

---

## COMPARTIMENTACIÓN INTERCELULAR DEL ACETATO EN NEURONAS Y ASTROCITOS DURANTE LA PRELACTANCIA

J. Tovar-Franco, F. Saavedra

*Departamento de Nutrición y Bioquímica. Laboratorio de Neurobioquímica  
Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Cra. 7ª N° 43-82. Bogotá, Colombia  
jatovar@javeriana.edu.co*

### RESUMEN

Durante el período perinatal el cerebro utiliza sustratos alternativos a la glucosa para mantener su desarrollo, pues en este momento sus niveles están disminuidos. El acetato es metabolizado por las neuronas y los astrocitos durante la prelactancia. La utilización del acetato por estas células puede verse mejorada por las reacciones fijadoras de CO<sub>2</sub>, algunas de las cuales participan en el mantenimiento de los intermediarios del TCA, que son reducidos por la producción y liberación de aminoácidos, suministrando los recursos para la producción de energía y sustratos que son compartimentados intercelularmente.

Se estudió el efecto de la fijación de CO<sub>2</sub> en procesos metabólicos intercelulares donde está involucrado el acetato. En incubaciones con neuronas y astrocitos de 7 y 14 días de cultivo, utilizando acetato (5 mM) y [<sup>14</sup>C]-bicarbonato de sodio (10 μCi) (500-1000 dpm/nmol), se determinó la incorporación en metabolitos marcados en células y en sustratos estables liberados al medio. Adicionalmente, se realizaron experimentos similares utilizando inhibidores como el aminoacetoacetato (AOA), dicloroacetato (DCA), α-ciano-4-hidroxicinnamato (α-CN), butilmalonato (BM) y bencenotricarboxilato (BT), cuantificando por cromatografía de capa delgada la concentración en el medio de incubación de alanina, aspartato, glutamato y glutamina.

Los resultados indican que las neuronas tienen una menor capacidad para fijar carbonos en estructuras celulares, durante la prelactancia, pero utilizan mejor el acetato vía acetil-CoA mitocondrial (AceCS2) para la producción de energía y aminoácidos. En los astrocitos, estas reacciones favorecen la utilización del acetato vía citrato liasa y Acetil-CoA citosólica (AceCS1) para la producción de estructuras y sustratos utilizados por las neuronas, que para la producción de aminoácidos.

**Palabras clave:** AceCS1, AceCS2, aminoácidos, astrocito, fijación de CO<sub>2</sub>, neurona, prelactancia.

### ABSTRACT

The brain uses alternative substrates to glucose to maintain its development during the perinatal period, at which stage levels of glucose are diminished. Acetate is metabolized in neurons and astrocytes during the presuckling period. Acetate use by these cells can be improved by the CO<sub>2</sub> fixation support. Some of these cells participate in maintaining adequate levels of the TCA intermediates, which are being reduced

by the production and liberation of aminoacids. The CO<sub>2</sub> fixation help supply the necessary resources for energy production, and substrates for intercellular distribution.

The effect of CO<sub>2</sub> fixation upon intercellular metabolic processes which involved acetate was studied. Seven and fourteen-day astrocytes cultures were incubated with acetate (5 mM) and [<sup>14</sup>C]-sodium bicarbonate (10 μCi)(500-1000 dpm/nmol). Assimilation of labeled metabolites into cell structures and substrates released into the media was determined. Similar experiments were carried out stable using enzyme inhibitors such as aminoxyacetate (AOA), dichloroacetate (DCA); and transport inhibitors such α-cyano-4-hydroxycinnamate (α-CN), butylmalonate (BM) and 1,2,3-benzenetricarboxylate (BT). The amounts of alanine, aspartate, glutamate and glutamine present in the media were quantified by thin layer chromatography.

The results demonstrate that neurons during before the presuckling period have a lower capacity to fix carbon via into their structures than the astrocytes. However, they make better use of acetate via (by mean of) the mitochondrial enzyme acetyl CoA synthetase for the production of energy and aminoacids. In the astrocytes, these reactions favor acetate use by citrate lyase and cytosolic acetylCoA synthase for the production of structures and substates used by, the neurons, rather than for amino acid production.

**Key words:** AceCS1, AceCS2, aminoacids, astrocyte, CO<sub>2</sub> fixation, neuron, presuckling.

---

## INTRODUCCIÓN

Un gran número de datos experimentales obtenidos, tanto *in vivo* como *in vitro*, sugieren que existe cierta especialización en el uso de sustratos entre las neuronas y la glía y que la compartimentación de sustratos metabólicos no sólo se da a nivel subcelular, sino también, entre los diferentes tipos de células que conforman el cerebro, como una forma de colaboración metabólica para sostener los gastos energéticos de células tan importantes como las neuronas, las cuales están involucradas en la liberación de neurotransmisores estimulando el constante intercambio de sustratos con los astrocitos. Entre los sustratos que son liberados por los astrocitos y que pueden ser recaptados por las neuronas se encuentran principalmente el lactato, glutamina, alanina, glutamato, aspartato entre otros (Zwingmann y Leibfritz, 2003). Además de la actividad del ciclo glutamina/glutamato entre neuronas y astrocitos se ha reportado la actividad de otros ciclos; como el del lactato/alanina, leucina/α-cetoisocaproato (Bixel y Hamprecht, 2000; Hutson *et al.*, 2001; Yudkoff *et al.*, 1996; McKenna *et al.*, 1998; Gamberino *et al.*, 1997) y glutatión (Dringen *et al.*, 2000), los cuales involucran

la pérdida de intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA). Una consecuencia importante de formación rápida y amplia de aminoácidos en el cerebro es la necesidad de rellenar los depósitos de intermediarios del TCA, que han resultado disminuidos. El mantenimiento de los niveles de intermediarios del TCA en el cerebro se debe en gran medida a las elevadas proporciones de fijación de CO<sub>2</sub>. Dado que la fijación de CO<sub>2</sub> en el cerebro se lleva a cabo por varias enzimas, pero fundamentalmente, por la piruvato carboxilasa (Gamberino *et al.*, 1997; Hassel, 2001) y la malato deshidrogenasa-NADP dependiente (Hassel, 2000; Hassel, 2001), la fijación de CO<sub>2</sub> radiactivo puede ser utilizado como medida de la actividad de estas enzimas (Tovar, 1995). Durante el desarrollo, el cerebro humano puede utilizar sustratos diferentes a la glucosa para mantener la homeostasis energética en condiciones de deficiencia de ésta, ya que en este período las estructuras cerebrales están madurando y la división celular es muy intensa. Se ha demostrado que en el período perinatal, las neuronas y los astrocitos son capaces de utilizar el acetato como precursor oxidativo y lipogénico debido a la actividad de dos isoformas de la acetil-CoA sintetasa (mito-

condrial y citosólica) (Tovar, 2005; Barrios, 2003; Salazar, 2003; Albarracín, 2002).

De estas observaciones se puede asegurar que el acetato puede llegar a ser importante para ayudar a soportar la homeostasis energética, la lipogénesis y la síntesis de neurotransmisores en el caso de deficiencia de alguno de los sustratos principales. La utilización del acetato puede verse mejorada por el apoyo de las reacciones fijadoras de  $\text{CO}_2$  presentes en neuronas y astrocitos, colaborando de esta manera a optimizar los recursos necesarios para la producción de energía y lípidos, síntesis de neurotransmisores y sustratos que son compartimentados intercelularmente, necesarios para mantener el desarrollo del cerebro en la prelactancia.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el apoyo de las reacciones fijadoras de  $\text{CO}_2$  para la utilización del acetato en neuronas y astrocitos en condiciones perinatales y su influencia en la síntesis de neurotransmisores y sustratos compartimentados intercelularmente. Para investigar cómo es esta compartimentación se utilizaron inhibidores metabólicos como el dicloroacetato (DCA) y aminoxiacetato (AOA) e inhibidores del transporte de carbonos como el  $\alpha$ -ciano-4-hidroxycinnamato ( $\alpha$ -CN), butilmalonato (BM) y 1,2,3-bencenotricarboxilato (BT) y observar el efecto de éstos, sobre la capacidad de fijación del  $\text{H}^{14}\text{CO}_3$  en estructuras estables en las células y en la exportación extracelular de sustratos marcados como es el caso de aminoácidos tales como la alanina, glutamato, glutamina y aspartato los cuales a su vez fueron cuantificados, en cultivos primarios de neuronas y astrocitos.

Los resultados indican que las neuronas, en condiciones de prelactancia, tienen una menor capacidad de fijar carbonos a sus estructuras que los astrocitos, pero tienen una mayor posibilidad de fijar carbonos en sustratos estables liberados al medio, prin-

cipalmente aminoácidos neurotransmisores. Las reacciones fijadoras contribuyeron en las neuronas a utilizar el acetato directamente para la producción de energía y aminoácidos más que a la síntesis de lípidos. No obstante, si se presenta una deficiencia de citrato, las neuronas tienen la capacidad de activar otra ruta lipogénica a través de la acetil-CoA sintetasa. En los astrocitos, está orientada más hacia la lipogénesis, soportada por dos rutas y la producción de aminoácidos necesarios para las neuronas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Animales.** Para los experimentos se utilizaron ratas albinas Wistar. El peso promedio de las hembras fue de 230 g y su edad gestacional se controló limitándose a una noche el tiempo de cohabitación de ratas vírgenes con machos, apartándoseles en la mañana del día siguiente. El período gestacional tiene una duración de 22-23 días desde la copulación hasta el momento del parto, es usual un alargamiento abdominal que se evidencia hacia los trece días de embarazo.

**Cultivos celulares.** Los cultivos primarios de neuronas y de astrocitos, se obtuvieron a partir de cerebros de fetos de rata de 17.5 días de gestación y de neonatos de rata de 1 día respectivamente. Los cerebros se colocaron en una placa de Petri que contenía una solución de disgregación. El tejido se fraccionó utilizando un bisturí y luego se centrifugó durante 2 minutos a 1.800 rpm. Luego el tejido fraccionado se incubó en una solución de tripsinización. Posteriormente, esta suspensión se trasladó a un tubo que contenía DMEM con FBS (10%) y gentamicina (40 mg/ml) para detener la tripsinización. Luego el tejido se centrifugó a 1.800 rpm durante 5 minutos y se colocó en solución de disgregación nuevamente, esto se repitió por tres veces. Las células

obtenidas se resuspendieron en 20 ml de DMEM, suplementado con FBS (10%) y antibióticos. Una pequeña alícuota de esta suspensión celular se utilizó para la determinación de la viabilidad celular y el número de células (Tabernero, 1993). A continuación se sembraron las células en frascos Roux de 25 cm<sup>2</sup> recubiertos con poli-L-lisina y se colocaron en incubadora a 37°C con un 5% de CO<sub>2</sub> (McCarthy y De Vellis, 1980). Los cultivos primarios de neuronas dan principalmente neuronas del tipo glutamatergicas y los cultivos primarios de astrocitos dan un cocultivo de dos tipos de astrocitos, los astrocitos protoplasmáticos o tipo I y los astrocitos fibrosos o tipo II. Estos cultivos han sido caracterizados inmunocitoquímicamente contra neurofilamento en el caso de las neuronas y contra proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP) en el caso de los astrocitos (Tovar, 1995).

**Experimentos de fijación de CO<sub>2</sub>.** Para los experimentos de incubación se requirieron neuronas quiescentes de 7 días y astrocitos quiescentes de 14 días de incubación *in vitro* (DIV). En las incubaciones se usaron concentraciones saturantes de sustrato frío acetato (5 mM) según resultados previos obtenidos en el laboratorio (Albarracín, 2002; Barrios, 2003; Salazar, 2003), NaHCO<sub>3</sub> (5 mM) y NaH<sup>14</sup>CO<sub>3</sub> (10 µCi)(500-1000 dpm/nmol) (Tabernero, 1993a; Tovar, 1995). Se hicieron determinaciones cuantitativas para calcular la actividad específica (dpm/nmol). Igualmente, se prepararon soluciones con diferentes inhibidores, siguiendo el mismo procedimiento. Los inhibidores empleados fueron: α-ciano-4-cinnamato (α-CN), ácido dicloroacético (DCA) (CHCl<sub>2</sub>COOH), ácido aminoacético (AOA) (H<sub>2</sub>NCOCOOH), ácido butilmalónico (BM) [CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>.CH(COOH)<sub>2</sub>] y ácido 1,2,3 bencenotricarboxílico monohidratado (BT) (C<sub>9</sub>H<sub>6</sub>O<sub>6</sub>·H<sub>2</sub>O). Se tuvieron en cuenta las concentraciones de estos inhibidores para ajustar la osmolaridad a valores cercanos a 315 mOsm/kg H<sub>2</sub>O.

La fijación de CO<sub>2</sub> en neuronas y astrocitos en cultivo primario se realizó según el método descrito por Kaufman y Driscoll (1992), con algunas modificaciones (Tabernero, 1993; Tovar, 1995). Al finalizar la incubación, se separa el medio de las células. Las células se lavan dos veces con PBS, luego se acidifican estas dos fracciones con 100 µL de ácido perclórico (70%), con objeto de volatilizar el <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> sobrante. En cada experimento, fueron incluidos blancos de reacción. Se determinó la radiactividad incorporada en productos estables en medio ácido, tanto en las células como en el medio de incubación. Los resultados se expresan como nmoles de bicarbonato incorporado por hora por millón de células, utilizando para ello la radiactividad específica calculada con la concentración de bicarbonato en el medio y la radiactividad en 100 µL del medio sin acidificar.

#### **Experimentos de separación de aminoácidos.**

El medio de incubación remanente (1.4 ml) se utilizó para las separaciones cromatográficas. De cada medio de incubación se tomó una alícuota de 4 µl para sembrar y se mezcló en la siembra con 4 µL de una solución control. La solución control de los aminoácidos de interés (alanina, glutamato, glutamina y aspartato) se adicionó para ayudar en la detección visual de los aminoácidos marcados liberados al medio. Esta solución consistió en una mezcla de 7,4 mg de cada uno de los aminoácidos en 25 ml de una solución con una composición igual al medio de incubación (método de adición estándar). Para cada uno de los aminoácidos patrón se determinó el Rf como una medida de la velocidad de desplazamiento y se comparó con los Rfs de la solución control. Se sembraron 4 µl de la solución control y de mezcla en placas de cristal (20x20 cm) recubiertas con silica-gel (G-60) mezclada con almidón al 3% previamente activadas a 60-90°C (Domínguez, 1975). La placas se corrieron de una forma ascendente escalonada en cuyo caso se recorre el cromatogra-

ma con varios eluyentes en la misma dirección. La cámara se saturó con una mezcla de 20 ml de cada fase móvil. La mezcla de eluyentes que se utilizó para saturar la cámara y como fase móvil fueron (n-butanol:ácido acético: agua)-(80:20:20) y (etanol:agua)(7:3). Primero se separan las sustancias menos polares de la mezcla con el eluyente más fuerte (n-butanol:ácido acético:agua) y las más polares se separan con el eluyente menos fuerte (etanol:agua) previo secado de la primera corrida. Después de hacer las separaciones cromatográficas, las placas se secaron al medio ambiente y en estufa a 110°C (el calor mejora la sensibilidad, estabilidad y la diferencia de color). Los aminoácidos se revelaron con una solución con ninhidrina (25 ml de 1-butanol, 25 ml de acetona y 3.7 g de ninhidrina) (Fowler, et al., 1978). Se determinaron los Rf de cada mancha y posteriormente se raspó cada una de las manchas del cromatograma correspondientes a cada aminoácido y se recogieron en viales a los que se les adicionó 5 ml de líquido de centelleo, se agitaron por 1 minuto y se mantuvieron en reposo 12 horas para determinar las respectivas desintegraciones por minuto (dpm) en un contador de centelleo líquido. Los resultados se expresan en picomoles por hora por millón de células de la fracción enriquecida del aminoácido respectivo.

## RESULTADOS

### Comparación de la capacidad de fijación de CO<sub>2</sub> por las neuronas y astrocitos utilizando lactato y del acetato

En la tabla 1 y en las figuras 1A y 1B, se muestran los resultados de la comparación de la capacidad de fijación de CO<sub>2</sub> por las neuronas y astrocitos utilizando lactato y acetato. En las neuronas, la exportación de sustratos marcados al medio utilizando acetato no disminuyó significativamente

7%, mientras que la fijación en las células utilizando este sustrato sí presentó un descenso significativo 76% con respecto al lactato. En los astrocitos, la capacidad de fijación de CO<sub>2</sub> tanto en sustratos que son exportados como en los que quedan dentro de la célula utilizando acetato disminuyó significativamente 75 y 60% respectivamente con respecto a los resultados obtenidos con lactato.

**Tabla 1.**

**Comparación de la utilización del lactato y el acetato en la fijación de CO<sub>2</sub> y en la exportación de carbonos en cultivos primarios de neuronas y astrocitos.** Cultivos quiescentes de neuronas de 7 días y astrocitos de 14 días, se incubaron a 37°C durante 30 minutos en tampón fosfato a pH 7.4 que contenía [<sup>14</sup>C]-bicarbonato sódico (NaH<sup>14</sup>CO<sub>3</sub>) (500-1000 dpm/nmol); bicarbonato sódico (5 mM) acetato (5 mM) o L-lactato (10.5 mM). El medio y las células se acidificaron por separado y la radiactividad remanente en las células y en los respectivos medios se midió después de 24 h. Las velocidades se expresan como nanomoles de carbonos incorporados a sustratos estables en el medio o en las células (neuronas o astrocitos) por hora por millón de células (nmol/h/10<sup>6</sup> cel.) y son medias ± SEM.

#### NEURONAS

Sustrato	Medio	Células
L-lactato (10.5 mM)	2.67 ± 0.01	0.98 ± 0.03
Acetato (5 mM)	2.48 ± 0.23	0.23 ± 0.01*

#### ASTROCITOS

Sustrato	Medio	Células
L-lactato (10.5 mM)	2.78 ± 0.05	1.49 ± 0.06
Acetato (5 mM)	0.69 ± 0.08*	0.60 ± 0.08*

Diferencias significativas (p<0,05) entre los dos sustratos

Figura 1.

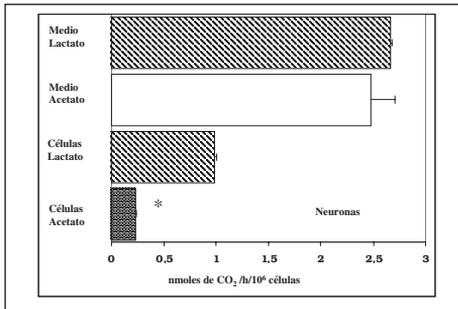


Figura 1B.

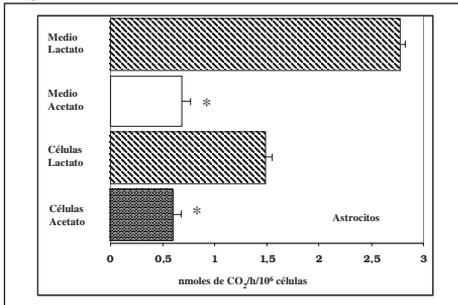


Figura 1.

Comparaciones de la utilización del lactato y el acetato en la fijación de CO<sub>2</sub> a sustratos estables en las células y los liberados al medio respectivamente (véanse tabla 2 y figura 1A), además provocó una disminución significativa en la concentración de alanina del 52%, glutamato del 55% y aspartato del 60% (véase tabla 3 y figura 3A). En los astrocitos, por el contrario, este inhibidor provocó un aumento del 67 y 71% en la incorporación de carbonos en productos dentro de las células como en los productos marcados liberados al medio respectivamente (véanse tabla 2 y figura 2B), igualmente causó un aumento en la concentración de alanina 18%, glutamina/glutamato del 36% y aspartato 28% (véanse tabla 3 y figura 3B). Al comparar la sumatoria de las picomoles de aminoácidos obtenidos por las separaciones cromatográficas con la cantidad de nanomoles de sustratos estables liberados al medio de incubación con DCA se calculó que aproximadamente se fijó el 7% en aminoácidos liberados por las neuronas y el 15% en aminoácidos liberados por los astrocitos.

**Efecto de inhibidores metabólicos y del transporte en la capacidad de fijación de CO<sub>2</sub> en neuronas y astrocitos utilizando acetato**

El estudio de los posibles isotopómeros que pueden quedar marcados con NaH<sup>14</sup>CO<sub>3</sub> a partir de la carboxilación del piruvato en el TCA indica que vía malato deshidrogenasa NADP-dependiente (mME) en las neuronas y vía piruvato carboxilasa en los astrocitos se produce [4-<sup>14</sup>C]-malato y [4-<sup>14</sup>C]-oxalacetato respectivamente. Los carbonos marcados de estos sustratos al continuar el ciclo pueden permitir el marcaje de aminoácidos como el glutamato, glutamina y aspartato. El reciclaje del piruvato a partir de intermediarios del ciclo

de los ácidos carboxílicos como el malato y el oxalacetato ha sido demostrado en cultivos de neuronas y astrocitos ya que en estas condiciones las células tienen el equipamiento enzimático para desarrollar esta actividad, principalmente en situaciones donde la glucosa es escasa (Cruz *et al*, 1998). Por lo tanto al producirse la descarboxilación del oxalacetato vía fosfoenolpiruvato carboxiquinasa en las neuronas y malato deshidrogenasa NADP-dependiente (cME) en el citosol de los astrocitos se puede obtener [1-<sup>14</sup>C]-piruvato el cual es transaminado a [1-<sup>14</sup>C]-alanina vía alanina aminotransferasa (ALAT).

**Efecto del dicloroacetato (DCA).** El DCA es un inhibidor de la piruvato deshidrogenasa quinasa, la cual cataliza la fosforilación de la piruvato deshidrogenasa (E1) del CPDH, lo que provoca un incremento de los requerimientos de piruvato y un aumento en los niveles de acetil-CoA. En las neuronas, el DCA provocó un descenso significativo del 39 y 45% tanto en la incorporación de carbonos en productos dentro de la células como en los productos que son liberados al medio respectivamente (véanse tabla 2 y figura 1A), además provocó una disminución significativa en la concentración de alanina del 52%, glutamato del 55% y aspartato del 60% (véase tabla 3 y figura 3A). En los astrocitos, por el contrario, este inhibidor provocó un aumento del 67 y 71% en la incorporación de carbonos en productos dentro de las células como en los productos marcados liberados al medio respectivamente (véanse tabla 2 y figura 2B), igualmente causó un aumento en la concentración de alanina 18%, glutamina/glutamato del 36% y aspartato 28% (véanse tabla 3 y figura 3B). Al comparar la sumatoria de las picomoles de aminoácidos obtenidos por las separaciones cromatográficas con la cantidad de nanomoles de sustratos estables liberados al medio de incubación con DCA se calculó que aproximadamente se fijó el 7% en aminoácidos liberados por las neuronas y el 15% en aminoácidos liberados por los astrocitos.

**Tabla 2.**

**Resultados de la influencia del acetato en la fijación de carbonos en neuronas y astrocitos.**

Cultivos quiescentes de neuronas de 7 días y astrocitos de 13 días, se incubaron a 37°C durante una hora en tampón fosfato a pH 7.4 que contenía acetato (5 mM). Se adiciona [<sup>14</sup>C]-bicarbonato sódico (NaH<sup>14</sup>CO<sub>3</sub>) (500-1000 dpm/nmol); bicarbonato sódico (5 mM) en ausencia o presencia de α-ciano-4-hidroxicinnamato (α-CN) (2 mM), aminooxiacetato (AOA) (5 mM), butilmalonato (BM)(5 mM), 1,2,3-bencenotricarboxilato (BT)(5 mM) o dicloroacetato (DCA)(1 mM). El medio y las células se acidificaron por separado y la radiactividad remanente en las células y en los respectivos medios se midió después de 24 h. Las velocidades se expresan como nanomoles de carbonos incorporados a sustratos estables en el medio o en las células (neuronas o astrocitos) por hora por millón de células (nmol/h/10<sup>6</sup> cel.) y son medias ± SEM.

NaH <sup>14</sup> CO <sub>3</sub>	Sin inhibidor	+ DCA (1 mM)	+ AOA (5 mM)	+ α-CN (2 mM)	+ BM (5 mM)	+ BT (5 mM)
<b>NEURONAS</b>	0.23 ± 0.01	0.14 ± 0.01*	0.13 ± 0.01*	0.13 ± 0.01*	0.19 ± 0.02*	0.29 ± 0.01*
<b>MEDIO</b>	2.48 ± 0.23	1.36 ± 0.20*	1.34 ± 0.14*	1.06 ± 0.09*	1.53 ± 0.12*	2.46 ± 0.26
<b>ASTROCITOS</b>	0.60 ± 0.08	1.00 ± 0.09*	0.71 ± 0.10	1.82 ± 0.22*	0.54 ± 0.09*	3.10 ± 0.51*
<b>MEDIO</b>	0.69 ± 0.08	1.18 ± 0.08*	0.19 ± 0.03*	1.97 ± 0.19*	0.18 ± 0.02*	1.11 ± 0.13*

Diferencias significativas (p<0.05) entre los valores con respecto al tratamiento sin inhibidor.

Figura 2A.

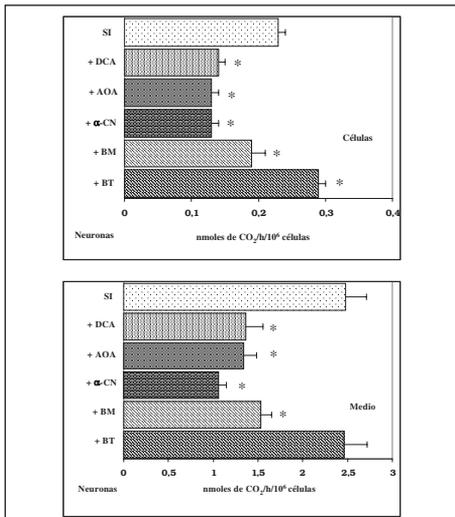


Figura 2B.

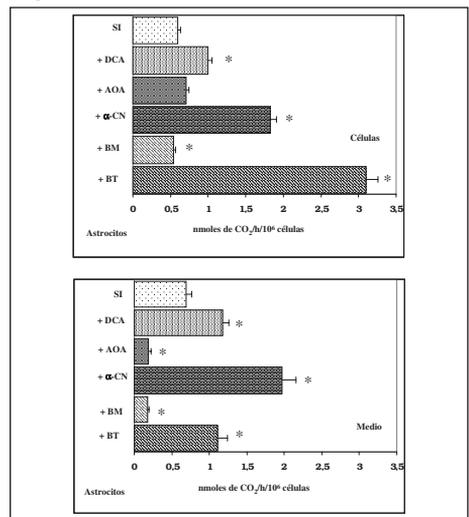


Figura 2.

Fijación de CO<sub>2</sub> en células y en sustratos que son liberados al medio. 2A. Comparación de las variaciones en el metabolismo del acetato con diferentes inhibidores en neuronas. 2B. Comparación de las variaciones en el metabolismo del acetato con diferentes inhibidores en astrocitos. SI (sin inhibidor); DCA (dicloroacetato); AOA (aminooxiacetato); α-CN (α-ciano-4-hidroxicinnamato); BM (butilmalonato); BT (1,2,3 bencenotricarboxilato). \*Diferencias significativas (p<0.05) con respecto al tratamiento sin inhibidor.

**Efecto del aminoacetoacetato (AOA).** El AOA es un inhibidor de todas las transaminasas (o aminotransaminasas) que catalizan la transferencia del grupo  $\alpha$ -amino ( $\text{NH}_3$ ) de un aminoácido a un  $\alpha$ -cetoácido. En las neuronas este inhibidor provocó un descenso del 43 y 46% en la radioactividad incorporada en las células y en los productos marcados liberados al medio (véanse tabla 2 y figura 2A), lo que se confirma con el descenso en las concentraciones de alanina 32%, glutamato 33% y aspartato del 41% (véanse tabla 3 y figura 3A).

Sin embargo en los astrocitos, la utilización de AOA, provocó un aumento tanto en la

radioactividad incorporada en las células 18% pero igual que en las neuronas produjo un descenso del 72% en la radioactividad de productos liberados al medio tabla 2 y figura 2B, lo que también se confirma con el descenso en las concentraciones de alanina 80%, glutamina/glutamato 76% y aspartato 79% (véanse tabla 3 y figura 3B). Al hacer la comparación de la sumatoria de los picomoles de aminoácidos con la cantidad de nanomoles de sustratos estables liberados al medio de incubación con AOA se encontró que aproximadamente se fijó el 10% en aminoácidos liberados por las neuronas y el 16% en aminoácidos liberados por los astrocitos.

**Tabla 3.**

**Resultados de la influencia del acetato en la exportación extracelular de carbonos en neuronas y astrocitos.**

Cultivos quiescentes de neuronas de 7 días y astrocitos de 13 días, se incubaron a 37°C durante una hora en tampón fosfato a pH 7.4 que contenía acetato (5 mM). Se adiciona [ $^{14}\text{C}$ ]-bicarbonato sódico ( $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ ) (500-1000 dpm/nmol); bicarbonato sódico (5 mM) en ausencia o presencia de  $\alpha$ -ciano-4-hidroxycinnamato ( $\alpha$ -CN) (2 mM), aminoacetoacetato (AOA) (5 mM), butilmalonato (BT)(5 mM), 1,2,3-bencenotricarboxilato (BT)(5 mM) o dicloroacetato (DCA)(1 mM). El medio y las células se acidificaron por separado y la radiactividad remanente en las células y en los respectivos medios se midió después de 24 h. Las velocidades se expresan como picomoles de carbonos incorporados a sustratos estables en el medio o en las células (neuronas o astrocitos) por hora por millón de células (pmol/h/10<sup>6</sup> cel.) y son medias  $\pm$  SEM.

NEURONAS							
Fracción	Rf	Sin inhibidor	+ DCA	+AOA	+ $\alpha$ -CN	+BM	+ BT
A	0.43 $\pm$ 0,01	64.68 $\pm$ 6,37	30.93 $\pm$ 1.78*	43.87 $\pm$ 1.05*	28.59 $\pm$ 1,77*	44.20 $\pm$ 3,55*	67.76 $\pm$ 3,12
B	0.35 $\pm$ 0.004	66.50 $\pm$ 4.35	29.64 $\pm$ 2.24*	44.31 $\pm$ 3.87*	29.42 $\pm$ 1.51*	44.54 $\pm$ 3.02*	65.63 $\pm$ 6.53
C	0.25 $\pm$ 0.002	71.56 $\pm$ 4.06	28.80 $\pm$ 2.56*	42,13 $\pm$ 4.63*	30,16 $\pm$ 2.36*	43.16 $\pm$ 3.37*	69.79 $\pm$ 5.02

ASTROCITOS							
Fracción	Rf	Sin inhibidor	+ DCA	+AOA	+ $\alpha$ -CN	+BM	+ BT
A	0.43 $\pm$ 0,01	48.70 $\pm$ 3.22	57.30 $\pm$ 7.70	9.64 $\pm$ 1.37*	56.16 $\pm$ 5.94*	9.44 $\pm$ 0.45*	42.11 $\pm$ 2.49*
D	0.36 $\pm$ 0.004	44.93 $\pm$ 4.36	60.94 $\pm$ 5.64*	10.50 $\pm$ 0.90*	56.33 $\pm$ 5.15*	9.21 $\pm$ 0.59*	40.71 $\pm$ 2.35
C	0.25 $\pm$ 0.002	45.63 $\pm$ 2.91	58.60 $\pm$ 4.77*	9.52 $\pm$ 1.05*	53.81 $\pm$ 5.46*	9.84 $\pm$ 1.02*	43.04 $\pm$ 3.7

Diferencias significativas (p<0.05) entre los valores con respecto al tratamiento sin inhibidor.

Figura 3A.

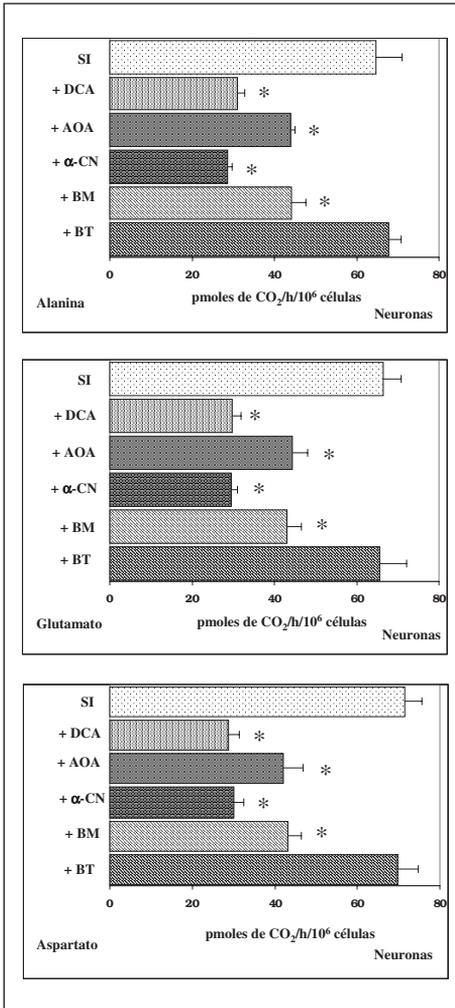


Figura 3B.

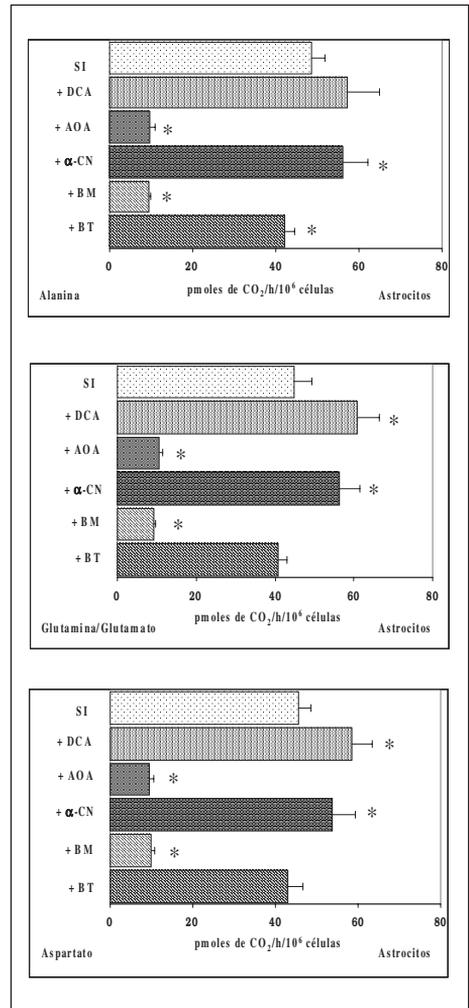


Figura 3.

Variación en la exportación extracelular de aminoácidos. 3A. Fijación en aminoácidos que son liberados al medio en neuronas. 3B. Fijación en aminoácidos que son liberados al medio en astrocytes. SI (sin inhibidor); DCA (dicloroacetato); AOA (aminooxiacetato);  $\alpha$ -CN ( $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinamato); BM (butilmalonato); BT (1,2,3-bencenotricarboxilato). \*Diferencias significativas (p < 0.05) con respecto al tratamiento sin inhibidor.

**Efecto del  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinamato ( $\alpha$ -CN).** El  $\alpha$ -CN ha sido reportado como un inhibidor específico del transporte de monocarboxilatos como el piruvato y el

acetato. En las neuronas el  $\alpha$ -CN produjo un descenso en la incorporación de radioactividad en las células del 43% al igual que un descenso en la radioactividad de

los productos liberados al medio del 57% (véanse tabla 2 y figura 2A), igualmente se produjo un descenso en las concentraciones de las fracciones de alanina 56%, glutamato 56%, aspartato 57% (véanse tabla 3 y figura 3A). En los astrocitos, la incorporación de radioactividad en estructuras celulares incrementó un 203% y en productos marcados liberados al medio en un 185% (véanse tabla 2 y figura 2B) lo que concuerda con el aumento en las concentraciones de las fracciones de alanina 18%, glutamina/glutamato 25% y aspartato 18% (véanse tabla 3 y figura 3B). Finalmente la comparación de los picomoles de aminoácidos obtenidos con los nanomoles de sustratos estables liberados al medio muestran que en las neuronas se fijó el 8% en aminoácidos liberados y el 8% en aminoácidos liberados por los astrocitos.

**Efecto del butilmalonato (BM).** El BM es un inhibidor de los transportadores de los dicarboxilatos malato,  $\alpha$ -KG, y NAA, además inhibe el transporte de citrato aunque no específicamente. En las neuronas, el inhibidor provocó un descenso en la incorporación de radioactividad en las células de un 17% y causó un descenso en la cantidad de productos marcados liberados al medio en un 38% (véanse tabla 2 y figura 2A). Igualmente se produjo un descenso en las concentraciones de las fracciones de alanina en un 31%, glutamato 33% y aspartato 40% (véanse tabla 3 y figura 3A). En los astrocitos, se presentaron descensos del 10% en la incorporación de radioactividad en las células y del 74% en la cantidad de productos marcados liberados al medio (véanse tabla 2 y figura 2A), al igual que un descenso en las concentraciones de las fracciones de alanina 81% glutamina/glutamato 80% y aspartato 78% (véanse tabla 3 y figura 3B). La sumatoria de las picomoles de aminoácidos obtenidos por las separaciones cromatográficas comparada con la cantidad de nanomoles de sustratos estables liberados al medio de incubación con BM muestra que aproximada-

mente se fijó el 7% en aminoácidos liberados por las neuronas y el 16% en aminoácidos liberados por los astrocitos.

**Efecto del 1,2,3-bencenotricarboxilato (BT).**

El BT es un inhibidor del transporte de tricarboxilatos. Inhibe el transporte de citrato e isocitrato mitocondrial. En las neuronas, el BT provocó un aumento en la incorporación de radioactividad en las células del 26%, mientras que la cantidad de productos marcados liberados al medio apenas disminuyó en un 0,8% (véanse tabla 2 y figura 2A). Este inhibidor provocó un aumento en la concentración de la fracción de alanina del 4%, y un descenso en las fracciones de glutamato 1% y aspartato 2% tabla 3 y figura 3B los cuales no fueron significativos demostrando que la concentración de éstos se mantuvo (véanse tabla 3 y figura 3A). El BT causó un aumento significativo ( $p < 0,05$ ), tanto en la incorporación de radioactividad en los astrocitos como en los productos marcados liberados al medio del 417 y 61%, respectivamente (véanse tabla 2 y figura 2B). De igual manera se produjo un descenso en la fracción de alanina 14%, glutamina/glutamato de un 9% y aspartato un 6% en éstos últimos la disminución no fue significativa comparada con los resultados sin inhibidor (véanse tabla 3 y figura 3B). La comparación de la sumatoria de las picomoles de aminoácidos obtenidos por las separaciones cromatográficas y la cantidad de nanomoles de sustratos estables liberados al medio de incubación con BT, se calculó que aproximadamente se fijó el 8% en aminoácidos liberados por las neuronas y el 11% en aminoácidos liberados por los astrocitos.

**DISCUSIÓN**

El metabolismo energético del cerebro depende, casi exclusivamente, de la utilización de glucosa. Sin embargo, durante el desarro-

llo posnatal otros metabolitos, entre los que se destaca el lactato y los cuerpos cetónicos, pueden comportarse como sustitutos alternativos de la glucosa. Se ha postulado que el acetato puede tener un papel más relevante durante el desarrollo del cerebro (McMillan y Mortensen, 1963; Cerdan, 1990; Tovar et al, 2001). Durante la prelactancia el acetato intracerebral puede ser obtenido por varias vías pero principalmente a partir del metabolismo del NAA y NAAG los cuales son el segundo aminoácido y el péptido más abundantes en el cerebro, cuyas concentraciones en este período se encuentran bastante elevadas y que vía aspartatoacilasa II (N-acil-L-aspartato amidohidrolasa; EC 3.5.1.15) (Huang, 2000; Bhakoo, 2001) y NAAG peptidasa (glutamato carboxipeptidasa II; EC 3.4.17.21) (Baslow, 2000; Neale, 2000) permiten la síntesis de este sustrato el cual puede actuar como un sensor metabólico, con efecto alostérico que modificaría el comportamiento de una o varias rutas metabólicas. En el cerebro se han reportado tres tipos de transportadores de monocarboxilatos (MCTs). MCT1 y MCT2 son transportadores que se encuentran en la membrana plasmática de los astrocitos (Bröer, 1997; Hanu, 2000); MCT2 y MCT8 se encuentran en la membrana plasmática de las neuronas (Bröer, 1997; Pierre, 2000) MCT1 es un típico transportador que exporta lactato y MCT2 es un transportador que importa lactato y piruvato (Lin et al., 1998). Estos transportadores se expresan más en el período perinatal que en cerebro adulto (Pellerin, 1998b; Baud, 2003). MCT1 transporta acetato con una razonable afinidad mientras MCT2 tienen una afinidad más baja.

En cultivos primarios de neuronas, se ha reportado la incorporación de  $^{14}\text{C}$  del  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$  en glutamato y aspartato (Hassel, 2000a) y prolina (Kaufman y Driscoll, 1993) y la incorporación de  $^{13}\text{C}$  en aspartato, glutamato, GABA y glutamina. También las

neuronas liberan aminoácidos de cadena ramificada (L-leucina, L-isoleucina y L-valina) (*branched-chain amino acids*, BCAA) (Hutson, 2001). La probabilidad de tener glutamato y aspartato marcados incrementan la posibilidad de tener NAA y NAAG en el medio. Por otro lado, se ha reportado la incorporación de  $^{14}\text{C}$  del  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$  en cultivos primarios de astrocitos en glutamina, glutamato, aspartato,  $\alpha$ -cetoglu-tarato, malato y citrato (Kaufman, 1992; Hassel, 2000a; Lieth, 2001; Deitmer, 2003) y la incorporación de  $^{13}\text{C}$  en alanina,  $\alpha$ -cetoglu-tarato, aspartato, glutamato, GABA, glutamina. En experimentos con  $[2-^{13}\text{C}]$ -glicina se ha encontrado liberación de creatina, serina y glutation (Dringen, 1998) y en trabajos con  $[4,5-^3\text{H}]$ -leucina, se ha encontrado liberación de acetoacetato, 3-hidroxi-butarato y  $\alpha$ -cetoisocaproato (Bixel, 1995). También se ha reportado que los astrocitos en cultivo primario liberan ácido oleico (Tabernero, 2001) y  $\alpha$ -cetoácidos de cadena ramificada (2-cetoisocaproato, 2-ceto-3-metilvalerato y 2-cetoisovalerato) (*branched-chain  $\alpha$ -keto acids*, BCKA) (Hutson, 2001).

### **Comparación de la capacidad intracelular de las reacciones fijadoras de $\text{CO}_2$ en neuronas y astrocitos utilizando acetato o lactato en condiciones perinatales**

Para verificar los resultados obtenidos con acetato se utilizó lactato como control teniendo en cuenta que este es el principal sustrato oxidativo y lipogénico de las neuronas y los astrocitos durante la prelactancia y porque ya se han realizado trabajos sobre fijación de  $\text{CO}_2$  utilizando este sustrato como precursor, permitiendo así comparar tanto la capacidad de fijación de  $\text{CO}_2$  en estructuras estables como en la exportación de carbonos utilizando estos dos sustratos. Para los experimentos se utilizaron acetato y lactato a concentraciones fisiológicas durante la prelactancia. La fijación en sustratos estables liberados al medio por las neuronas se favoreció con la

utilización de lactato y acetato, lo que de igual manera favorece posiblemente la salida de sustratos como aspartato, glutamato, alanina, leucina, NAA y NAAG (véase tabla 1). Sin embargo, en los astrocitos la fijación de  $\text{CO}_2$  en sustratos estables liberados al medio sólo se vio significativamente favorecida con la utilización del lactato más que con el acetato (véase tabla 1). En cuanto a la fijación de  $\text{CO}_2$  en estructuras estables en las neuronas fue más alta con la utilización del lactato que con el acetato, lo que indica que posiblemente los carbonos marcados derivados del lactato fueron más utilizados para ser incorporados en lípidos de membrana, proteínas y probablemente en aminoácidos que quedaron empaquetados en vesículas y que no fueron liberados. En los astrocitos la fijación de  $\text{CO}_2$  fue más alta cuando se utilizó lactato que con acetato lo que de igual manera favorece la incorporación de sus carbonos en lípidos de membrana, proteínas, aminoácidos que quedaron empaquetados en vesículas ya que se ha reportado que una manera de liberar glutamato por los astrocitos es a través de vesículas similar a las neuronas (Bezzi *et al.*, 2004), además también se ha reportado que los astrocitos sintetizan y empaquetan colesterol en lipoproteínas (Pfrieger, 2002), lo que incrementa la cantidad de sustratos que quedaron marcados en estas células cuando se utilizó acetato (véanse tabla 1 y figura 1B). Estos resultados están indicando que en las neuronas las reacciones de fijación están dirigidas hacia la síntesis de sustratos que son liberados al medio y al mantenimiento de los niveles energéticos, que para la síntesis de estructuras ya que la liberación de neurotransmisores implica altos requerimientos de ATP. Los astrocitos por el contrario pueden dirigir sus actividades fijadoras tanto para la incorporación de carbonos en estructuras celulares como en la liberación de sustratos al medio, los cuales se pueden ver más favorecidos si los niveles de piruvato están disponibles tal

como ocurre cuando se utiliza lactato. Estos resultados confirman la actividad en las neuronas y en los astrocitos de la AceCS la cual cataliza la síntesis de acetyl-CoA a partir de acetato ya que el acetato fue utilizado como precursor para marcar sustratos que quedan en las células como los que son liberados, además se reafirma al lactato como el sustrato que utilizan preferentemente las neuronas y los astrocitos durante la prelactancia.

### **Efecto sobre la capacidad intracelular de las reacciones fijadoras de $\text{CO}_2$ en neuronas y astrocitos utilizando acetato en condiciones perinatales sin y con diferentes inhibidores enzimáticos y del transporte**

Al determinar la capacidad de fijación de  $\text{CO}_2$  en neuronas y astrocitos utilizando acetato y al comparar los resultados sin inhibidor entre los dos tipos de células se encontró que la fijación de  $\text{CO}_2$  en estructuras celulares fue más alta en los astrocitos que en las neuronas (véanse tabla 2 y figuras 2A y 3A), lo que provocó una mayor incorporación de carbonos posiblemente en lípidos, proteínas, sustratos que quedaron empaquetados dentro de vesículas y lipoproteínas como glutamato y colesterol respectivamente. Sin embargo, las neuronas fijan más carbonos en sustratos que son liberados al medio favoreciéndose la salida de sustratos como aminoácidos NAA y NAAG. Como lo muestran los resultados de las separaciones de aminoácidos los cuales reflejan que las fracciones de alanina (ala), glutamato (glu) y aspartato (asp) en las neuronas son significativamente más altas que las fracciones de glutamina/glutamato (gln/glu), alanina (ala) y aspartato (asp) en los astrocitos (véase tabla 3 y figuras 2B y 3B). Sin embargo, teniendo en cuenta la cantidad de sustratos estables liberados al medio por las neuronas y la sumatoria de aminoácidos detectados (glu, asp, ala) co-

responden al 7% de la cantidad de estos sustratos, lo que indica que además de la salida de estos aminoácidos se vio más favorecida la salida de otros sustratos posiblemente NAA y NAAG. No obstante, de la cantidad de sustratos liberados por los astrocitos la sumatoria de aminoácidos detectados (gln/glu, asp, ala) corresponde al 20% de estos sustratos, lo que indica que en los astrocitos el acetato es más utilizado para la síntesis de aminoácidos que en las neuronas, lo que resultaría lógico si se tiene en cuenta que los principales sustratos compartimentados por los astrocitos hacia las neuronas son los aminoácidos como la glutamina y la alanina las cuales son fuentes de nitrógeno para la síntesis de glutamato. No obstante en las neuronas el acetato está siendo utilizado para mantener los niveles energéticos así como para la síntesis y liberación de sustratos en mayor cantidad que los aminoácidos.

El dicloroacetato (DCA) es un inhibidor de la piruvato deshidrogenasa quinasa (PDH) (Kuroda, 1984; Miller *et al.*, 1989; Tovar, 1995; Albarracín, 2002; Barrios, 2003; Salazar, 2003), lo que provoca un incremento en la actividad del complejo piruvato deshidrogenasa (CPDH), cuyo efecto neto es un incremento en los niveles de acetil-CoA. Los resultados de fijación de CO<sub>2</sub> en estructuras estables muestran que en las neuronas ésta cayó significativamente con respecto a los resultados sin inhibidor, mientras que en los astrocitos aumentó significativamente con respecto a los resultados sin inhibidor (véanse tabla 2 y figuras 2A y 3A). El descenso tanto en la fijación de CO<sub>2</sub> en estructuras celulares como en los sustratos estables liberados al medio en las neuronas indican que los requerimientos de piruvato provocan la descarboxilación del malato vía enzima málica mitocondrial (mME), provocando un descenso en los niveles de oxalacetato (OAA) causado por el descenso en los niveles de malato y por el incre-

mento en los niveles de acetil-CoA, lo que disminuye la capacidad de fijación en estas células, disminuyendo la cantidad de sustratos estables en las células así como en los sustratos estables liberados al medio. Mientras que en los astrocitos el incremento en la fijación en estructuras celulares como en los sustratos estables liberados al medio indican que en estas células el incremento en los niveles de acetil-CoA favorecen la actividad de la Piruvato carboxilasa (PC) para así incrementar los niveles de OAA marcado, incrementando asimismo los niveles de intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) favoreciéndose el marcaje de sustratos que quedan en las células (lípidos, proteínas) al igual que el marcaje de sustratos que son liberados al medio. Lo que además se corrobora con los resultados de las cromatografías donde en las neuronas al afectarse la capacidad de fijación mME se afecta la salida de aminoácidos (véanse tabla 3 y figuras 3A), reflejo de que al incrementar la actividad del CPDH incrementa la respiración en la célula como además se demuestra en trabajos previos (Barrios, 2003; Salazar, 2003; Albarracín, 2002), disminuyendo así la disponibilidad de carbonos para la síntesis de aminoácidos. De la cantidad de sustratos liberados por las neuronas el DCA provocó un descenso del 45 y 56% en la sumatoria de aminoácidos detectados (glu, ala, asp), mientras que en los astrocitos la cantidad de sustratos liberados al medio incrementó un 71% y la sumatoria de aminoácidos detectados (gln, ala, asp) aumentó un 27% con respecto a la sumatoria de aminoácidos sin inhibidor.

El aminooxiacetato (AOA) es un inhibidor de todas la aminotransferasas, especialmente la aspartato aminotransferasa (ASAT) inhibiéndose la síntesis de aspartato y glutamato, afectando directamente la lanzadera malato/aspartato (Flint *et al.*, 1991). En los resultados de fijación en estructuras

estables en las células el AOA provocó un descenso en las neuronas, pero en los astrocitos la fijación aumentó aunque no significativamente. Sin embargo, la fijación de CO<sub>2</sub> en sustratos estables liberados al medio disminuyó significativamente tanto en las neuronas como en los astrocitos respecto a los resultados sin inhibidor (véase tabla 2).

En las neuronas este descenso se produjo ya que al aumentarse los niveles de OAA incrementa su utilización a través del TCA, lo que indica que las descarboxilaciones aumentan con respecto a las carboxilaciones, es decir, que el OAA sin marcar aumenta con respecto al marcado, afectándose así la capacidad de fijación de CO<sub>2</sub> tanto en las estructuras celulares como en el medio. Asimismo ocurre en los astrocitos lo que disminuye la capacidad de la PC, como lo refleja el mantenimiento de los sustratos marcados en las células ya que aunque éste aumentó, este resultado no fue significativo, pero lo que sí afectó significativamente la fijación de CO<sub>2</sub> en sustratos que son liberados al medio y que al igual que en las neuronas se reflejan en los resultados de las separaciones de aminoácidos ya que en las neuronas como en los astrocitos las fracciones de (ala, glu, gln/glu y asp) disminuyeron significativamente con respecto a los resultados sin inhibidor (véase tabla 3). Teniendo en cuenta la cantidad de sustratos liberados por las neuronas el AOA provocó una caída del 46 y 36% en la sumatoria de aminoácidos detectados, sin embargo, este inhibidor afectó más la salida de sustratos liberados por los astrocitos ya que ésta disminuyó un 72% que se reflejó aún más en el descenso de la salida de aminoácidos la cual cayó un 78%. Otro inhibidor que tiene un efecto similar al AOA en cuanto al incremento de los niveles de OAA es el butilmalonato (BM), el cual es un inhibidor del transporte de dicarboxilatos como malato,  $\alpha$ -cetoglutarato ( $\alpha$ -KG) y el cual tiene un efecto más pro-

nunciado sobre el antiporte malato/fosfato, afectando la actividad de la lanzadera malato/aspartato, y por lo tanto, la síntesis de aspartato y glutamato vía ASAT. Al igual que el AOA el BM provocó una acumulación en los niveles de OAA así como también en los niveles de malato y  $\alpha$ -KG y como lo indican los resultados sobre la fijación de CO<sub>2</sub> en estructuras celulares y en sustratos estables que son liberados al medio en las neuronas y los astrocitos donde el BM provocó un descenso en las dos actividades (véase tabla 2), ya que un acúmulo de estos sustratos aumenta la oxidación de carbonos sobre la cantidad de sustratos marcados afectando la disponibilidad de carbonos que son incorporados en estructuras celulares como en sustratos que son liberados al medio, como además se observa en los resultados de las cromatografías donde las fracciones de (glu, ala y asp) disminuyeron significativamente en las neuronas al igual que las fracciones de gln/glu, ala y asp) en los astrocitos (véase tabla 3). De la cantidad de sustratos estables liberados por las neuronas el AOA provocó un descenso del 46 y 36% en la sumatoria de aminoácidos detectados, sin embargo, el efecto de este inhibidor fue más notorio en los astrocitos donde la cantidad de sustratos estables liberados al medio cayó un 70% y la sumatoria de aminoácidos cayó un 80%. Esto es un reflejo de que los incrementos en los niveles de OAA afectan la capacidad de fijación en las células y en el medio, además se confirma que la ASAT es la principal ruta de síntesis de aminoácidos en las neuronas y los astrocitos, no obstante, la actividad de esta enzima es más crítica en los astrocitos ya que al inhibirse la síntesis de asp se afecta la síntesis de glu y por ende de ala, que en las neuronas ya que ésta tiene la capacidad de sintetizar glu vía glutamato deshidrogenasa (GDH).

El  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinnamato ( $\alpha$ -CN) es un inhibidor del transporte de monocarboxilatos como el lactato, piruvato y acetato (Broer *et*

*al.*, 1997; Dringen *et al.*, 1993a; Lin, 1998; Phillis *et al.*, 2001). Este inhibidor afecta la entrada del piruvato a la mitocondria disminuyendo los niveles de este sustrato así como los niveles de acetil-CoA. Sin embargo, en trabajos previos se ha demostrado que la entrada de acetato a la mitocondria no se ve afectada por este inhibidor. Los resultados obtenidos sobre la capacidad de fijación de CO<sub>2</sub> en estructuras estables en las neuronas se vieron disminuida significativamente, mientras que en los astrocitos ésta se vio incrementada. Asimismo la fijación de CO<sub>2</sub> en sustratos estables liberados al medio se vio disminuida con este inhibidor en las neuronas, mientras que en los astrocitos ésta se incrementó (véase tabla 2). Esto indica que en las neuronas aumenta la descarboxilación del malato para sostener los niveles de piruvato ya que la entrada de éste se ve inhibida afectándose la fijación de carbonos en las células y en los sustratos que son liberados al medio principalmente por un descenso del malato, mientras que en los astrocitos la utilización de acetil-CoA del acetato se favoreció más que la utilización del acetil-CoA del CPDH lo que le permite una mayor disponibilidad de piruvato a la PC para incrementar los niveles de OAA marcado, lo que se refleja en el incremento de la fijación de CO<sub>2</sub> en estructuras celulares como en sustratos que son liberados al medio. Estos resultados además se corroboran con los de las separaciones de los aminoácidos ya que las fracciones de (ala, glu y asp) en las neuronas disminuyeron, mientras que las fracciones (de ala, gln/glu y asp) aumentaron con respecto a los resultados sin inhibidor. De la cantidad de sustratos estables liberados por las neuronas el  $\alpha$ -CN provocó un descenso del 57% en la sumatoria de aminoácidos detectados.

Mientras que en los astrocitos el  $\alpha$ -CN provocó un aumento del 185% en la salida de sustratos estables y un 19% en la sumatoria de aminoácidos detectados, lo que indica

que además de favorecerse la síntesis y liberación de aminoácidos se favoreció la salida de otros sustratos.

Con el BT se observa una actividad importante de la AceCS1 la cual es capaz de sostener la síntesis de lípidos en el citosol en las neuronas y en los astrocitos, los cuales favorecen la fijación de CO<sub>2</sub> vía acetil-CoA carboxilasa en sustratos marcados que quedan dentro de las células. El incremento de la síntesis de ácidos grasos o esteroides en los astrocitos, puede favorecer la liberación de oleico y colesterol al medio, lo que explicaría el incremento significativo ( $p < 0.05$ ) en la cantidad de sustratos marcados liberados al medio, ya que no se observó ninguna variación en los aminoácidos (véase tabla 3).

Teniendo en cuenta los resultados de la cantidad de sustratos estables liberados al medio y la sumatoria de la cantidad de aminoácidos detectados, sin y con los inhibidores, se observó que en las neuronas, el BT no causó cambios en la cantidad de sustratos estables liberados al medio ni la salida de aminoácidos (alanina, glutamato y aspartato). En los astrocitos, el BT causó un incremento de 61% en la cantidad de sustratos estables liberados al medio y una disminución del 10% en la salida de aminoácidos (alanina, glutamina/glutamato y aspartato).

## CONCLUSIONES

Se confirma que en el metabolismo de las neuronas y los astrocitos el oxalacetato es un sustrato crítico, ya que los niveles de su reservorio en la mitocondria pueden tener un efecto importante sobre la capacidad de fijación de CO<sub>2</sub> en estas células, debido a que cuando los niveles de éste aumentan se disminuye la fijación.

Cuando se produce un descenso en los niveles de acetil-CoA y oxalacetato en los astrocitos, se activa la fijación del CO<sub>2</sub> a través de enzimas como la metilcrotonil-CoA carboxilasa, propionil-CoA carboxilasa y piruvato carboxilasa (PC).

La deficiencia de piruvato en las neuronas afecta la capacidad de fijación de CO<sub>2</sub>, pero sí favorece la actividad de las AceCS1 y AceCS2, lo que provoca que estas células utilicen sus carbonos más hacia la síntesis de lípidos, que para la síntesis de aminoácidos, mientras que en los astrocitos, la actividad de estas dos isoformas provoca que estas células utilicen sus carbonos tanto para la síntesis de lípidos como para la síntesis de aminoácidos.

La actividad de la mME en las neuronas hacia la síntesis de piruvato no favorece la fijación de CO<sub>2</sub>, señalando que la actividad de esta enzima hacia la carboxilación del piruvato puede beneficiar de manera significativamente el mantenimiento de los niveles de aminoácidos.

Cuando se inhibe la salida de citrato de la mitocondria, las neuronas como en los astrocitos demostraron tener la capacidad de utilizar el acetato para la síntesis de acetil-CoA en el citosol vía AceCS1, favoreciendo la actividad de la acetil-CoA carboxilasa. No obstante, en los astrocitos la actividad de estas dos enzimas provoca un aumento en la síntesis y liberación de lípidos al medio, lo que no se observa en las neuronas debido a que de estas dos enzimas sólo colaboran en el mantenimiento de la lipogénesis.

## LITERATURA CITADA

- ALBARRACÍN, S. 2002. *Metabolismo del [U-<sup>14</sup>C]-acetato y del [2-<sup>14</sup>C]-acetato en astrocitos y en astrocitoma C<sub>6</sub>*. Tesis de maestría. Pontificia Universidad Javeriana. Programa de posgrado. Bogotá, Colombia. 170 p.
- BARRIOS, B. 2003. *Compartimentación intracelular del acetato en neuronas durante la prelactancia*. Tesis de maestría. Programa de posgrado. Maestría en Biología. Bogotá D.C., Pontificia Universidad Javeriana. 114 p.
- BASLOW, M. 2000. Functions of N-acetyl-L-aspartate and N-acetyl-L aspartylglutamate in the vertebrate brain: role in glial cell-specific signaling. *J Neurochem*, 75, 453-459.
- BAUD, O.; FAYOL, L.; GRESSENS, P.; PELLERIN, MAGISTRETTI, L.; EVRARD, P. and VERNEY, C. 2003. Perinatal and early postnatal changes in the expression of monocarboxylate transporters MCT1 and MCT2 in the rat forebrain. *J Comp Neurol*, 20 (465):445-454.
- BEZZI, P.; GUNDERSEN, V.; GALBETE, J.; SEIFERT, G.; STEUNHAUSER, C.; PILATI, E. and VOLTERRA, A. 2004. Astrocytes contain a vesicular compartment is competent for regulated exocytosis of glutamate. *Natur Neurosci*, 7: 613-620.
- BIXEL, M. and HAMPRECHT, B. 2000. Immunocytochemical localization of β methylcrotonyl-CoA carboxylase in astroglial cells and neurons in culture. *J Neurochem*, 74: 1059-1067.
- BROER, S.; RAHMAN, B.; PELLEGGRI, G.; PELLERIN, L.; MARTIN, J.; VERLEYSDONK, S.; HAMPRECHT, B. and MAGISTRETTI, P. 1997. Comparison of lactate transport in astroglial cells and monocarboxylate transporter 1 (MCT1) expressing *Xenopus laevis* oocytes. Expression of two different monocarboxylate transporters in astroglial cells and neurons. *J Biol Chem*, 272, 30096-30102.
- CERDAN, S.; KUNNECKE, B. and SEELIG, J. 1990. Cerebral metabolism of [1,2-<sup>13</sup>C]acetate as detected by *in vivo* and *in vitro* <sup>13</sup>C NMR. *J Biol Chem*, 265 (22): 12916-12926.

- CRUZ, F.; SCOUT, S.; BAROOSO, I.; SANTISTEBAN, P. and CERDÁN, S. 1998. Ontogeny and cellular localization of the pyruvate recycling system in rat brain. *J Neurochem*, 70, 2613-2619.
- DEITMER, J. 2003. A role for CO<sub>2</sub> and bicarbonate transporters in metabolic exchanges in the brain. *J Neurochem*, 80, 721-726.
- DOMÍNGUEZ, X. 1975. Cromatografía en papel y capa delgada. Organización de las Naciones Unidas (OEA). Washington, D.C., USA, 79 p.
- DRINGEN, R.; WIESINGER, H. and HAMPRECHT, B. 1993a. Uptake of L-lactate by cultured rat brain neurons. *Neurosci Lett*, 163: 5-7.
- DRINGEN, R.; GUTTERER, J. and MIRRLINGER, J. 2000. Glutathione metabolism in brain. Metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *Eur J Biochem*, 267, 4912-4916.
- FLINT, M.; SWARTZ, K.; HYMAN, B.; STOREY, E.; FINN, S. and KOROSHETZ, W. 1991. Aminoacetic acid results in excitotoxic lesions by a novel indirect mechanism. *J Neurochem*, 57: 1068-1073.
- FOWLER, B. and KRAUS, J. 1978. Evidence for three distinct classes of cystathionine β synthase mutants in cultures fibroblast. *J Clin Invest*, 61: 645-643.
- GAMBERINO, W.; BERKICH, D.; LYNCH, C.; XU, B. and LA NOUE, K. 1997. Role of pyruvate carboxylate in facilitation of synthesis of glutamate and glutamine in cultured astrocytes. *J Neurochem*, 69: 2312-2325.
- HANU, R.; MCKENNA, M.; O'NEILL, A.; RESNECK, W.; and BLOCH, R. 2000. Monocarboxylic acid transporters, MCT1 and MCT2, in cortical astrocytes *in vitro* and *in vivo*. *Cell Physiol*, 278 (5): C921-C930.
- HASSEL, B. and BRATHE, A. 2000. Neuronal pyruvate carboxylation supports formation of transmitter glutamate. *Neurosci*, 20: 1342-1347.
- HASSEL, B. 2001. Pyruvate carboxylation in neurons. *J Neurosci Res*, 66: 755-762.
- HUANG, W.; WANG, H.; KEKUDA, R.; FEI, Y.; FRIEDRICH, A.; WANG, J.; CONWAY, S.; CAMERON, R.; LIBACH, F. and GANAPATHY, V. 2000. Transport of N-acetylaspartate by the Na<sup>+</sup>-dependent high-affinity dicarboxylate transporter NaDC3 and its relevance to the expression of the transporter in the brain. *J Pharm Exper Therap*, 295 (1): 392-403.
- HUTSON, S.; LETH, E. and LANOE, K. 2001. Function of Leucine in excitatory neurotransmitter metabolism in the central nervous system. *J Nutri*, 131: 846S-850S.
- KAUFMAN, E. and DRISCOLL, B. 1992. Carbon dioxide fixation in neuronal and astroglial cells in culture. *J Neurochem*, 58 (1): 258-269.
- KURODA, Y.; TOSHIMA, K.; WATANABE, T.; KOBASHI, H.; ITO, M.; TAKEDA, E. and MIYAO, M. 1984. Effects of dichloroacetate on pyruvate metabolism in rat brain *in vivo*. *Pediatric Res*, 18: 936-938.
- LIN, R.; VERA, J.; CHAGANTI, R. AND GOLDE, D. 1998. Human monocarboxylate transporter 2 (MCT2) is a high affinity pyruvate transporter. *J Biol Chem*, 273 (44): 28959-28965.
- MCCARTHY, K. and DE VELLIS, J. 1980. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol*, 85: 890-902.
- MCKENNA, M.; SONNEWALD, U.; HUANG, X.; STEVENSON, J. and ZIELKE, H. 1998. Exogenous glutamate concentration regulates the metabolic fate of glutamate in astrocytes. *J Neurochem*, 66 (1): 386-393.
- MCMILLAN, P. and MORTENSEN, R. 1963. The metabolism of brain pyruvate and acetate in the tricarboxylic acid cycle. *J Biol Chem*, 238 (1): 91-93.
- MILLER, A.; HATCH, J. and PRIHODA, T. 1990. Dichloroacetate increase glucose use and decreases lactate in developing rat brain. *Metabolic Brain Disease*, 5: 195-204.
- NEALE, J.; BZDEGA, T. and WROBLEWSKA, B. 2000. N-acetylaspartylglutamate. *J Neurochem*, 75 (2): 443-452.

- PFRIEGER, F. 2002. Outsourcing in the brain: do neurons depend on cholesterol delivery by astrocytes. *Bioessays*, 25: 72-78.
- PELLERIN, L.; PELLEGGRI, G.; BITTAR, P.; CHARNAY, Y.; BOURAS, C.; MARTIN, J.; STELLA, N. and MAGISTRETTI, P. 1998b. Evidence supporting the existence of an activity dependent astrocyte-neuron lactate shuttle. *Dev Neurosci*, 20: 291-299.
- PHILLIS, J.; REN, J. and O'REGAN, H. 2001. studies on the effects of lactate transport inhibition, pyruvate, glucose and glutamine on amino acid, lactate and glucose release from the ischemic rat cerebral cortex. *J Neurochem*, 76: 247-257.
- PIERRE, K.; PELLERIN, L.; DEBERNARDI, R.; RIEDERER, B. and MAGISTRETTI, P. 2000. Cell-specific localization of monocarboxylate transporter, MCT1 and MCT2, in the adult mouse brain revealed by double immunohistochemical labeling and confocal microscopy. *Neuroscience*, 100: 617-627.
- SALAZAR, A. 2003. *Estudio de la compartimentación intracelular del acetato en cultivo primario de astrocitos*. Tesis de maestría. Programa de Posgrado. Maestría en biología. Bogotá D.C., Pontificia Universidad Javeriana, 105 p.
- TABERNERO, A. 1993. *Regulación 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, 186 p.
- TABERNERO, A.; LAVADO, E.; GRANDA, B.; VELASCO, A. and MEDINA, J. 2001. Neuronal differentiation is triggered by oleic acid synthesized and release by astrocytes. *J Neurochem*, 79, 606-616.
- TOVAR, J. 1995. *Compartimentación celular del metabolismo del lactato en neuronas y astrocitos en cultivo primario*. Facultad de Ciencias Químicas. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Tesis de doctorado. Salamanca, España. Universidad de Salamanca, 210 p.
- TOVAR, J.; ALBARRACÍN, S. y LAREO, L. 2001. Predicción de la estructura y características bioquímicas de la acetato tioquinasa. *Universitas Scientiarum*, 6 (2): 27-33.
- TOVAR, J.; SAAVEDRA, F. y BRYON, 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.
- ZWINGMANN, C. and LEIBFRITZ, D. 2003. Regulation of glial metabolism studied by <sup>13</sup>C-NMR. *NMR Biomed*, 16: 370-399.

**Recibido:** 23-05-2005

**Aceptado:** 12-09-2005