

---

## COMPARTIMENTACIÓN INTRACELULAR DEL ACETATO EN NEURONAS DURANTE LA PRELACTANCIA

J. Tovar-Franco, B. Barrios-Socha

*Departamento de Nutrición y Bioquímica, Facultad de Ciencias,  
Pontificia Universidad Javeriana, Cra. 7ª No. 40-62, Bogotá, Colombia  
jatovar@javeriana.edu.co*

### RESUMEN

En la transición a la vida extrauterina, el recién nacido sufre un período de ayuno (prelactancia) que transcurre entre el cese de la nutrición placentaria y la instauración de la lactancia. El gasto de energía por las neuronas es tan alto en estas circunstancias, que la glucogenólisis es incapaz de restablecer los niveles de glucosa en la sangre. En consecuencia, durante la prelactancia debe haber otros sustratos energéticos y lipogénicos, que adicionalmente ayuden a mantener la síntesis de neurotransmisores.

Este trabajo establece la importancia de acetato en el metabolismo oxidativo y del lipogénico en neuronas durante la prelactancia. Se determinaron las velocidades de oxidación y lipogénesis en cultivos quiescentes de neuronas fetales de rata incubadas con acetato (5 mM), [1-<sup>14</sup>C]-acetato, [2-<sup>14</sup>C]-acetato y [U-<sup>14</sup>C]-acetato (200-300 dpm/nmol). Adicionalmente, se utilizaron inhibidores enzimáticos como el dicloroacetato (1 mM) y el aminooxicetato (5 mM), e inhibidores del transporte como el  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinnamato (2 mM), butilmalonato (5 mM) y 1,2,3-bencenotricarboxilato (5 mM).

Los resultados en su conjunto indican que las neuronas pueden metabolizar acetato más como sustrato energético que lipogénico, lo que nos permite pensar que este sustrato puede llegar a ser más importante para ayudar a mantener el metabolismo oxidativo, favoreciendo el reciclaje de carbonos en la prelactancia. Adicionalmente, se evidenció con el uso de [1-<sup>14</sup>C]-acetato una alta actividad anaplerótica sobre todo cuando las neuronas requieren mantener los reservorios de oxalacetato y acetyl-CoA para mantener la respiración. Estos resultados señalan a la acetyl-CoA sintetasa (AceCS2) y la enzima málica (mME) mitocondriales, como enzimas claves para mantener el funcionamiento de las neuronas en la prelactancia.

Con el uso de [2-<sup>14</sup>C]-acetato, los resultados sugieren que las neuronas tienen un alto requerimiento de carbonos, principalmente para la síntesis de neurotransmisores. Adicionalmente, la lipogénesis está soportada por la vía del citrato y la vía de la acetyl-CoA sintetasa citosólica (AceCS1).

**Palabras clave:** Acetato, lipogénesis, neurona, oxidación, prelactancia.

### ABSTRACT

During the transition into extrauterine life, the newborn goes through a fasting period (presuckling) that starts from the cessation of the transplacental supply of nutrients to the beginning of lactation. During this presuckling period, the newborn depends on its own reserves in a unique period of stress and vulnerability. The energy expenditure needed by the neurons is so high that under these circumstances the gluconeogenesis is not capable of reestablishing the blood glucose levels. Consequently, during the presuckling period there must be a different energy source and lipogenic substrates that help to maintain the synthesis of neurotransmitters.

The present work establishes the importance of acetate in the oxidative and lipogenic metabolism of neurons during the presuckling period. In this project oxidation and lipogenesis rates were measured in quiescent neonatal rat neuron cultures incubated with acetate (5 mM), [1-<sup>14</sup>C]-acetate, [2-<sup>14</sup>C]-acetate and [U-<sup>14</sup>C]-acetate (200-300 dpm/nmol). The enzyme inhibitors used were dichloroacetate (1 mM) and aminooxyacetate (5 mM), and the transport inhibitors were  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamate (2 mM), butylmalonate (5 mM) and 1,2,3-benzenetricarboxylate (5 mM).

The oxidation and lipogenesis rates indicate that neurons metabolize acetate more as an energy substrate than a lipogenic one. This leads us to believe that acetate may be more important as an oxidation substrate to enhance carbon recycling during the presuckling period. With the use of [1-<sup>14</sup>C]-acetate, it was clear that a high anaplerotic activity is obtained when the neurons require a reservoir of oxaloacetate and acetyl-CoA for the maintenance of respiration. The results show that the mitochondrial acetyl-CoA synthase (AceCS2) and the mitochondrial malic enzyme (mME) are the key enzymes for neuron maintenance during the presuckling period.

With the use of [2-<sup>14</sup>C]-acetate, the results suggest that the neurons have high carbon requirements for neurotransmitter synthesis. Lipogenic metabolism is supported by the citrate and cytoplasmic acetyl-CoA synthase (AceCS1) pathways.

**Key words:** Acetate, lipogenic, neuron, oxidative, presuckling.

---

## INTRODUCCIÓN

El desarrollo intrauterino y el nacimiento, constituyen una secuencia de cambios funcionales y anatómicos que tienen una base molecular. El metabolismo cerebral no puede interrumpirse ni siquiera por un corto tiempo, debiéndose disponer de lo más esencial para continuar el desarrollo de sus estructuras básicas y la síntesis de neurotransmisores. En la transición a la vida extrauterina, el recién nacido sufre un período de ayuno (prelactancia) que transcurre entre el cese de la nutrición placentaria y la instauración de la lactancia. Aunque la prelactancia es de escasa duración, transcurre en un período crítico en especies, que como la humana y la rata, presentan un desarrollo cerebral incompleto en el momento del nacimiento. Por ello se les conoce como especies “no precoces”.

Durante la adaptación a la vida extrauterina, el mantenimiento de la homeostasis energética resulta vital para la supervivencia del recién nacido. El neonato puede sobrevivir con sus propias reservas hasta que la leche materna le suministre los nutrientes necesarios para su mantenimiento y desarrollo. Sin embargo, el gasto de energía por

las neuronas es tan alto en estas circunstancias, que la glucogenólisis es incapaz de restablecer los niveles de glucosa en la sangre. En consecuencia, durante este período de adaptación deben haber otros sustratos energéticos y lipogénicos. Para el desarrollo del cerebro durante la prelactancia se ha demostrado que el lactato es un sustrato fundamental y que el 3-hidroxiacetato lo reemplaza en la lactancia. La capacidad del cerebro para utilizar acetato durante la prelactancia, es desconocida y no hay comparaciones con otros sustratos alternativos tales como la glucosa, cuerpos cetónicos y glutamina. El acetato, que posiblemente se sintetiza a partir del lactato en grandes cantidades en el período perinatal, puede ser además, un producto de la degradación de sustratos como el N-acetil-L-aspartato (NAA), el N-acetil-L-aspartil-L-glutamato (NAAG) y de la acetilcolina (ACh). En las neuronas se ha sugerido que el NAA mitocondrial es una fuente de grupos acetilo para la síntesis de lípidos y posiblemente de ACh. Adicionalmente, el NAA como uno de los mecanismos más importantes para la transferencia de acetyl-CoA de la mitocondria al citosol en el SNC en desarrollo.

El acetato y el NAA son metabolitos candidatos a ser compartimentados por las neuronas y astrocitos. Se ha propuesto que el acetato puede entrar en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos vía acetil-CoA sintetasa (acetato tioquinasa)(EC. 6.2.1.1) que lo convierte en acetil-CoA.

Este trabajo se enfocó en el estudio de procesos metabólicos intracelulares donde el acetato puede estar involucrado, para establecer su importancia en el metabolismo oxidativo y lipogénico de las neuronas durante la prelactancia.

Los resultados del presente trabajo, indican que las neuronas pueden metabolizar acetato más como sustrato energético que lipogénico, lo que nos permite pensar que este sustrato puede llegar a ser más importante para ayudar a mantener el metabolismo oxidativo, favoreciendo el reciclaje de carbonos en la prelactancia. Adicionalmente, se evidenció con el uso de [1-<sup>14</sup>C]-acetato una alta actividad anaplerótica sobre todo cuando las neuronas requieren mantener los reservorios de oxalacetato y acetil-CoA para mantener la respiración. Estos resultados señalan a la acetil-CoA sintetasa (AceCS2) y la enzima málica (mME) mitocondriales, como enzimas claves para mantener el funcionamiento de las neuronas en la prelactancia. Con el uso de [2-<sup>14</sup>C]-acetato, los resultados sugieren que las neuronas tienen un alto requerimiento de carbonos, principalmente para la síntesis de neurotransmisores. Adicionalmente, la lipogénesis en la prelactancia estaría soportada por dos rutas la vía del citrato y la vía de la acetil-CoA sintetasa citosólica (AceCS1).

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Cultivos celulares.** Cultivos primarios de neuronas fueron preparados de cerebros de fetos de 17.5 días de ratas albinas Wistar (Saneto y De Vellis, 1987a; Cohen, 1995;

Tovar, 1995). Las células fueron sembradas en frascos Roux con una densidad de  $1.35 \times 10^6$  células/ml. Las células fueron mantenidas en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), al cual se le adicionó bicarbonato de sodio anhidro (3.7 g/l) y cloruro de potasio (1.86 g/l)(316 mOsm/kg H<sub>2</sub>O) y fue suplementado con suero fetal bovino (FBS) (10%), ampicilina, estreptomycin, anfotericina y penicilina a 37°C en un incubador con 5% de CO<sub>2</sub>. A los 7 días, una vez las células formaron una capa confluyente y quiescente, fueron utilizadas para los experimentos y para hacer el conteo celular (Rose y Sinha, 1969; Kimelberg, 1983; Taberner, *et al.*, 1993).

**Incubaciones.** Con el objeto de conocer las capacidades máximas del acetato como precursor oxidativo y lipogénico, se utilizó medio de incubación Elliott (pH 7.38) (Elliott, 1969) con acetato (5 mM) como sustrato frío (Albarracín y Tovar, 2002) y cada uno de los sustratos marcados: [U-<sup>14</sup>C]-acetato, [1-<sup>14</sup>C]-acetato y [2-<sup>14</sup>C]-acetato, para medir las velocidades oxidativas y lipogénicas. Para estudiar el funcionamiento de las lanzaderas de carbono, es decir, aquellos mecanismos de transporte de carbonos entre la mitocondria y el citosol, se utilizó acetato (5 mM) y [U-<sup>14</sup>C]-acetato, [1-<sup>14</sup>C]-acetato y [2-<sup>14</sup>C]-acetato (200-300 dpm/nmol) como sustratos y se usaron los inhibidores enzimáticos como el dicloroacetato (DCA) y el aminooxiacetato (AOA) e inhibidores del transporte como el  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinnamato ( $\alpha$ -CN), el butilmalonato (BM) y el 1,2,3-bencenotricarboxilato (BT).

De acuerdo al experimento se adicionaron, los trazadores radiactivos en las siguientes concentraciones: [U-<sup>14</sup>C]-acetato (1  $\mu$ Ci); [1-<sup>14</sup>C]-acetato (1  $\mu$ Ci) y [2-<sup>14</sup>C]-acetato (1  $\mu$ Ci) a 1.5 ml del medio de incubación oxigenado por frasco Roux, con el sustrato frío sin y con el inhibidor respectivo, se selló herméticamente el frasco y se incubó 1 hora a 37°C. En paralelo se llevaron frascos sin

células pero con medio de incubación y sustratos fríos y radiactivos. Estos frascos sirvieron como blancos.

**Cuantificación de CO<sub>2</sub>.** Para capturar el <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> producido durante la incubación se empleó el método descrito por Sykes, con algunas modificaciones (Sykes *et al.*, 1986; Edmond, *et al.* 1987). Para capturar el CO<sub>2</sub> se utilizó un eppendorf con 500 µl de hidróxido de hiamina que se encontraba en un matraz erlenmeyer. En el pocillo principal se adicionó 100 µl de KOH (10 M) después de lo cual se selló herméticamente con un tapón de goma.

Sin destapar el frasco de cultivo, se extrajo con una jeringuilla el medio de incubación y se inyectó en el correspondiente matraz erlenmeyer previamente preparado. Se lavó la monocapa de células con PBS que, posteriormente, fue recuperado en su respectivo matraz. Se inyectaron 2 ml de KOH (0.3 M), colocando el frasco de manera que el KOH no contacte con las células pero capture el CO<sub>2</sub> remanente en el frasco de cultivo. Una hora después, el KOH fue retirado e inyectado en su respectivo matraz erlenmeyer. Se realizó otro lavado con PBS y, por último, una vez reunidos todos los volúmenes se adicionó 100 µl de HClO<sub>4</sub> (5 M) en el matraz erlenmeyer, con objeto de acidificar el medio y volatilizar el <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> que luego es capturado por la hiamina. Este proceso dura 1 hora.

A continuación se recogieron todos los tubos Eppendorf que contienen el hidróxido de hiamina, se colocaron en viales y se les adicionó 5 ml de líquido de centelleo, se agitaron por 30 segundos y se dejaron en reposo 16 horas para medir las desintegraciones por minuto (dpm) utilizando la técnica de espectroscopia de centelleo líquido. La velocidad de respiración se reporta como nmol CO<sub>2</sub>/hora/millón de células.

**Cuantificación de lípidos.** Para hacer la determinación de la incorporación de los

sustratos en lípidos totales, se siguió el método de Folch y colaboradores (1957), con ligeras modificaciones (Folch, *et al.* 1957; Bolaños y Medina, 1992; Tabernero, *et al.*, 1993; Tovar, 1995). Para extraer los lípidos, la monocapa de células se separó del frasco de cultivo con ayuda de un raspador en 1 ml de metanol, y se añadió a un tubo que contiene 2 ml de cloroformo (bidestilado). El tubo se agitó por 30 segundos y se almacenó durante 16 horas en el congelador. Posteriormente se centrifugó (1500 x g, 15 min, 4°C) y se lavó con NaCl (0.3%) saturado con cloroformo. Se realizó una centrifugación en las condiciones anteriores, se retiró la fase acuosa y se recogió la fase clorofórmica. Esta última fase se evapora y el residuo lipídico se disolvió en líquido de centelleo, se agitó mecánicamente por 30 segundos y después de 24 horas, se midió la radiactividad incorporada en lípidos utilizando la técnica de espectroscopia de centelleo líquido. La velocidad de lipogénesis se reporta como nmol de lípidos/hora /millón de células.

**Estadística.** Se utilizó un diseño completamente aleatorizado, con tres réplicas por experimento. Cada réplica se hizo por quintuplicado. El análisis de la significancia entre las réplicas de un mismo experimento se hizo utilizando el test "t" de Student. Para determinar los efectos de los diferentes factores considerados se hicieron comparaciones múltiples utilizando el análisis de varianza (ANOVA). Este análisis incluye el test F. Las comparaciones entre los diferentes tratamientos se hizo aplicando la prueba de Duncan para los experimentos cuyo F fue significativo.

## RESULTADOS

### Utilización de [U-<sup>14</sup>C]-acetato, [1-<sup>14</sup>C]-acetato y [2-<sup>14</sup>C]-acetato por las neuronas.

Con el objeto de comprender los resultados obtenidos, en la figura 1 se muestra el

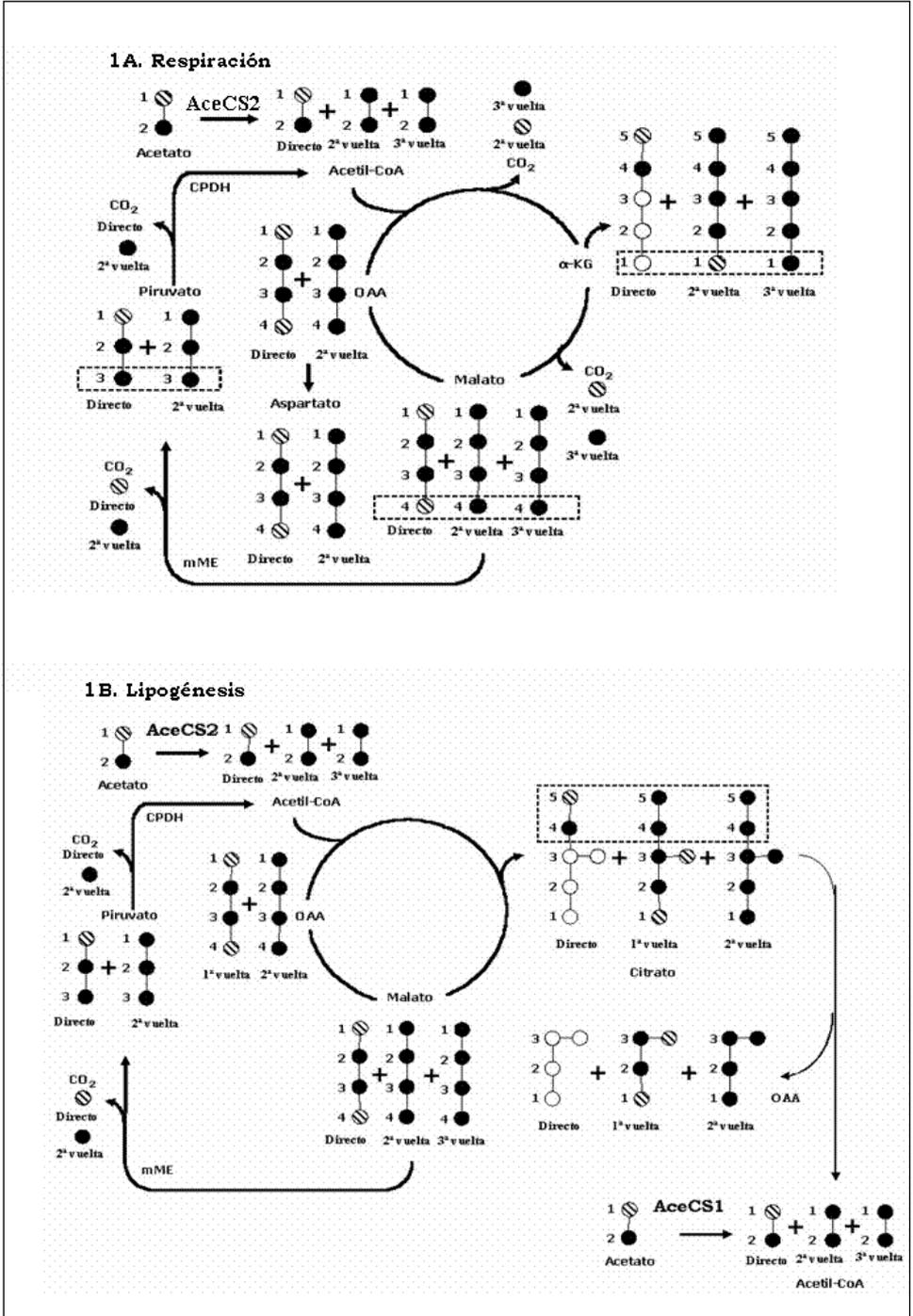


Figura 1. Destino de los carbonos marcados a partir de acetato en neuronas.

destino de los carbonos marcados a partir de acetato para la síntesis de glutamato, aspartato y citrato. En la tabla 1 se indica la utilización del acetato por parte de las neuronas tanto para la respiración como para la lipogénesis.

En la figura 1 aparecen los diferentes isotopómeros de cada uno de los principales sustratos que se pueden producir a partir de [U-<sup>14</sup>C]-acetato vía acetil-CoA sintetasa (AceCS) en sus isoformas mitocondrial (AceCS2) (EC 6.2.1.1) y citosólica (AceCS) (EC 6.2.1.13) **A.** Se resaltan las descarboxilaciones de los carbonos 1 (<sup>14</sup>C1) por acción de la enzima málica (mME) y el complejo piruvato deshidrogenasa (CPDH) en la primera vuelta en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA) y en la segunda vuelta a través del TCA. Los carbonos 2 (<sup>14</sup>C2) se descarboxilan por acción de la enzima málica (mME) y el complejo piruvato deshidrogenasa (CPDH) después de la segunda vuelta y a través del TCA en la tercera vuelta. Nótese que los isotopómeros de aspartato, glutamato y GABA quedan más marcados con <sup>14</sup>C2, lo que disminuiría la posibilidad de ser detectados como CO<sub>2</sub> o como lípidos. **B.** Se resalta la contribución de los isotopómeros de citrato, nótese que quedan más marcados con <sup>14</sup>C2, lo que aumentaría la posibilidad de tener acetil-CoA marcado en el citosol, como precursor de lípidos.

Se observó que la velocidad de oxidación de [U-<sup>14</sup>C]-acetato es 0.41 y 0.56 veces más baja a la del [1-<sup>14</sup>C]-acetato y la del [2-<sup>14</sup>C]-acetato respectivamente. Estas diferencias fueron significativas ( $p < 0.05$ ). El análisis de varianza no reveló diferencias significativas entre los valores de oxidación entre el [1-<sup>14</sup>C]-acetato y el [2-<sup>14</sup>C]-acetato. En cuanto a la lipogénesis, se observó que el [U-<sup>14</sup>C]-acetato es 0.78 y 0.81 veces más baja a la del [1-<sup>14</sup>C]-acetato y al [2-<sup>14</sup>C]-acetato respectivamente. Estas diferencias fueron significativas

( $p < 0.05$ ). El análisis de varianza no reveló diferencias significativas entre los valores de lipogénesis entre el [1-<sup>14</sup>C]-acetato y el [2-<sup>14</sup>C]-acetato.

Es evidente que las neuronas utilizan más el acetato para respiración que para lipogénesis (véase tabla 1), indicando la existencia de la AceCS2, y que el [1-<sup>14</sup>C]-acetato y el [2-<sup>14</sup>C]-acetato, tienen la misma capacidad oxidativa y lipogénica. Adicionalmente, cuando se incubaba con [U-<sup>14</sup>C]-acetato hay una mayor probabilidad de “perder” carbonos marcados vía glutamato que cuando se incubaba con acetato marcado en <sup>14</sup>C1 o en <sup>14</sup>C2, por lo cual la respiración con [U-<sup>14</sup>C]-acetato, es menor comparada con los datos obtenidos para [1-<sup>14</sup>C]-acetato y [2-<sup>14</sup>C]-acetato.

La lipogénesis se ve incrementada cuando se utiliza [1-<sup>14</sup>C]-acetato y [2-<sup>14</sup>C]-acetato demostrando que existe una pérdida significativa de carbonos para la síntesis de glutamato cuando se utiliza [U-<sup>14</sup>C]-acetato. No obstante, al utilizar [U-<sup>14</sup>C]-acetato debería existir una mayor probabilidad de que estos carbonos puedan salir de la mitocondria vía citrato o vía NAA contribuyendo de una forma significativa para la síntesis de lípidos en el citosol. Los resultados revelan que cuando se utiliza <sup>14</sup>C1 ó <sup>14</sup>C2 es evidente una menor pérdida de carbonos vía glutamato y que la síntesis de lípidos estaría soportada, en principio por la ruta del citrato y la actividad de la AceCS2, siendo esta última una ruta lipogénica importante durante el desarrollo de las neuronas.

#### **Efecto de diferentes inhibidores sobre la capacidad de utilización de [U-<sup>14</sup>C]-acetato, [1-<sup>14</sup>C]-acetato y [2-<sup>14</sup>C]-acetato por las neuronas**

En la tabla 1 se presentan los resultados de las velocidades de respiración y lipogénesis de la incubación de neuronas con [U-<sup>14</sup>C]-

Tabla 1

Velocidades de respiración y lipogénesis obtenidas a partir de la incubación con [U-<sup>14</sup>C]-acetato, [1-<sup>14</sup>C]-acetato y [2-<sup>14</sup>C]-acetato en neuronas quiescentes procedentes de cultivo primario, en ausencia y presencia de inhibidor. DCA (dicloroacetato); AOA (aminoxiacetato);  $\alpha$ -CN ( $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinnamato); BM (butilmalonato); BT (1,2,3-benceno tricarboxilato)

RESPIRACIÓN (nmol de carbonos incorporados a CO <sub>2</sub> /h/10 <sup>6</sup> células)						
Sustrato	Sin inhibidor	+ $\alpha$ - CN	+DCA	+AOA	+BM	+BT
[U- <sup>14</sup> C]-acetato	1.78 $\pm$ 0.24	1.64 $\pm$ 0.23	2.28 $\pm$ 0.35	2.66 $\pm$ 0.36	1.73 $\pm$ 0.25	1.13 $\pm$ 0.20
[1- <sup>14</sup> C]-acetato	2.52 $\pm$ 0.31	2.29 $\pm$ 0.43	5.56 $\pm$ 0.44	3.42 $\pm$ 0.33	4.43 $\pm$ 0.68	2.55 $\pm$ 0.43
[2- <sup>14</sup> C]-acetato	2.79 $\pm$ 0.47	1.66 $\pm$ 0.20	1.89 $\pm$ 0.15	1.30 $\pm$ 0.23	2.25 $\pm$ 0.39	1.22 $\pm$ 0.20

LIPOGÉNESIS (nmol de carbonos incorporados a lípidos/h/10 <sup>6</sup> células)						
Sustrato	Sin inhibidor	+ $\alpha$ - CN	+DCA	+AOA	+BM	+BT
[U- <sup>14</sup> C]-acetato	0.47 $\pm$ 0.06	0.57 $\pm$ 0.06	0.71 $\pm$ 0.06	0.54 $\pm$ 0.07	0.82 $\pm$ 0.10	0.35 $\pm$ 0.05
[1- <sup>14</sup> C]-acetato	0.84 $\pm$ 0.14	0.79 $\pm$ 0.13	1.36 $\pm$ 0.13	1.16 $\pm$ 0.12	0.77 $\pm$ 0.10	0.84 $\pm$ 0.13
[2- <sup>14</sup> C]-acetato	0.85 $\pm$ 0.09	1.12 $\pm$ 0.15	0.81 $\pm$ 0.11	0.70 $\pm$ 0.10	1.07 $\pm$ 0.12	0.41 $\pm$ 0.05

\* Diferencias significativas (p<0.05) con respecto al tratamiento sin inhibidor.

acetato, [1-<sup>14</sup>C]-acetato y [2-<sup>14</sup>C]-acetato, sin y con los diferentes inhibidores.

El  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinnamato ( $\alpha$ -CN) ha sido reportado como un inhibidor específico de transportadores de monocarboxila-

tos. Al comparar los resultados sin y con  $\alpha$ -CN de los tres radioisótopos se encontró una disminución en la respiración de las neuronas. Sin embargo, sólo al utilizar el  $\alpha$ -CN con [2-<sup>14</sup>C]-acetato hay una disminución significativa (p<0.05).

En cuanto al efecto del  $\alpha$ -CN en los cultivos primarios de neuronas incubados con [U- $^{14}$ C]-acetato y [1- $^{14}$ C]-acetato se observó una disminución en la respiración; sin embargo, no se encontraron diferencias en la respiración con respecto al sustrato sin inhibidor. Estos resultados indican que el  $\alpha$ -CN a la concentración que se trabajó (2 mM) no tuvo un efecto tóxico, las neuronas mantuvieron su actividad respiratoria y lipogénica. No obstante, cuando se comparan los resultados de las incubaciones con [2- $^{14}$ C]-acetato sin y con inhibidor, se presentó una disminución de 0.68 veces con el  $\alpha$ -CN, esta diferencia fue significativa ( $p < 0.05$ ). Este resultado manifiesta un efecto sobre el transportador de monocarboxilatos a nivel mitocondrial que se evidencia en el incremento en la lipogénesis cuando se usa el inhibidor.

Teniendo en cuenta que no se observó una variación significativa en las velocidades de respiración con o sin este inhibidor, es evidente entonces que el  $\alpha$ -CN no actúa sobre el transportador de acetato a nivel de la membrana plasmática, esta observación es apoyada por los resultados reportados en incubaciones similares realizados con sinaptosomas en donde no se observaron diferencias en la absorción del acetato marcado con o sin  $\alpha$ -CN (Waniewski y Martin, 1998).

De otra parte, el  $\alpha$ -CN tuvo un efecto en cuanto al transporte de monocarboxilatos a nivel de membrana mitocondrial, que se evidencia en una disminución en la respiración cuando se usó [1- $^{14}$ C]-acetato en presencia de  $\alpha$ -CN (2 mM). Estos resultados coinciden con experimentos hechos en sinaptosomas que fueron incubados con [1- $^{14}$ C]-acetato en presencia de  $\alpha$ -CN (10 mM), que presentaron una disminución significativa en cuanto a la producción de  $\text{CO}_2$ , indicando una inhibición selectiva del transporte de monocarboxilatos a nivel mitocondrial (Waniewski y Martin, 1998).

Como se observó un mantenimiento en la velocidad de respiración, indica que en estas circunstancias, la AceCS2 activa su función anaplerótica, asegurando el mantenimiento del reservorio de acetyl-CoA. La lipogénesis con [U- $^{14}$ C]-acetato aumentó 0.21 veces con respecto al mismo sustrato sin  $\alpha$ -CN. Con [2- $^{14}$ C]-acetato se presentó un aumento de 0.31 veces con respecto al mismo sustrato sin el inhibidor. Estas diferencias alcanzaron a ser significativas ( $p < 0.05$ ). Con [1- $^{14}$ C]-acetato no se encontraron diferencias significativas con respecto al sustrato sin inhibidor. El efecto inhibitorio del  $\alpha$ -CN en el transporte de monocarboxilatos en la membrana mitocondrial de neuronas, se evidencia de igual manera en cuanto a la incorporación en lípidos, ya que el transporte de acetato citosólico hacia la mitocondria es parcialmente inhibido, y en consecuencia se activa la ruta de síntesis de acetyl CoA vía AceCS1, presentándose un aumento significativo en la síntesis de lípidos. El aumento significativo en la lipogénesis, se presenta además, porque al bloquear la entrada de piruvato endógeno a la mitocondria se facilita la síntesis de acetyl-CoA marcado proveniente del acetato marcado vía AceCS2 y vía enzima málica mitocondrial (mME), aumentando así la síntesis de citrato, especialmente del marcado en  $^{14}\text{C}_2$ , para la lipogénesis (véase figura 1).

Por otro lado, se utilizó dicloroacetato (DCA) que es un inhibidor de la piruvato deshidrogenasa quinasa la cual cataliza la fosforilación de la piruvato deshidrogenasa (E1) del complejo piruvato deshidrogenasa (CPDH), al no poder fosforilar esta enzima el efecto neto es una activación del complejo y en consecuencia, se activa el paso de piruvato a acetyl CoA. En cuanto al efecto del DCA en la respiración de las neuronas incubadas con [U- $^{14}$ C]-acetato y [1- $^{14}$ C]-acetato se encontró un aumento de 0.28 y 1.20 veces respectivamente con respecto al sustrato sin

inhibidor, estas diferencias fueron significativas ( $p < 0.05$ ). Cuando las neuronas fueron incubadas con  $[2-^{14}\text{C}]$ -acetato, se encontró una disminución en la respiración de 0.48 veces con respecto al sustrato sin inhibidor, el análisis de varianza reveló diferencias significativas entre estos valores ( $p < 0.05$ ). Teniendo en cuenta que el sustrato que se les está adicionando al cultivo durante la incubación es acetato, y el metabolismo de éste no es afectado directamente por el aumento de la actividad del CPDH, es posible pensar que exista una ruta que aumente el reservorio de piruvato marcado a partir de acetato.

La producción de piruvato neuronal es altamente activa, dando cuenta de aproximadamente una tercera parte del metabolismo oxidativo del piruvato *in vitro* (Hassel y Brathe, 2000). Esta producción es posible vía enzima málica (mME) (EC 1.1.1.40), que oxida el malato mitocondrial en piruvato (Bakken, *et al.*, 1997; Vogel, *et al.*, 1998a; Vogel, *et al.*, 1998b; Hassel, 2000). Adicionalmente, se ha demostrado que en cerebro inmaduro aumenta el metabolismo del piruvato (Miller, *et al.*, 1990).

Los resultados evidencian la producción de piruvato vía enzima málica ya que la oxidación aumenta debido al incremento de la actividad del CPDH, que favorece el paso de piruvato a acetil-CoA. La activación de la enzima málica, genera una mayor producción de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir de los carbonos  $^{14}\text{C}_1$  del malato (vía mME) y del piruvato (vía CPDH), que se evidencia en el aumento significativo de la respiración con  $[1-^{14}\text{C}]$ -acetato.

La disminución que se presenta en la respiración con  $[2-^{14}\text{C}]$ -acetato se debe posiblemente a dos factores: los  $^{14}\text{C}_2$  se descarboxilan a partir de la segunda vuelta en el TCA por lo que hay una menor cantidad de

$^{14}\text{C}_2$  desprendidos vía enzima málica y CPDH o, se puede presentar que con el transcurso del tiempo se acumule acetil-CoA que podría inhibir el TCA si no hay suficiente oxalacetato para mantener la respiración, ya que parte de este oxalacetato puede irse para la síntesis de aspartato. Adicionalmente, el TCA, se controla entre otros aspectos por la inhibición por productos, como el acetil-CoA y el NADH, que serían producidos por la oxidación del piruvato inhibiendo al complejo enzimático. Entonces, es posible que por esta inhibición, se presenten menos desprendimientos de  $^{14}\text{CO}_2$  por unidad de tiempo, y los carbonos que se ven afectados en este caso son los carbonos  $^{14}\text{C}_2$  que son los que tienen mayor probabilidad de marcar los intermediarios del TCA. La lipogénesis con  $[U-^{14}\text{C}]$ -acetato y  $[1-^{14}\text{C}]$ -acetato aumentó de 0.51 y 0.62 veces respectivamente, con respecto al mismo sustrato sin inhibidor, el análisis de varianza revela diferencias significativas entre estos valores ( $p < 0.05$ ). Con  $[2-^{14}\text{C}]$ -acetato no se encontró diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en la lipogénesis con respecto al sustrato sin DCA. La lipogénesis aumenta con  $[U-^{14}\text{C}]$ -acetato y  $[1-^{14}\text{C}]$ -acetato debido al aumento en la actividad del CPDH, que incrementaría la cantidad de citrato marcado que sale de la mitocondria para la síntesis de lípidos. La síntesis de glicerol-3-fosfato (Gli-3-P) producto del citrato proveniente de la mitocondria podría aumentar favoreciendo la lipogénesis. El mantenimiento en la lipogénesis cuando se incubaba con  $[2-^{14}\text{C}]$ -acetato, asumiendo que se disminuye la salida de citrato marcado en  $\text{C}_2$ , estaría soportada por la AceCS1 y confirmaría los resultados obtenidos con  $\alpha$ -CN.

Otro inhibidor usado fue el aminooxiacetato (AOA), el cual es un inhibidor específico de las enzimas piridoxal-fosfato dependientes en el cerebro tales como, la alanina aminotransferasa, la glutamato descarboxilada y la GABA-  $\alpha$ -cetogluta-

rato transaminasa (Flint, *et al.*, 1991). Así, en corazón, hígado y cerebro, el inhibidor actúa también sobre la aspartato aminotransferasa tanto en el citosol como en el compartimento mitocondrial. La aspartato aminotransferasa es un componente esencial de la lanzadera malato-aspartato la cual es el principal intermediario del transporte de electrones del NADH citosólico hacia el interior de la mitocondria. El AOA impide el paso de oxalacetato (OAA) a aspartato con lo cual aumenta el reservorio de OAA en la célula, y en consecuencia se evita la disminución de este sustrato limitante del TCA, se esperaría un aumento en la velocidad de respiración de las células y el consecuente aumento de citrato para la síntesis de lípidos. En cuanto al efecto del AOA en la respiración de cultivos primarios de neuronas incubados con [U-<sup>14</sup>C]-acetato y [1-<sup>14</sup>C]-acetato se encontró un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) de 0.49 y 0.36 veces respectivamente con respecto al sustrato sin inhibidor. El efecto neto inmediato de la adición de AOA en los cultivos primarios de neuronas, es un aumento en los reservorios de OAA y de acetil-CoA que se presenta al inhibir la lanzadera aspartato/malato evitando la síntesis de NAA. El aumento en estos reservorios hace que se presente un aumento en la velocidad del TCA, al igual que en la síntesis de citrato, debido a esto se presenta un aumento en la respiración con [U-<sup>14</sup>C]-acetato y con [1-<sup>14</sup>C]-acetato. Este último resultado sustenta una alta actividad de la enzima málica para mantener los reservorios de piruvato, indispensables para la respiración ya que se obtiene un aumento significativo en las descarboxilaciones con <sup>14</sup>C1. Al comparar el efecto sin y con AOA, las incubaciones con [2-<sup>14</sup>C]-acetato presentaron una disminución en la respiración de 1.14 veces, siendo significativa esta diferencia ( $p < 0.05$ ), posiblemente debida a la mayor probabilidad de perder <sup>14</sup>C2 para la síntesis de glutamato a partir

de  $\alpha$ -KG vía glutamato deshidrogenasa que se activaría en estas circunstancias experimentales. La lipogénesis con [U-<sup>14</sup>C]-acetato y con [1-<sup>14</sup>C]-acetato aumentaron 0.15 y 0.38 veces respectivamente en relación al mismo sustrato sin inhibidor, estos incrementos fueron significativos ( $p < 0.05$ ), y se explican si se tiene en cuenta un aumento en la síntesis de citrato, debido al aumento en la velocidad del TCA; adicionalmente es posible ver el efecto de la acetil-CoA-sintetasa citosólica (AceCS1) en la síntesis de acetil-CoA que será usado para la síntesis de lípidos, puesto que esta ruta podría verse favorecida si se tiene en cuenta que el reservorio de acetil-CoA mitocondrial se encuentra aumentado con este inhibidor. Por otro lado, con [2-<sup>14</sup>C]-acetato la lipogénesis disminuyó significativamente 0.21 veces, con respecto al mismo sustrato sin inhibidor, esta disminución se puede explicar si se tiene en cuenta la mayor probabilidad que existe de perder <sup>14</sup>C2, para la síntesis de glutamato al activarse la glutamato deshidrogenasa (véase figura 1). Estos resultados están señalando la poca importancia de la ruta del NAA como precursor lipogénico en las neuronas en desarrollo, como ha sido propuesto en trabajos previos con lactato (Tovar *et al.*, 2005; Tovar *et al.*, 2001; Tovar, 1995).

Un inhibidor adicional fue el butilmalonato (BM), el cual actúa a nivel de los transportadores de dicarboxilatos como malato,  $\alpha$ -KG y NAA, además, inhibe el transporte del citrato aunque no específicamente (Palmieri, *et al.*, 1972; Meijer y Van Dam, 1974). En cuanto al efecto del BM en los cultivos primarios de neuronas incubados con [U-<sup>14</sup>C]-acetato no se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en la velocidad de respiración con respecto al sustrato sin inhibidor. El efecto inmediato de la adición de BM en los cultivos primarios de neuronas, es un aumento en el reservorio de oxalacetato (OAA), el cual se presenta

debido al aumento en los reservorios de malato y á-cetoglutarato, la acumulación de NAA y algo de citrato en la mitocondria. El aumento en el reservorio de OAA, trae como consecuencia un aumento en la velocidad del TCA, y un aumento en la síntesis de citrato. Al inhibir el transporte de NAA, se presentaría un aumento en el reservorio de acetil-CoA, el cual favorecería el aumento en la respiración, posiblemente por inhibición de la síntesis de NAA al no poder ser exportado al citosol. En cuanto al efecto del BM en las neuronas incubadas con [1-<sup>14</sup>C]-acetato se encontró un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) en la velocidad de respiración de 0.76 veces con respecto al sustrato sin inhibidor. Cuando las neuronas fueron incubadas con [2-<sup>14</sup>C]-acetato, se encontró una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) en la velocidad de respiración de 0.24 veces con respecto al sustrato sin inhibidor. Los resultados en respiración con [1-<sup>14</sup>C]-acetato, indican de nuevo la importancia de la carboxilación del piruvato, vía enzima málica, ya que se obtiene un aumento muy significativo en las descarboxilaciones con <sup>14</sup>C1. La disminución en la respiración a partir de [2-<sup>14</sup>C]-acetato es explicable si se tiene en cuenta la fuga de carbonos <sup>14</sup>C2 que se van para la síntesis de glutamato a partir de  $\alpha$ -KG vía glutamato deshidrogenasa que se activaría en estas circunstancias experimentales. La lipogénesis con [U-<sup>14</sup>C]-acetato y [2-<sup>14</sup>C]-acetato aumentaron significativamente ( $p < 0.05$ ) en 0.74 y 0.25 veces, respectivamente en relación al mismo sustrato sin BM. Con [1-<sup>14</sup>C]-acetato la lipogénesis no mostró diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto al mismo sustrato sin inhibidor.

Con la adición de BM la ruta lipogénica del NAA se encuentra inhibida y el transporte de citrato de la mitocondria al citosol puede estar restringido hasta en un 54% (Palmieri, *et al.*, 1972; Meijer y Van Dam, 1974), con lo cual es evidente la activación de otra ruta lipogénica desde acetato

para la síntesis de acetil-CoA vía AceCS1. En este caso la lipogénesis que se observa sería por la contribución del citrato que alcanza a salir y del acetato metabolizado vía AceSC1. Los resultados indican la importancia de esta última ruta lipogénica en las neuronas.

Se incubó también en presencia de 1,2,3-bencenotricarboxilato (BT), que es un inhibidor del transporte de tricarboxilatos. Inhibe el transporte de citrato e isocitrato a nivel de membrana mitocondrial. En cuanto al efecto del BT en los cultivos primarios de neuronas incubados con [U-<sup>14</sup>C]-acetato y [2-<sup>14</sup>C]-acetato se encontró una disminución en la velocidad de respiración de 0.57 y 1.28 veces respectivamente en relación al mismo sustrato sin inhibidor, estos resultados muestran diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Con [1-<sup>14</sup>C]-acetato no se encontraron diferencias significativas en la respiración con respecto al sustrato sin inhibidor. La salida de citrato e isocitrato de la mitocondria se bloquea con este inhibidor, por lo tanto, hay un aumento en la concentración de los productos del TCA, lo cual indica un elevado estado energético de la célula, y por tanto, menos necesidad de producción de energía y en consecuencia una disminución en la velocidad de respiración en los experimentos realizados con acetato. Los resultados en respiración con [1-<sup>14</sup>C]-acetato, ratifican de nuevo la importancia de la carboxilación del piruvato, vía enzima málica, ya que se mantienen las descarboxilaciones con <sup>14</sup>C1, aún cuando la velocidad del ciclo esté disminuida. La disminución en la respiración y en la lipogénesis a partir de [2-<sup>14</sup>C]-acetato es explicable si se tiene en cuenta la fuga de carbonos <sup>14</sup>C2 que se van para la síntesis de glutamato o aspartato, la cual se favorecería por la acumulación de citrato precursor del  $\alpha$ -cetoglutarato, o por la acumulación de OAA precursor de aspar-

tato. La lipogénesis con [U-<sup>14</sup>C]-acetato y [2-<sup>14</sup>C]-acetato disminuyó 0.34 y 1.07 veces con respecto al mismo sustrato sin BT; el análisis de varianza revela diferencias significativas entre estos valores ( $p < 0.05$ ). En cuanto al efecto del BT en la lipogénesis de cultivos primarios de neuronas incubados con [1-<sup>14</sup>C]-acetato no se encontraron diferencias significativas con respecto al sustrato sin inhibidor ( $p < 0.05$ ).

La ruta lipogénica a partir de citrato se encuentra bloqueada con la adición del BT. Los resultados demuestran la actividad de la AceCS1 en la utilización del acetato citosólico y su posterior conversión en acetil-CoA para la síntesis de lípidos. Como el inhibidor también disminuye la salida de isocitrato, el efecto en el citosol es una disminución de los NADPH vía deshidrogenasa-NADP dependiente, que se necesitarían para la síntesis de lípidos, lo cual indica la importancia de esta ruta para la lipogénesis en las neuronas en desarrollo. De estos resultados se puede deducir que la síntesis de lípidos desde acetato en las neuronas en desarrollo, obedecería a una contribución de dos rutas importantes; la ruta del citrato y la ruta vía AceSC1.

## CONCLUSIONES

Las neuronas pueden metabolizar acetato como sustrato oxidativo y lipogénico en el modelo de rata, lo que permite pensar que este sustrato puede llegar a ser importante para ayudar a mantener estas dos actividades metabólicas en la prelactancia del ser humano, posiblemente ayudando al reciclaje de carbonos, indispensable para mantener la síntesis de neurotransmisores y la lipogénesis.

La utilización de [U-<sup>14</sup>C]-acetato y [2-<sup>14</sup>C] confirma que en las neuronas es prioritario la síntesis de neurotransmisores, ya que se

demuestra un gran escape de carbonos del ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA), como oxalacetato para la síntesis de aspartato (precursor de NAA y NAAG) y  $\alpha$ -cetoglutaratato para la síntesis de glutamato (precursor de GABA y NAAG).

Se evidenció una alta actividad anaplerótica al utilizar [1-<sup>14</sup>C]-acetato, sobre todo cuando las neuronas requieren mantener los reservorios de oxalacetato y acetil-CoA para mantener la respiración. Estos resultados señalan a la acetil-CoA sintetasa (AceCS2) y la enzima málica (mME) mitocondriales, como enzimas claves para mantener el funcionamiento de las neuronas.

A pesar de que los resultados indican que en las neuronas hay actividad de la ATP-citrato liasa que posiblemente es la ruta más importante para la síntesis de lípidos, también se detecta una contribución importante para la lipogénesis a partir de la acetil-CoA sintetasa citosólica (AceCS1).

Los resultados indican que la lanzadera del N-acetil-L-aspartato (NAA), no es una ruta lipogénica importante durante esta etapa del desarrollo de las neuronas, posiblemente porque el aminoácido estaría siendo utilizado para la síntesis de NAAG.

Se confirma que la lanzadera del aspartato/malato es la principal ruta para la síntesis de glutamato en las neuronas, y que la inhibición de esta ruta posiblemente activa la glutamato deshidrogenasa para mantener los requerimientos de glutamato de la célula.

Con el uso del acetato se abre todo un abanico de posibilidades metabólicas de importancia radical en el reciclaje del mismo a partir de neurotransmisores como acetilcolina, neuromoduladores como el N-acetil-aspartil-glutamato (NAAG) y aminoácidos como el N-acetil aspartato (NAA) de los cuales no se conoce mucho a cerca

de su papel en el desarrollo del sistema nervioso.

### AGRADECIMIENTOS

A COLCIENCIAS y a la Pontificia Universidad Javeriana por la financiación parcial de este trabajo que es parte del proyecto: Estudio de la compartimentación intra e intercelular del acetato en neuronas y astrocitos en cultivo primario, código: 1203-05-10121.

### LITERATURA CITADA

- ALBARRACÍN, S. y TOVAR, J. 2002. Metabolismo del [U-<sup>14</sup>C]-acetato y del [2-<sup>14</sup>C]-acetato en astrocitos y astrocitoma C6. *Biomédica* 22 (Suplemento 1): 72.
- BAKKEN, I.; JOHNSEN, S.; WHITE, L.; UNSGARD, G.; AASLY, J. y SONNEWALD, U. 1997. NMR spectroscopy study of the effect of 3-nitropropionic acid on glutamate metabolism in cultured astrocytes. *J Neurosci Res* 47 (6): 642-649.
- BOLAÑOS, J. y MEDINA, JM. 1992. Evidence of stimulation of the  $\gamma$ -aminobutyric acid shunt by valproate and E - $\Delta^2$ -valproate in neonatal rat brain. *Mol Pharmacol* 43: 487-490.
- COHEN, J. 1995. Neural cell culture. A practical approach. IRL press at Oxford University Press. London, England, 248 p.
- EDMOND, E.; ROBBINS, R.; BERGSTROM, J.; COLE, R. y DE VELLIS, J. 1987. Capacity for substrate utilization in oxidative metabolism by neurons, astrocytes and oligodendrocytes from developing brain in primary culture. *J Neurosci Res* 18 (4): 551-561.
- ELLIOTT, K. 1969. The use of brain slices. In: *Handbook of neurochemistry*. A. Lajtha Ed. New York, NY. Plenum Press, 2: 103-115.
- FLINT, M.; SWARTZ, K.; HYMAN, B.; STOREY, E.; FINN, S. y KOROSHETZ, W. 1991. Aminoxyacetic acid results in excitotoxic lesions by a novel indirect mechanism. *J Neurochem* 57: 1068-1073.
- FOLCH, J.; LEES, M. y SLONE, G. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497-509.
- HASSEL, B. y BRATHE, A. 2000a. Neuronal piruvate carboxylation supports formation of transmitter glutamate. *Neurosci* 20: 1342-1347.
- HASSEL, B. 2000b. Carboxylation and anaplerosis in neurons and glia. *Neurobiol* 22: 21-40.
- KIMELBERG, H. 1983. Primary astrocyte cultures - A key to astrocyte function. *Cell Molec Neurobiol* 3 (1): 1-16.
- MEIJER, A. y VAN DAM, K. 1974. The metabolic significance of anion transport in mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 346: 213-244.
- MILLER, A.; HATCH, J. y PRIHODA, T. 1990. Dichloroacetate increase glucose use and decreases lactate in developing rat brain. *Metab Brain Dis* 5: 195-204.
- PALMIERI, F.; STIPANI, I. y QUAGLIARIELLO, E. 1972. Kinetic study of the tricarboxylate carrier in rat liver mitochondria. *Eur J Biochem* 26: 587-594.
- ROSE, S. y SINHA, A. 1969. Some properties of isolated neuronal cell fractions. *J Neurochem* 16: 1319-1328.
- SANETO, R. y DE VELLIS, J. 1987. Neuronal and glial cells: Cell culture of the central nervous system. *Neurochemistry a Practical Approach*. A.J. Turner & H.S. Bachelard Ed. IRL Press 27-64.
- SYKES, J.; LÓPEZ-CARDOSO, M. y VAN DEN BERGH, S. 1986. Substrate utilization for energy production and lipid syn-

thesis in oligodendrocyte-enriched cultures prepared from rat brain. *Neurochem Int* 8: 67-75.

TABERNERO, A.; BOLAÑOS, J. y MEDINA, J. 1993. Lipogenesis from lactate in rat neurons and astrocytes in primary culture. *Biochem J* 294: 635-638.

TOVAR, J. 1995. *Compartimentación celular del metabolismo del lactato en neuronas y astrocitos en cultivo primario*. Tesis doctoral. Facultad de Farmacia. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Salamanca. Salamanca, España, 210 p.

TOVAR, J.; ALBARRACÍN, S. y LAREO, L. 2001. Predicción de la estructura y características bioquímicas del acetato tioquinasa. *Universitas Scientiarum* 6 (2): 27-34.

TOVAR, J.; SAAVEDRA, F y BRYÓN, A. 2005. Metabolismo cerebral. En: *Neuroanestesia. Enfoque perioperatorio en el paciente neurológico*. Eds. Niño, C. y

Ferrer, L. Distribuna Editorial Médica. Distribuna Ltda. 33-88.

VOGEL, R.; HAMPRECHT, B. y WIESINGER, H. 1998a. Malic enzyme isoforms in astrocytes: comparative study on activities in rat brain tissue and astroglia-rich primary cultures. *Neurosci Letters* 247:123-126.

VOGEL, R.; JENNEMANN, G.; SEITZ, J.; WIESINGER, H. y HAMPRECHT. 1998b. Mitochondrial malic enzyme: purification from bovine brain, generation of an antiserum, and immunocytochemical localization in neurons of rat brain. *J Neurochem* 71: 844-852.

WANIEWSKI, R. y MARTIN, D. 1998. Preferential utilization of acetate by astrocytes is attributable to transport. *J Neurosci* 14: 5225-5233.

Recibido: 23.05.2005

Aceptado: 14.03.2006