos tricarbóxicos- Ciclo de Krebs- y la fosforilación oxidativa.

La entrada de piruvato en el ciclo es controlado por la actividad de la piruvato deshidrogenasa, que es inhibido por los niveles de ATP y NADH. Otros dos puntos de regulación del ciclo son el isocitrato y la alfa-cetoglutarato deshidrogenasa.

Esquema 2.- Mecanismos del metabolismo de la glucosa.

2.2.5 Metabolismo del piruvato, lactato y acetato

La glucosa es el principal precursor de piruvato mitocondrial. Durante el ayuno prolongado o en las etapas de desarrollo, el lactato, los cuerpos cetónicos y la glutamina pueden usarse como precursores de piruvato. El complejo piruvato deshidrogenasa cataliza la conversión de piruvato a AcetilCoA (irreversible y anaeróbica). La glucosa que viene del glucógeno hepático o cerebral no satisface los requerimientos energéticos, por tanto, existen otros sustratos como el lactato pueden sustituir a la glucosa. El lactato se metaboliza principalmente en las neuronas y se encarga de regular la toxicidad del glutamato ya que es un sustrato mucho más accesible.

El tejido cerebral metaboliza activamente acetato por el TCA. El punto principal de entrada del acetato es su conversión a AcetilCoA el cual entra al TCA por condensación con oxalacetato para formar citrato. Finalmente el acetato es metabolizado a Glutamina. El acetato es mejor sustrato oxidativo que la glucosa y es más activo e importante en astrocitos que en las neuronas.

2.2.6 Metabolismo de los cuerpos cetónicos

3-Hidroxibutirato y el acetoacetato, Pueden reemplazar a la glucosa como el mejor recurso energético del cerebro en situaciones de inanición o durante el crecimiento. En casos de desnutrición crónica es el soporte principal del metabolismo oxidativo cerebral.

2.2.7 Consumo de O₂ por el cerebro:

El tejido cerebral es aerobio. Sus altos requerimientos metabólicos consumen de 40 a 70 ml de O₂/minuto (3 a 5 ml de O₂/100 g/min) y 5 mg/100 g/ minuto de glucosa. Afortunadamente bajo condiciones normales, existe un margen de seguridad puesto que el transporte de oxígeno es considerablemente mayor que la demanda. Cualquier disminución en el transporte (no asociado con una disminución en la demanda) puede ser compensada, por lo menos inicialmente, con un aumento en la cantidad de oxígeno extraído de la sangre. Sin embargo en situaciones traumáticas. En la hipoxia cerebral, las demandas energéticas se tienen que cubrir mediante el metabolismo anaeróbico.

2.3 El NMR y el estudio del metabolismo.

La RMN o NMR (Resonancia Magnética Nuclear) es una técnica empleada en múltiples disciplinas desde las ciencias experimentales clásicas hasta ciencias de la salud o tecnológicas. La RMN se basa en un fenómeno que presentan los núcleos magnéticamente activos en presencia de un campo magnético estable y la aplicación de ondas electromagnéticas de radiofrecuencia. Los núcleos con un número impar de protones o neutrones, poseen un momento magnético característico y un campo magnético asociado (paramagnéticos). Cuando se exponen a un campo magnético estático B_0 , los dipolos magnéticos de los núcleos tienden a alinearse con el mismo. Para el isótopo ^1H del átomo de hidrógeno se crean dos estados energéticos, uno paralelo y otro antiparalelo a B_0 , con prácticamente la misma probabilidad de ser ocupados.

La RMN se basa en la aplicación de un campo de radiofrecuencia B_1 en una dirección perpendicular a B_0 que genera una magnetización transversal dependiente del tiempo. El voltaje inducido se puede medir empleando un receptor de ondas de radio. A pesar de ser el núcleo más sensible debido a su abundancia, el ^1H no es el único empleado en esta técnica. Otros átomos paramagnéticos aparte del ^1H son ^{31}P , ^{13}C , ^{19}F , ^{23}Na , etc.

La RMN presenta dos vertientes de estudio, por un lado la espectroscopia, quizá la más conocida en el campo de la química y la bioquímica, y por otro la imagen más extendida en la medicina y la biomedicina. La enorme versatilidad de esta técnica, permite la investigación de aspectos tan diversos como la estructura tridimensional y dinámica de macromoléculas biológicas, el estudio de la anatomía en seres humanos y modelos animales, o el seguimiento in vivo de rutas metabólicas y su regulación. No obstante, la Imagen de Resonancia Magnética es la técnica con mayor implantación en el diagnóstico clínico. En este caso, de entre todos los posibles átomos a utilizar, el hidrógeno es el de uso más extendido. Prácticamente la totalidad de las imágenes obtenidas en diagnóstico son imágenes de ^1H , que por otro lado es el núcleo más abundante en el cuerpo humano.

Dentro del campo de la investigación básica en biomedicina la RMN, las características inherentes de esta técnica, como los tiempos de relajación, valores de desplazamiento químico y constantes de acoplamiento, contienen una valiosa información acerca del estado fisiológico o patológico de los tejidos y de multitud de procesos biológicos. Por contra, la RMN es menos sensible que los métodos ópticos o radiactivos. La sensibilidad oscila entre 0,01 y 1 mM para estudios in vitro e in vivo respectivamente.

Todas estas características abren un enorme campo de posibilidades que han conducido a que tanto la imagen como la espectroscopia de RMN se apliquen cada vez más en multitud de áreas y líneas de investigación dentro de casi cualquier área de la ciencia, permitiendo el estudio de numerosos aspectos de una manera que no es abordable por ninguna otra técnica.

2.4 Análisis del artículo: “The human brain utilizes lactate via the tricarboxylic acid cycle: a ^{13}C -labelled microdialysis and high-resolution nuclear magnetic resonance study”.

2.4.8 Descripción general del artículo.

En este artículo (Gallagher et al., 2009) publicado en Brain y aceptado en junio de 2009, Gallagher et. al, emplean una técnica de micro diálisis para introducir sustratos energéticos marcados con ^{13}C (2- ^{13}C -acetate, 3- ^{13}C -lactate y 1- ^{13}C -Glucose) y recoger sus correspondientes metabolitos. Mediante espectroscopia de ^{13}C -NMR detectan las señales correspondientes a C2, C3 y C4 de la glutamina. Los catéteres de micro diálisis se implantan en 15 pacientes de TBI (un paciente como muestra de control). Se implantan dos sondas de micro-diálisis por paciente, una cercana a la zona de materia gris afectada y otra de forma simétrica en el hemisferio contrario. Las sondas de micro-diálisis permiten inyectar (“perfusión”) las disoluciones de los sustratos. Los sustratos se inyectan a $0.3 \mu\text{l}/\text{min}$, en una concentración similar a la fisiológica (4mM 2- ^{13}C sodium acetate / 4mM, 3- ^{13}C sodium L-lactate / 2mM 1- ^{13}C D-glucose). La sonda de microdiálisis permite a su vez recoger líquido cerebral. El líquido cerebral durante o después de la inyección (no se indica) se recoge durante el espacio de un día. **Hay que destacar que los autores no indican el tiempo ni la velocidad de captura del líquido cerebral, únicamente indican que recogen aprox. 24 viales en un día por cada catéter.**

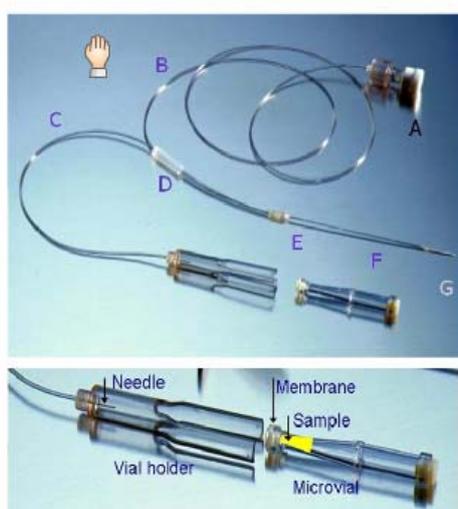


Fig 1. The CMA70 Brain catheter. The luer (A) connects to the CMA106 Syringe. The inflow (B) and outflow (C) tubes are surrounded by the sliding cuff (D) which is used to suture the catheter to the skin of the scalp. The two tubes join in the cylindrical “liquid cross” (E), which connects to the shaft (F) and the dialysis membrane (G) with its gold tip. The protective tube is not shown. The Vial holder and the Microvial are shown in the lower panel. The needle of the holder penetrates the membrane of the microvial when the vial is pushed into the holder. The sample is collected in the neck of the vial just under the membrane.

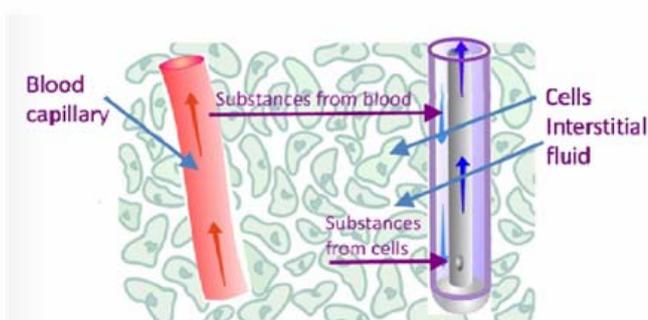


Fig 2. Principles of microdialysis. The microdialysis catheter takes up substances delivered by the blood e.g. glucose and drugs, but also substances released from the cells e.g. markers of cellular metabolism. Substances may also be introduced into the tissue by including them in the perfusate, e.g. precursors of enzymatic processes, and the products of the process may then be recovered by the microdialysis catheter. Another unique possibility is to deliver drugs to the tissue for studies of pharmacodynamic effects or for obtaining local therapeutic effects e.g. treatment of brain tumors have been attempted with this approach.

Figura 3.- Principios de la técnica de la micro diálisis. Tomado de <http://www.microdialysis.se/>

2.4.9 ¿Qué consideraciones hay que tener en cuenta para valorar el trabajo de Gallagher?

Las consideraciones más importantes a tener en cuenta de este trabajo son:

1. Son experimentos en humanos. Hasta el momento no se había medido **directamente** el uso de lactato como fuente de energía en humanos (si en ratas).
2. Si bien el metabolismo cerebral de la glucosa esta muy bien determinado, **es extremadamente importante desarrollar métodos de seguimiento y monitorización de los pacientes con TBI**. Desde este punto de vista los estudios con sustratos marcados con ^{13}C ofrecen la ventaja de poder monitorizar tanto el consumo como la acumulación de metabolitos.
3. En la discusión del artículo los autores asumen al modelo de “Magistretti (Pellerin et al., 2007; Magistretti and Pellerin, 1999) y Pellerin” (Figura 4).

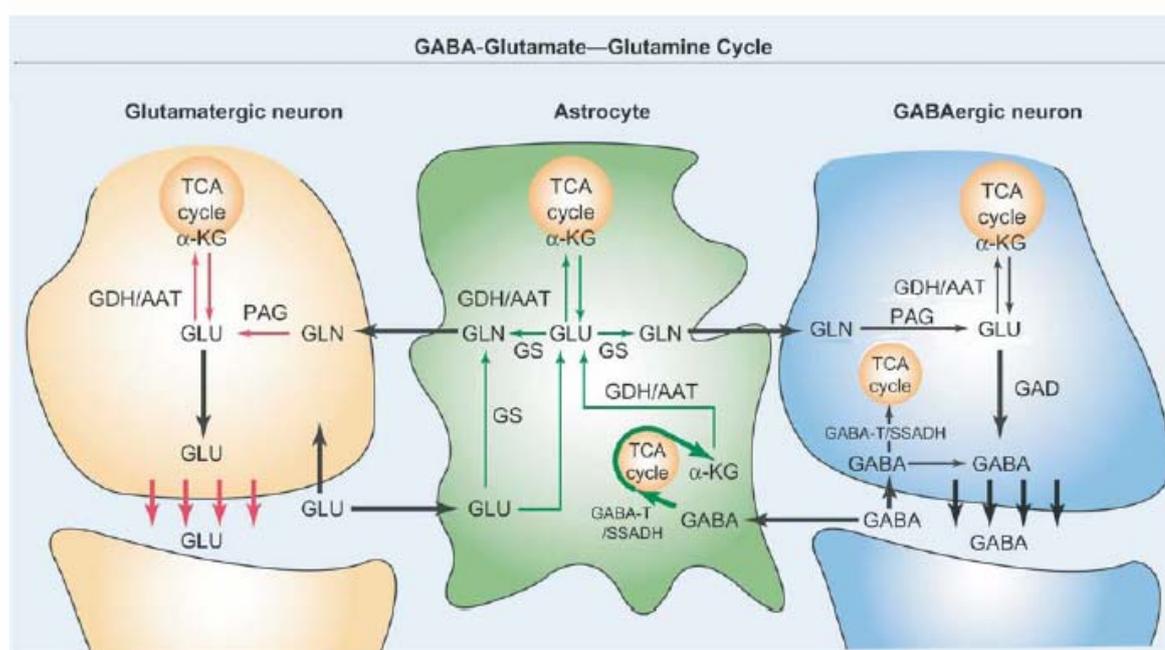


FIGURE 31-8 GABA–glutamate–glutamine cycle. Simplified schematic representation of key metabolic processes and release and uptake of neurotransmitters in glutamatergic and GABAergic synapses interacting with a surrounding astrocyte. The glutamate–glutamine cycle including the glutamine synthetase (GS) reaction is indicated in the glutamatergic neuron – astrocyte interaction. Analogously, the GABA–glutamate–glutamine cycle, including the GABA transaminase (GABA-T), succinate semialdehyde dehydrogenase (SSADH) and glutamate decarboxylase (GAD) reactions, is indicated in the GABAergic neuron–astrocyte interaction. The close association of the neurotransmitters, GABA and glutamate, to TCA cycle metabolism is indicated in all three cells. Glutamate is converted to α -ketoglutarate via either glutamate dehydrogenase (GDH) or aspartate aminotransferase (AAT). GLN, glutamine; GLU, glutamate; α -KG, α -ketoglutarate; PAG, phosphate activated glutaminase; TCA, tricarboxylic acid.

Figura 4.- Modelo compartimentalizado de “Magistretti y Pellerin”. La glucosa de la vasculatura es metabolizada por los astrocitos a lactato en el citosol. Lactato se transporta al líquido extracelular, y es captado por las neuronas, que lo utilizan a través del ciclo del TCA. En esta fase, primero (en el citosol de la neurona) el lactato se convierte a piruvato, que es transportado a la mitocondria, y allí se convierte en acetil-CoA, que luego ingresa en el ciclo de TCA. Una parte de alfa-cetoglutarato del ciclo del TCA se convierte en glutamato. El glutamato de la neurona es principalmente almacenado en las vesículas intracelulares. Las moléculas de glutamato son liberadas de la neurona pre-sináptica en la hendidura sináptica, donde pueden estimular los receptores de glutamato sobre la neurona postsináptica. Dentro de la hendidura sináptica, las concentraciones de glutamato en "reposo" son bajas (1-10 mM), y pueden alcanzar brevemente los 100-1000 mM durante la neurotransmisión. El glutamato es vertido por las neuronal al espacio sináptico y allí es recogido por los astrocitos y convertido en glutamina (por la glutamina sintetasa en el retículo endoplasmático y citosol), posteriormente la glutamina es transportada al líquido extracelular. La glutamina en el líquido extracelular es captada por las neuronas y de esta forma puede convertirse de nuevo en el glutamato, por la glutaminasa en la mitocondria y el citosol. Fuera de la espacio sináptico las concentraciones extracelulares de glutamato son típicamente bajas (1-20 mM), llegando a 100-200 mM en la isquemia, mientras que las concentraciones de glutamina son normalmente de 400-1000 mM

2.4.10 Resumen de resultados

Como cabe esperar, dada la baja concentración de sustrato inyectada, no se obtienen resultados cuantitativos (no plantean tampoco una comparación entre viales), pero si que observan señales de los metabolitos correspondientes al sustrato inyectado. **Principalmente, se observa que cuando se inyecta tanto lactato como acetato se obtienen las señales de glutamina, y cuando se inyecta glucosa se obtiene principalmente lactato.**

2.4.11 ¿Dónde esta la señal de la glutamina en el espectro?

Aunque el glutamato y la glutamina son enzimáticamente ínter convertibles **las concentraciones de glutamina de las muestras de micro-díálisis serán sustancialmente más altas que las de glutamato ya que la mayoría del glutamato se encuentra en las vesículas intracelulares de los astrocitos** (Ni et al., 2007). Se puede observar en el espectro que las señales de glutamato son imperceptibles. Sin embargo, si que existe evidencia de su formación ya que se obtienen señales para la glutamina en los carbonos C2, C3 y C4. (Figura 6)

Table 1 ¹³C-Labelled key metabolites in microdialysates and their chemical shifts (p.p.m.), resulting from perfusion with 2-¹³C-acetate

| Identity | Standard (p.p.m.) | Patient 1 (p.p.m.) | | Patient 3 (p.p.m.) | | Patient 4 (p.p.m.) | | Patient 5 (p.p.m.) | | Patient 6 (p.p.m.) | |
|---------------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | | CTO 1 | CTO 2 | CAD A | CAD B | CAD A | CAD B | CAD A | CTO | CAD A | CTO |
| Lac C2 | 68.52 | 68.53 | 68.51 | 68.51 | 68.53 | 68.53 | 68.52 | 68.48 | 68.50 | 68.53 | 68.54 |
| Gln C2 ^a | 54.17 | 54.70 | - | - | 54.53 | 54.48 | - | - | 54.67 | 54.61 | 54.51 |
| Glt C4 ^b | 33.25 | - | - | 33.46 | - | - | - | - | - | - | - |
| Gln C4 | 30.80 | 31.12 | 31.00 | - | 31.01 | 30.99 | 31.07 | - | 31.12 | 31.08 | 31.00 |
| Glt C4 ^c | 30.25 | 30.25, 29.66 | 30.23 | - | 29.70 | 29.70 | - | - | 29.65 | 29.66 | 29.67 |
| Gln C3 ^d | 26.21 | 27.73 | - | - | - | 27.00 | - | - | 27.82 | 27.45 | - |
| Ac C2 | 23.20 | 23.27 ^e | 23.25 ^e | 23.25 ^e | 23.26 ^e | 23.26 ^e | 23.26 ^e | 23.23 ^e | 23.25 ^e | 23.27 ^e | 23.27 ^e |
| Lac C3 | 20.08 | 20.10 | 20.06 | 20.07 | 20.09 | 20.10 | 20.09 | 20.04 | 20.06 | 20.10 | 20.11 |

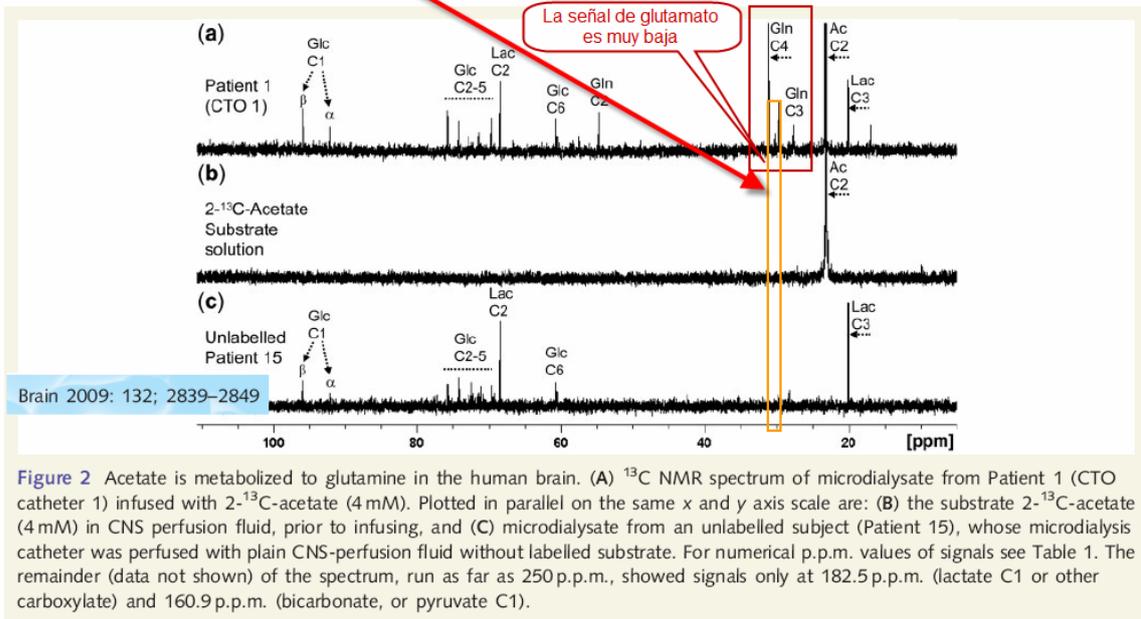


Figure 2 Acetate is metabolized to glutamine in the human brain. (A) ¹³C NMR spectrum of microdialysate from Patient 1 (CTO catheter 1) infused with 2-¹³C-acetate (4 mM). Plotted in parallel on the same x and y axis scale are: (B) the substrate 2-¹³C-acetate (4 mM) in CNS perfusion fluid, prior to infusing, and (C) microdialysate from an unlabelled subject (Patient 15), whose microdialysis catheter was perfused with plain CNS-perfusion fluid without labelled substrate. For numerical p.p.m. values of signals see Table 1. The remainder (data not shown) of the spectrum, run as far as 250 p.p.m., showed signals only at 182.5 p.p.m. (lactate C1 or other carboxylate) and 160.9 p.p.m. (bicarbonate, or pyruvate C1).

Figura 5.- El acetato se metaboliza a glutamina.

¹³C-Labeled substrates and the cerebral metabolic compartmentalization of acetate and lactate

Randy Lee Tyson, Clare Gallagher, Garnette Roy Sutherland*

Brain Research 992 (2003) 43–52

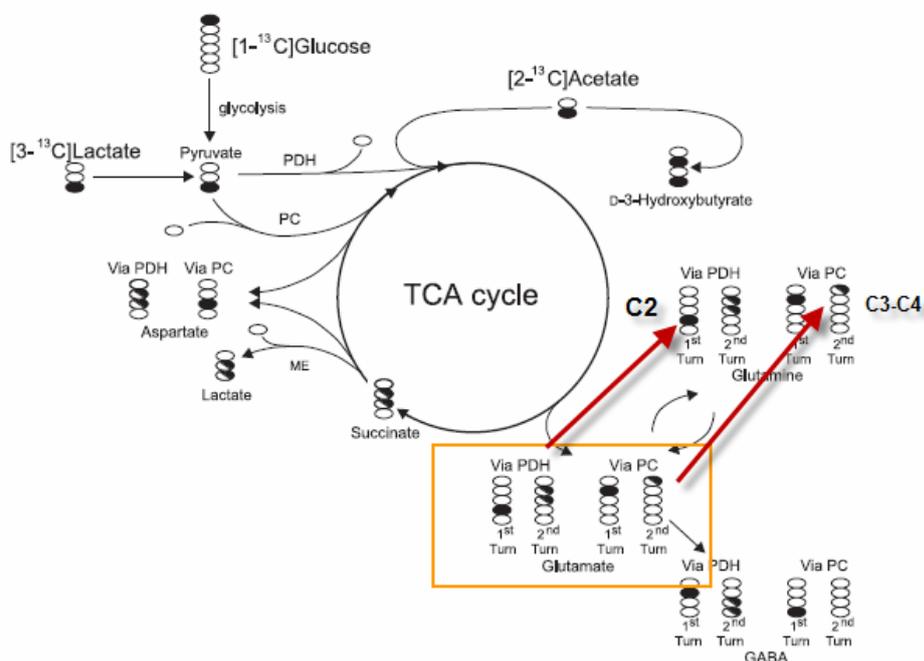


Fig. 1. Schematic describing the labeling patterns of metabolites observable in the ¹H MR spectrum from metabolism of [1-¹³C]glucose, [2-¹³C]acetate and [3-¹³C]lactate. PDH, pyruvate dehydrogenase; PC, pyruvate carboxylase; ME, malic enzyme.

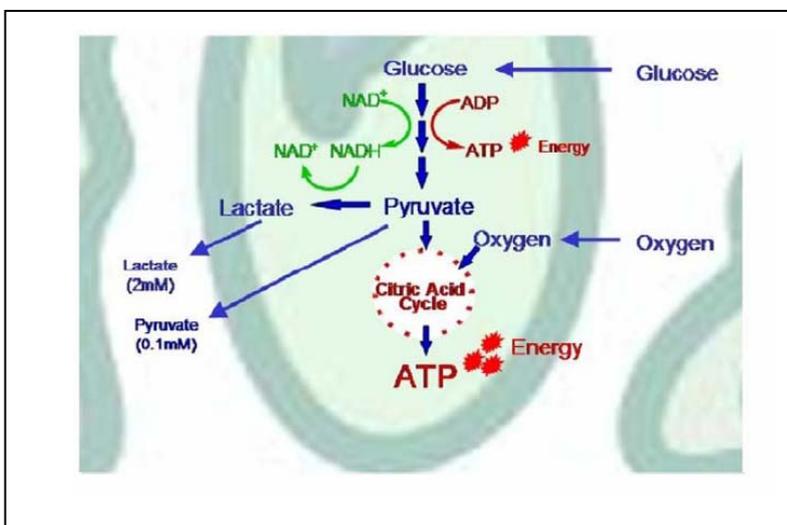
Figura 6.- Ciclo metabólico de los sustratos marcados. Los óvalos en negro indican que el carbono está marcado.(Tyson et al., 2003)

Los autores, como indican en la discusión, esperaban obtener una señal más intensa para el glutamato, ya que es uno de los indicadores de daño cerebral.

2.4.12 ¿Por que medir lactato y acetato en los pacientes?

El ratio lactato / piruvato es un marcador del metabolismo oxidativo de los tejidos (células). Desde este punto de vista una isquemia o disfunción mitocondrias afectará a la concentración de ambos sustratos. El piruvato se

synetiza a partir de la glucosa en la glucólisis anaeróbica, y a continuación entra en el ciclo del ácido cítrico (TCA). El ciclo del ácido cítrico es el principal productor de energía con la obtención de 32 moléculas de ATP. En la isquemia hay una disminución en el flujo sanguíneo, por lo que hay un suministro de oxígeno muy bajo, que supone una reducción de la actividad del TCA. Las células intentan compensarlo mediante un aumento de la glicólisis anaerobia mediante la conversión de piruvato a lactato, lo que provoca un aumento del ratio lactato / piruvato.



Igualmente la disminución del flujo sanguíneo provoca un descenso en la concentración de glucosa en el líquido intersticial que conduce también a una disminución en la producción de piruvato. En definitiva un aumento de la proporción lactato / piruvato puede ser signo de crisis metabólica pero no necesariamente sinónimo de daño celular isquémico.

La relación lactato / piruvato es prácticamente la misma en cualquier tejido (aprox. 20). Una relación superior a 25 es un signo del inicio de crisis metabólica (fuente el fabricante: <http://www.microdialysis.se/>).

2.4.13 ¿Qué alternativas puede ofrecer el ^{13}C -RMN en este tipo de estudios?

La idea del trabajo de Gallagher es buena, pero el enriquecimiento en ^{13}C mediante la perfusión por catéter no permite obtener resultados cuantitativos. Existen estudios similares en la bibliografía (en ratas) mediante el uso de núcleos hiper-polarizados alcanzan resoluciones de 1-5 μM (Deelchand et al., 2009a; Gallagher et al., 2009; Li et al., 2009; van et al., 2009; Sailasuta et al., 2008). Por otra parte, sería adecuado combinar los estudios de perfusión con ^{13}C -RMN con RMN por imagen (con hiperpolarización), a efectos de contrastar el flujo de los sustratos en la zona afectada con los tejidos normales.

2.5 Análisis del artículo: “Simultaneous measurement of neuronal and glial metabolism in rat brain in vivo using co-infusion of [1,6-¹³C₂]glucose and [1,2-¹³C₂]acetate”.

2.5.14 Descripción general del artículo.

El artículo de (Deelchand et al., 2009b) es un ejemplo instructivo de cómo debe realizarse un estudio biomédico por RMN. A diferencia del artículo de Gallagher comentado anteriormente, **el uso de animales modelo y tecnología adecuada al problema, permite cuantificar la evolución temporal de los metabolitos.**

El objetivo final del trabajo es demostrar que el patrón metabólico observado en distintos isotopómeros de glutamato y la glutamina durante la infusión simultánea de [1,6-¹³C₂] glucosa y [1,2-¹³C₂] acetato puede ser detectada y cuantificada “in-vivo” de forma dinámica.

2.5.15 ¿Cuáles son las claves de este experimento?

Las claves de este trabajo, a mi parecer son las siguientes:

1. Es evidente, que **la potencia y resolución de los equipos (9.4 Tesla)** es superior a los empleados en el trabajo de Gallagher.
2. Se inyectan los tres sustratos a la vez. Mayor cantidad al inicio del experimento para ir seguidamente reduciendo las cantidades en forma exponencial. De esta forma **consiguen estabilizar los niveles de sustrato marcado.** (Figura 7). El posterior análisis de los resultados es mucho más sencillo, ya que las entradas del balance de masas del sistema son constantes.

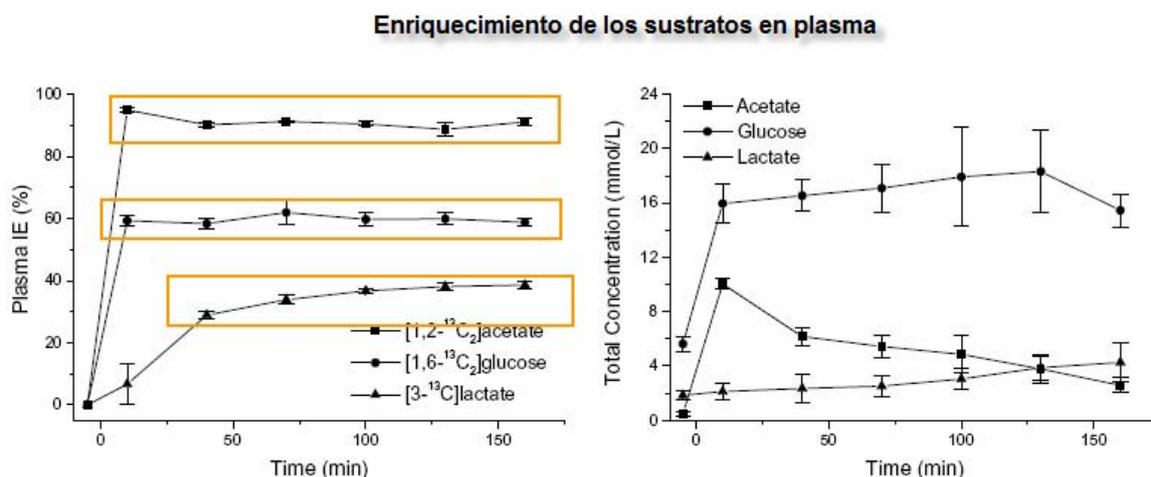


Fig. 2. ¹³C isotopic enrichment (left) and total concentration (right) of glucose, acetate and lactate in blood plasma. Error bars represent standard deviation (n = 5).

Journal of Magnetic Resonance 196 (2009) 157–163

Figura 7.- Enriquecimiento de los sustratos en plasma. el grafico de la izquierda representa el enriquecimiento en plasma de los sustratos marcados, el derecho es la concentración total de los sustratos marcados y no marcados.

3. Planean tres tipos de experimentos. Por una parte hacen un seguimiento de las señales en plasma a lo largo de todo el experimento, y por otra **miden “in-vivo” mediante RMN localizado (como si fuera RMN de imagen pero con ¹³C)**, las señales de los metabolitos en el cerebro. De esta forma obtienen una resolución temporal de 11 mn. Al final del experimento, se sacrifica al animal y se realizan resonancias

de alta-resolución de los extractos cerebrales. Esta última medida sirve para calibrar la intensidad de las señales obtenidas “in-vivo”.

- La elección de los sustratos permite seguir de forma independiente todos los metabolitos y compartimentos del metabolismo de la glucosa en el cerebro, en especial el puente neurona-astrocito. Como se aprecia en la Figura 8 todos los metabolitos quedan marcados en diferentes carbonos. Por ejemplo, el citrato generado en las neuronas es diferente, que el generado en los astrocitos.

158

D.K. Deelchand et al. / Journal of Magnetic Resonance 196 (2009) 157–163

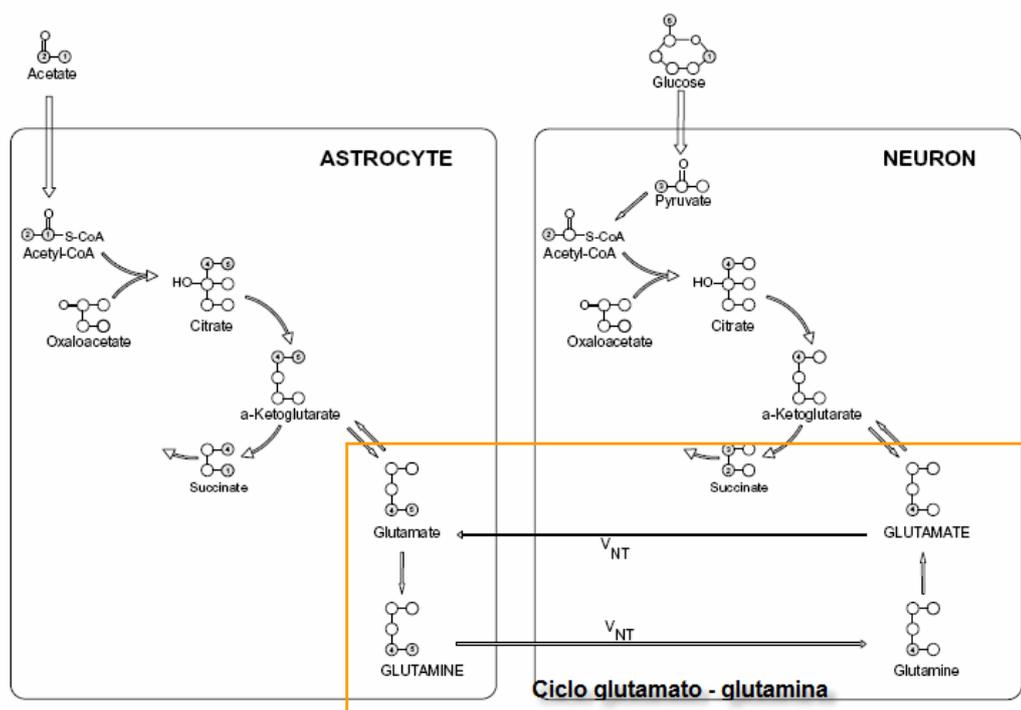


Fig. 1. Incorporation of ^{13}C labels into the neuronal and astrocytic compartments following simultaneous infusion of $[1,6\text{-}^{13}\text{C}_2]$ glucose and $[1,2\text{-}^{13}\text{C}_2]$ acetate in the brain. (For simplicity, the uptake of $[1,6\text{-}^{13}\text{C}_2]$ glucose in the astrocytes is not shown.) In both cell types, $[1,6\text{-}^{13}\text{C}_2]$ glucose is converted to $[3\text{-}^{13}\text{C}]$ pyruvate which enters the neuronal or astrocytic TCA cycle via pyruvate dehydrogenase in the form of acetyl-CoA and leads to the formation of single-labeled $[4\text{-}^{13}\text{C}]$ glutamate and $[4\text{-}^{13}\text{C}]$ glutamine. In astrocytes, $[3\text{-}^{13}\text{C}]$ pyruvate can also enter the TCA cycle via pyruvate carboxylase to yield $[2\text{-}^{13}\text{C}]$ glutamate. At the same time, after conversion to $[1,2\text{-}^{13}\text{C}_2]$ acetyl-CoA in the astrocytes, acetate enters the TCA cycle to produce $[4,5\text{-}^{13}\text{C}_2]$ glutamate and $[4,5\text{-}^{13}\text{C}_2]$ glutamine during the first turn of the cycle. Glutamate released by neurons is taken up by astrocytes and converted into glutamine. Glutamine is then released and sent back to neurons where it is converted to glutamate. This cycling of neurotransmitter between astrocytes and neurons is referred to as the glutamate–glutamine cycle (V_{NT}).

Figura 8.- Estrategia de marcado de los sustratos.

2.5.16 ¿Es posible diferenciar el glutamato de la glutamina?

Al realizar los experimentos con RMN localizada y con sustratos iniciales con distinto marcados, pueden distinguir perfectamente el glutamato de la glutamina. La glutamina sintetizada en los astrocitos (parte del sustrato acetato) tiene dos señales mientras que la sintetizada en las neuronas solo una (parte de la glucosa). De esta forma queda totalmente demostrada la compartimentalización del metabolismo cerebral entre neuronas y astrocitos.

Como afirman los autores, esto no quiere decir que se puedan determinar de forma definitiva las coeficientes de transporte V_{NT} (ver Figura 8) entre astrocitos y neuronas. Únicamente, estiman que el 80% del AcetylCoA proviene de los astrocitos y el 20 restante de las neuronas.

2.5.17 ¿Y que ocurre con el lactato?, ¿no se metaboliza?

El lactato, se genera y se metaboliza, pero su señal no se dispara, únicamente crece ligeramente con el tiempo por acumulación (Figura 9), ya que no estamos introduciendo lactato marcado y estamos añadiendo un extra de glucosa en el sistema. Además, hay que tener en cuenta que el animal está sedado y sus requerimientos energéticos son menores. Es decir, el lactato parece que sirve como una pequeña reserva temporal. Lo normal es que llegara a saturación, cosa que no ocurre en el transcurso del experimento, seguramente debido a que lo están inyectando una cantidad cada vez menor a lo largo del experimento.

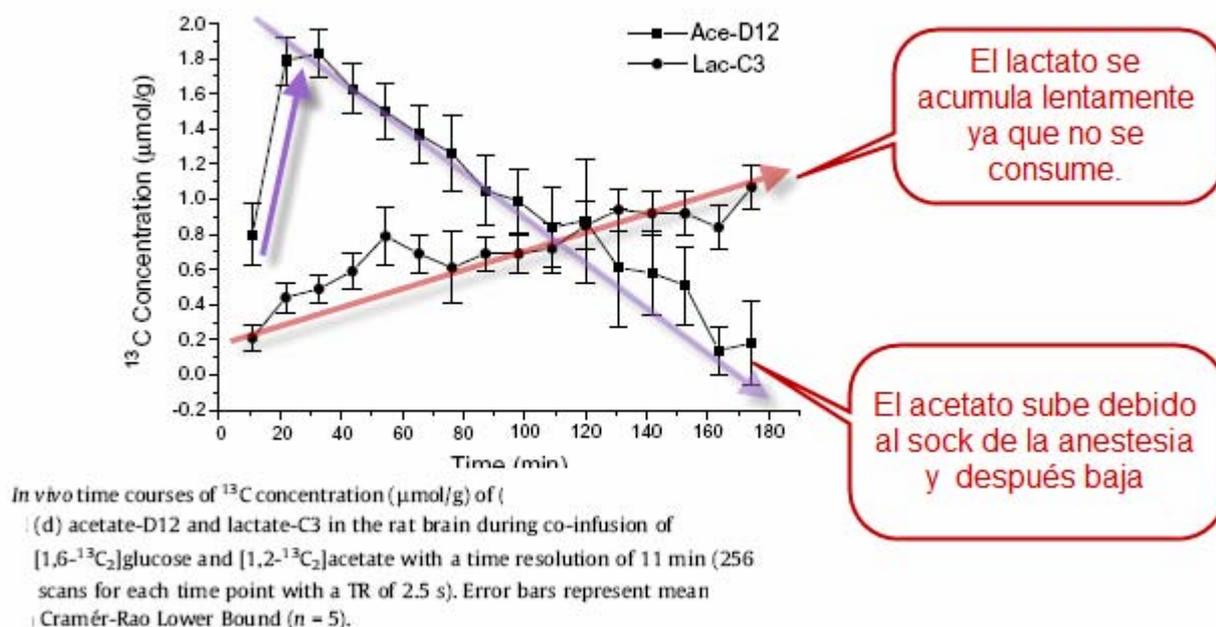


Figura 9.- Generación de lactato y eliminación de acetato.

Según los autores, el aumento seguido de descenso de acetato es normal durante la sedación, sin embargo hay que recordar que en plasma se mantiene más o menos constante, lo que nos está indicando que la membrana se ha permeabilizado y se está eliminando al plasma sanguíneo (Valette et al., 2008; Valette et al., 2008). Todo parece indicar que bajo estas condiciones el uso de acetato por el cerebro se satura al alcanzar la concentración de 3 mM.

2.5.18 ¿Cuales son las implicaciones de estos resultados?

Es evidente que el cerebro no es un sistema sencillo de modelizar. Pero estos resultados demuestran que es posible experimentar con ratas aspectos del metabolismo cerebral no explorados hasta el momento. Los autores proponen como modelo de estudio entre grupos de control y tratamiento. Y además podría servir como modelo para el estudio de enfermedades como la ansiedad y la depresión. En este último termino ya se han iniciado estudios en humanos (Paulesu et al., 2010; Dienel and Cruz, 2008; Sailasuta et al., 2008) y seguramente veremos más en breve.

2.6 Conclusiones y cuestiones abiertas sobre el estudio mediante RMN del metabolismo energético del cerebro

- a. La hipótesis acerca de que los astrocitos tienen un papel importante como proveedores de lactato a las neuronas sigue siendo controvertida. En todos los reviews consultados, aun es objeto de debate si lactato es el sustrato preferente de las neuronas durante la neuro-transmisión.
- b. Las mediciones cuantitativas localizadas de las variaciones de concentración de los metabolitos in vivo son metodológicamente muy problemáticas. La espectroscopia de ^{13}C puede potencialmente estimar los cambios en los flujos, pero las limitaciones técnicas que todavía no permiten estudios funcionales en humanos. Por otra parte, la espectroscopia de RMN - ^1H es factible para las investigaciones funcionales del cerebro humano, pero no es sensible a los cambios en los flujos metabólicos (Debido principalmente a la imposibilidad de marcar los sustratos)
- c. La interpretación de los resultados in vivo de imagen de RMN en el contexto de los modelos de compartimentación metabólica es cuestionado por la falta de la resolución espacial adecuada.
- d. Las necesidades energéticas se correlacionan con la neuro-transmisión. Sin embargo, predecir el costo de energía relacionado sigue siendo una tarea difícil, y ha sido abordado hasta el momento de una forma parcial.

Reference List

- Gallagher,C.N. et al. (2009) The human brain utilizes lactate via the tricarboxylic acid cycle: a ¹³C-labelled microdialysis and high-resolution nuclear magnetic resonance study. *Brain.*, 132, 2839-2849.
- Pellerin,L. et al. (2007) Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: an update. *Glia.*, 55, 1251-1262.
- Magistretti,P.J. and Pellerin,L. (1999) Cellular mechanisms of brain energy metabolism and their relevance to functional brain imaging. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.*, 354, 1155-1163.
- Ni,Y., Malarkey,E.B. and Parpura,V. (2007) Vesicular release of glutamate mediates bidirectional signaling between astrocytes and neurons. *J. Neurochem.*, 103, 1273-1284.
- Tyson,R.L., Gallagher,C. and Sutherland,G.R. (2003) ¹³C-Labeled substrates and the cerebral metabolic compartmentalization of acetate and lactate. *Brain Res.*, 992, 43-52.
- Deelchand,D.K. et al. (2009a) Acetate transport and utilization in the rat brain. *J. Neurochem.*, 109 Suppl 1:46-54., 46-54.
- Li,S. et al. (2009) In vivo ¹³C magnetic resonance spectroscopy of human brain on a clinical 3 T scanner using [2-¹³C]glucose infusion and low-power stochastic decoupling. *Magn Reson. Med.*, 62, 565-573.
- van,E.P. et al. (2009) In vivo neurochemical profiling of rat brain by (1)H-[(13)C] NMR spectroscopy: cerebral energetics and glutamatergic/GABAergic neurotransmission. *J. Neurochem.*
- Sailasuta,N. et al. (2008) Clinical NOE ¹³C MRS for neuropsychiatric disorders of the frontal lobe. *J. Magn Reson.*, 195, 219-225.
- Deelchand,D.K. et al. (2009b) Simultaneous measurement of neuronal and glial metabolism in rat brain in vivo using co-infusion of [1,6-¹³C₂]glucose and [1,2-¹³C₂]acetate. *J. Magn Reson.*, 196, 157-163.
- Valette,J. et al. (2008) Diffusion-weighted NMR spectroscopy allows probing of ¹³C labeling of glutamate inside distinct metabolic compartments in the brain. *Magn Reson. Med.*, 60, 306-311.
- Paulesu,E. et al. (2010) Neural correlates of worry in generalized anxiety disorder and in normal controls: a functional MRI study. *Psychol. Med.*, 40, 117-124.
- Dienel,G.A. and Cruz,N.F. (2008) Imaging brain activation: simple pictures of complex biology. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1147:139-70., 139-170.