
COMPARTIMENTACIÓN INTRACELULAR DEL ACETATO EN ASTROCITOS DURANTE LA PRELACTANCIA

J. Tovar-Franco, A. Salazar-Amado

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

El gasto energético es tan grande en el momento del nacimiento, que las neuronas no podrían sobrevivir sin el soporte metabólico de los astrocitos. Adicionalmente, la necesidad de neurotransmisores es tan alta en la prelactancia, que sin la colaboración metabólica de los astrocitos sería imposible mantener los niveles de intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbónicos para mantener su síntesis.

Este trabajo se enfocó en el estudio de los procesos metabólicos intracelulares de los astrocitos donde está involucrado el acetato para establecer su importancia en el metabolismo oxidativo y lipogénico durante la prelactancia. Se incubaron cultivos quiescentes de astrocitos neonatales de rata con acetato (5 mM), [1-¹⁴C]-acetato, [2-¹⁴C]-acetato y [U-¹⁴C]-acetato (1 μCi) (200-300 dpm/nmol). Adicionalmente, se utilizaron inhibidores enzimáticos como el dicloroacetato (1 mM) y el aminooxiacetato (5 mM), e inhibidores del transporte como el α-ciano-4-hidroxicinnamato (2 mM), butilmalonato (5 mM) y 1,2,3-bencenotricarboxilato (5 mM).

Los resultados en su conjunto indican que los astrocitos 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 [1-¹⁴C]-acetato una alta actividad anaplerótica sobre todo cuando los astrocitos requieren mantener los reservorios de oxalacetato y acetil-CoA para mantener la respiración. Estos resultados señalan a la acetil-CoA sintetasa mitocondrial (AceCS2), la piruvato carboxilasa (PC) y la enzima málica citosólica (cME), como enzimas claves para mantener el funcionamiento de los astrocitos en la prelactancia.

Con el uso de [2-¹⁴C]-acetato, los resultados sugieren que los astrocitos *in vitro* tienen un alto requerimiento de carbonos, principalmente para la síntesis de glutamina. Adicionalmente, la lipogénesis estaría soportada por dos rutas la vía del citrato y la vía de la acetil-CoA sintetasa citosólica (AceCS1).

Palabras clave: acetato, astrocitos, cerebro, lipogénesis, metabolismo, oxidación.

ABSTRACT

The neurons might not survive at the moment of birth with out the metabolic input of the astrocytes, due to the huge energy expenditure needed. In addition, the amount of neurotransmitters required during the presuckling period, cannot be achieved without the metabolic assistance of the astrocytes, since the levels of Krebs cycle intermediates must be kept at high concentrations for their synthesis at the required levels. The present study establishes the importance of acetate in the oxidative and lipogenic metabolism of

astrocytes, during the presuckling period. Quiescent neonatal rat astrocyte cultures were incubated with acetate (5 mM), [1-¹⁴C]-acetate, [2-¹⁴C]-acetate and [U-¹⁴C]-acetate (1 μCi) (200-300 dpm/nmol). The enzyme inhibitors used were dichloroacetate (1 mM) and aminooxyacetate (5 mM), while α-cyano-4-hydroxycinnamate (2 mM), butylmalonate (5 mM) and 1,2,3-benzotricarboxylate (5 mM) were used as transport inhibitors.

The oxidation and lipogenesis rates indicate that the astrocytes metabolize the acetate more as an oxidative than as a lipogenic substrate. This leads us to believe that the acetate is more important as an oxidative substrate, favoring carbon recycling during the presuckling period. With the use of [1-¹⁴C]-acetate it was clear that a high anaplerotic activity is attained when the astrocytes are required to maintain a reservoir of oxaloacetate and acetylCoA for the maintenance of respiration.

The results show that mitochondrial acetyl-CoA synthetase (AceCS2), pyruvate carboxylase (PC) and cytosolic malic enzyme (cME) are the key enzymes for the astrocytes maintenance during the presuckling period.

With the use of [2-¹⁴C]- acetate, the results suggest that astrocytes do have high carbon requirements for glutamine synthesis *in vitro*. The lipogenic metabolism is maintained by the citrate and cytoplasmic acetyl-CoA synthetase (AceCS1) pathways.

Key words: acetate, astrocytes, brain, lipogenesis, metabolism, oxidative.

INTRODUCCIÓN

En el momento del nacimiento, las reservas energéticas en la forma de glucógeno almacenado se consumen rápidamente, limitando la respiración y la síntesis de lípidos desde los carbohidratos por un período relativamente largo mientras se establece la normoglucemia. Este efecto es más crítico en el cerebro que requiere: un aumento de la síntesis de ATP para mantener la respiración de las neuronas; un aumento de la síntesis y mantenimiento de neurotransmisores y un aumento de la síntesis y mantenimiento de lípidos.

La síntesis de lípidos en el neonato es muy importante para mantener los requerimientos de metabolitos indispensables para la formación de estructuras celulares durante la proliferación. Este proceso es aun más crítico, en el cerebro donde en el momento del parto está aumentada la proliferación de astrocitos, el desarrollo de las prolongaciones celulares de las neuronas y el comienzo de la proliferación de los oligodendrocitos.

Otra función importante conferida a los astrocitos es su papel fundamental en la compartimentación de diferentes metabolitos con las neuronas. Las neuronas debi-

do a la transmisión sináptica liberan una serie de neurotransmisores al medio (glutamato, GABA, etc.). Este hecho trae consigo una disminución de la concentración de intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbóxicos, principalmente oxalacetato y α-cetoglutarato, que son fundamentalmente, precursores de neurotransmisores. En este sentido, estudios recientes han puesto de manifiesto que los astrocitos están implicados en el mantenimiento de los niveles de los intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbóxicos de las neuronas a través de la compartimentación intercelular del glutamato y la glutamina.

Se ha demostrado que las células cerebrales almacenan lactato justo antes del nacimiento y aprovechan estas reservas de lactato para mantener el metabolismo energético del cerebro. Además, el lactato es el precursor más importante para la oxidación y lipogénesis durante la prelactancia comparándolo con los valores reportados de otros sustratos como 3-hidroxi-butirato y glucosa (Tovar, 1995).

Por otro lado, el acetato ha sido uno de los sustratos menos estudiados durante la prelactancia, a pesar de existir evidencia suficiente de ser un sustrato energético y posiblemente lipogénico que ayudaría a

mantener desarrollo del sistema nervioso. Con relación al metabolismo del acetato en los astrocitos se han descrito dos isoformas de la enzima acetil-CoA sintetasa (AceCS), una citosólica y una mitocondrial, que catalizan la formación de acetil-CoA a partir de acetato y ATP, esta reacción se describe en dos pasos en el primero interactúa el acetato y ATP para formar un intermediario acetil adenilato activado, con la liberación simultánea de pirofosfato a continuación el grupo carboxilo es atacado por el grupo tiol de la CoA-SH, con lo que se desplaza el AMP y forma el acetil-CoA, molécula esencial utilizada en varias rutas metabólicas en las que se encuentran la oxidación en el ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA) y la síntesis de ácidos grasos y lanosterol (Taberner, 1993b). AceCS1 se ha reportado como una enzima citosólica y AceCS2 de expresión en matriz mitocondrial. Esta familia de enzimas que muestran una preferencia especial por el acetato, ya han sido aisladas y caracterizadas experimentalmente en modelos murinos, encontrándose con un peso molecular de 78 KDa para AceCS1 y 71 KDa para AceCS2 (Fujino, 2001). También se han reportado como moléculas muy conservadas y con una alta similitud que poseen motivos funcionales y estructurales como: ASN-glicosilación, fosforilación cAMP, fosforilación PKC, fosforilación CK2 y motivo de enlace al AMP (Tovar, 2001) lo que indica que sus mecanismos de regulación pueden estar influenciados por elementos de señalización en cascada; como fosforilación-defosforilación.

Este trabajo se enfocó en el estudio de los procesos metabólicos intracelulares de los astrocitos donde está involucrado el acetato para establecer su importancia en el metabolismo oxidativo y lipogénico durante la prelactancia. Con objeto de conocer el potencial del acetato, se alteraron *in vitro* los mecanismos de transporte de carbono entre la mitocondria y el citosol utilizando inhibidores enzimáticos y de transporte.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivos celulares. Cultivos primarios de astrocitos fueron preparados de cerebros de neonatos de un día de vida de ratas albinas Wistar, (Cole, 1989; McCarthy y De Vellis, 1980; Saneto, 1987a; Schousboe, 1980). Las células fueron sembradas en frascos Roux con una densidad de 9×10^5 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 fue suplementado con suero fetal bovino (FBS) (10%), ampicilina, estreptomina, anfotericina y penicilina a 37°C en un incubador con 5% de CO₂ (McCarthy y De Vellis, 1980). Después de un seguimiento morfológico hasta los 14 días, los frascos con cultivos quiescentes de astrocitos se destinaron a los experimentos metabólicos y a realizar el conteo celular.

Incubaciones. Se utilizaron como trazadores radiactivos el [U-¹⁴C]-acetato (ICN, 12019.6), [1-¹⁴C]-acetato (ICN, 12014.2), y [2-¹⁴C]-acetato (ICN, 12016.6), (1 µCi)(200-300 dpm/nmol) con acetato (5 mM) como sustrato frío en medio de incubación Elliott (pH 7.38) (Elliott, 1969; Albarracín, 2002). Adicionalmente, para estudiar el funcionamiento de las lanzaderas de carbono, es decir, aquellos mecanismos de transporte de carbonos entre la mitocondria y el citosol se usaron los inhibidores enzimáticos: dicloroacetato (DCA) (1mM) y aminoacetoacetato (AOA) (5mM), y de transporte: α-ciano-4-hidroxicinnamato (α-CN) (2mM), el butilmalonato (BM) (5mM) y el 1,2,3-bencenotricarboxilato (BT) (5mM), se tuvo en cuenta la concentración del inhibidor para ajustar la osmolaridad a valores cercanos a 315 mOsm/Kg H₂O.

A 1.5 ml de medio de incubación Elliott, con los respectivos sustratos fríos y/o inhibidor por frasco se adicionaron de acuerdo al experimento los trazadores radiactivos en las siguientes concentraciones: [U-¹⁴C]-acetato

(1 μ Ci); [1-¹⁴C]-acetato (1 μ Ci) y [2-¹⁴C]-acetato (1 μ Ci). De cada solución se tomaron 100 μ l para determinar la radiactividad inicial necesaria para calcular la actividad específica (dpm/nmol). 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 CO₂. Para capturar el dióxido de carbono marcado (¹⁴CO₂) producido durante la incubación, se empleó el método descrito por Sykes, con algunas modificaciones (Edmond, 1987; Sykes *et al.*, 1986b). Para capturar el ¹⁴CO₂ se utilizó un matraz Erlenmeyer que contiene un pocillo central donde se colocó un Eppendorf con 500 μ l de hidróxido de hiamina. En el pocillo principal se adicionó 100 μ l de KOH (10 M) después de lo cual se selló herméticamente con un tapón de goma.

Una vez finalizada la incubación sin retirar los tapones del frasco de cultivo, se extrajo con una jeringuilla el medio de incubación y se inyectó en el correspondiente matraz Erlenmeyer previamente preparado. Siempre con la ayuda de la misma jeringa, se lavó cada frasco de cultivo con PBS que posteriormente se recupera en su respectivo Erlenmeyer. 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 ¹⁴CO₂ 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 μ l de HClO₄ (5 M) en el matraz Erlenmeyer, con objeto de acidificar el medio y volatilizar el ¹⁴CO₂ que luego es atrapado 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 midieron las desintegraciones por minuto (dpm) después de al menos 24 horas utilizando la técnica de espectroscopia de centelleo líquido. La velocidad de respiración se reporta como nmol de carbonos incorporados a CO₂ /hora /millón de células.

Cuantificación de lípidos. Para realizar la determinación de la incorporación de los sustratos en lípidos totales, se siguió el método de Folch y col. (1957), con ligeras modificaciones (Tabernero, 1993a; Tovar, 1995). Las células se separaron de los frascos de cultivo con ayuda de un raspador y 2 ml de metanol y se recogieron en un tubo cónico que contenía 4 ml de cloroformo bidestilado. El tubo se agitó por 30 segundos y se almacenó durante 16 horas en el congelador. Posteriormente se centrifugó (1.500 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 carbono incorporado a lípidos/hora /millón de células.

Estadística. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado; se realizaron entre 3 réplicas con quintuplicado por experimento con cada uno de los trazadores y el sustrato frío en ausencia o presencia del inhibidor. El análisis de significatividad 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 de significatividad. Las comparaciones entre los diferentes tratamientos se hizo aplicando la prueba de Duncan para los experimentos cuyo F fue significativo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Utilización de [U-¹⁴C]-acetato, [1-¹⁴C]-acetato, [2-¹⁴C]-acetato por astrocitos

Los resultados obtenidos aparecen en la tabla 1 e indican una utilización del acetato por parte de los astrocitos tanto para la respiración como para la lipogénesis. Cabe recordar que se han reportado dos transportadores de monocarboxilatos MCT1 y MCT2 en el cerebro, siendo el MCT1 más abundante en la membrana plasmática de los astrocitos (Bröer, 1997; Hanu, 2000; Pierre *et al.*, 2000; Lin, 1998; Waniewski y Martin, 1998), lo que facilitaría el ingreso del acetato a las células para ser metabolizado.

Se observó que la velocidad de oxidación de [U-¹⁴C]-acetato es 3.6 y 2.7 veces más baja a la del [1-¹⁴C]-acetato y la del [2-¹⁴C]-acetato respectivamente. Estas diferencias fueron significativas ($p < 0.05$). Las diferencias en respiración entre [U-¹⁴C]-acetato y los otros dos radiomarcados posiblemente se deban a que cuando se utiliza el uniformemente marcado hay mayor probabilidad de perder carbonos vía glutamato y aspartato que cuando se usan cada uno independientemente. Cuando se utiliza [1-¹⁴C]-acetato las carboxilaciones se ven incrementadas, como un reflejo de la alta actividad anaplerótica. Las diferencias en respiración entre [1-¹⁴C]-acetato y [2-¹⁴C]-acetato, está reflejando una pérdida de carbonos principalmente de ¹⁴C2, vía síntesis de glutamato y aspartato o una salida de citrato de la mitocondria, ya que estos carbonos tienen mayor posibilidad de entrar por estas rutas como se puede ver en la figura 1.

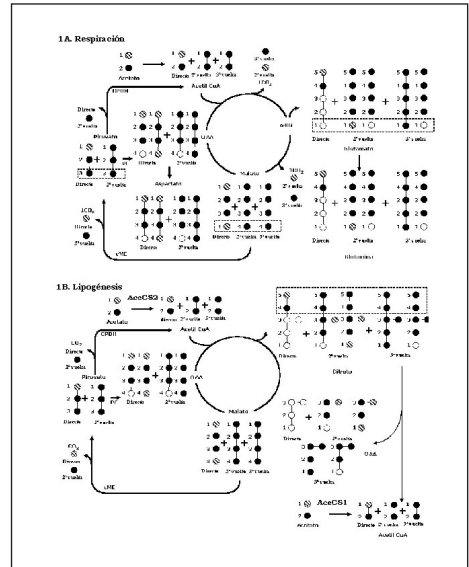


Figura 1. Destino de los carbonos marcados a partir de acetato en un astrocito.

En la figura aparecen los diferentes isotopómeros de cada uno de los principales sustratos que se pueden producir a partir de acetato uniformemente marcado, [U-¹⁴C]-acetato. A. Se resaltan las descarboxilaciones de los carbonos 1 (¹⁴C1) por acción de la enzima málica (cME) y el complejo piruvato deshidrogenasa (CPDH) en la primera vuelta en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) y en la segunda vuelta a través del TCA. Los carbonos 2 (¹⁴C2) se descarboxilan por acción de la enzima málica (cME) 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 glutamina quedan más marcados con ¹⁴C2, lo que disminuiría la posibilidad de ser detectados como CO₂ o como lípidos. B. Se resalta la contribución de los isotopómeros de citrato, nótese que quedan más marcados con ¹⁴C2, lo que aumentaría la posibilidad de tener acetil-CoA marcado en el citosol como precursor de lípidos.

Tabla 1.

Resumen de las velocidades de respiración y lipogénesis obtenidas a partir de la incubación con [U-¹⁴C]-acetato (AcU), [1-¹⁴C]-acetato (Ac1) y [2-¹⁴C]-acetato (Ac2) en astrocitos procedentes de cultivo primario en ausencia y presencia de inhibidores. DCA (dicloroacetato); AOA (aminoxiaacetato); α-CN (α-ciano-4-hidroxycinnamato); BM (butilmalonato); BT (1,2,3-bencenotricarboxilato).

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

Respiración						
Sustrato	Sin inhibidor	+ α- CN	+ DCA	+ AOA	+ BM	+BT
		*	*	*	*	*
AcU	1.18 ± 0.19	1.16 ± 0.03	0.81 ± 0.08	4.28 ± 0.46	8.14 ± 0.68	0.80 ± 0.11
		*	*	*	*	
Ac 1	4.26 ± 0.52	0.69 ± 0.08	3.61 ± 0.06	4.67 ± 0.36	11.23 ± 0.53	4.00 ± 0.38
		*		*		
Ac 2	3.27 ± 0.59	0.73 ± 0.10	2.87 ± 0.18	2.55 ± 0.28	5.03 ± 0.68	3.47 ± 0.37

Lipogénesis						
Sustrato	Sin inhibidor	+ α- CN	+ DCA	+ AOA	+ BM	+BT
		*	*	*	*	*
AcU	0.17 ± 0.03	2.01 ± 0.33	0.1 ± 0.01	0.61 ± 0.04	0.82 ± 0.11	0.23 ± 0.04
		*	*	*	*	
Ac 1	0.75 ± 0.06	1.24 ± 0.22	0.32 ± 0.04	0.51 ± 0.03	1.40 ± 0.19	0.67 ± 0.10
		*	*	*	*	*
Ac 2	1.77 ± 0.16	2.32 ± 0.36	1.03 ± 0.11	1.52 ± 0.19	1.45 ± 0.12	1.05 ± 0.10

En cuanto la lipogénesis, se observó que el [U-¹⁴C]-acetato es 4.4 y 10 veces más baja a la del [1-¹⁴C]-acetato y al [2-¹⁴C]-acetato respectivamente. Estas diferencias fueron significativas (p<0.05). La diferencia en la síntesis de lípidos indica que efectivamente mucho del carbono marcado desde [U-¹⁴C]-acetato se está fugando para la síntesis de glutamato. Adicionalmente, el incremento de la lipogénesis con [2-¹⁴C]-acetato indica que también hay un gran aporte de estos carbonos vía citrato ya que la posibilidad de tener estos carbonos marcados es más alta. Adicionalmente confirman la alta utilización del ¹⁴C2 del acetato por los astrocitos en trabajos previos donde se utilizó ¹³C2 del acetato (Lebon *et al.*, 2002).

De acuerdo con estos resultados se puede decir que los astrocitos en cultivo captan y metabolizan el acetato como sustrato oxidativo y lipogénico. Es evidente que los astrocitos utilizan más el acetato para respiración que para lipogénesis, sin embargo, el [1-¹⁴C]-acetato y el [2-¹⁴C]-acetato, no tienen la misma capacidad oxidativa y lipogénica, siendo los ¹⁴C1 más utilizados por vía oxidativa y los ¹⁴C2 más utilizados por vía lipogénica. Adicionalmente, cuando se incuba con [U-¹⁴C]-acetato hay una mayor probabilidad de que carbonos marcados recorran la vía de glutamato a glutamina que sería exportada al medio, que cuando se incuba con acetato marcado en ¹⁴C1 o en ¹⁴C2, reflejándose en el valor de

respiración con [U-¹⁴C]-acetato que dio menor a los obtenidos para [1-¹⁴C]-acetato y [2-¹⁴C]-acetato.

Los resultados evidencian la expresión de un transportador específico para el acetato en los astrocitos, también una alta actividad en las AceCSs y de las enzimas anapleróticas piruvato carboxilasa y enzima málica (mME), que mantendrían los reservorios de acetil-CoA mitocondrial y citosólico, favoreciendo la producción de ATP y lípidos, fundamentales durante la prelactancia.

Los resultados con [1-¹⁴C]-acetato demuestran una contribución importante de la piruvato carboxilasa (PC) y la malato deshidrogenasa-NADP dependiente (enzima málica mitocondrial, mME), sustentando los reportes que indican la presencia de estas enzimas en los astrocitos (Kurz, 1993; McKenna *et al.*, 1995; Vogel, 1998a; Vogel, 1998b). mME puede estar involucrada adicionalmente como una vía de protección de los astrocitos contra el estrés oxidativo, ya que produce NADPH requerido para la reducción del glutatión oxidado. Al catalizar la reacción de malato a piruvato y éste último a oxalacetato, se favorece el reflujo oxidativo a partir del reciclaje del piruvato que generaría la posibilidad de ser metabolizado vía CPDH. Se evidencia entonces, la habilidad anaplerótica de los astrocitos en respuesta a la demanda metabólica, debida a la necesidad extra de ATP y a la formación rápida de glutamina necesaria para mantener la actividad neuronal (Hassel, 2000a; Hassel, 2000b; Hassel, 2000c).

Efecto de diferentes inhibidores sobre la capacidad de utilización de [U-¹⁴C]-acetato, [1-¹⁴C]-acetato y [2-¹⁴C]-acetato por astrocitos en cultivo primario

En la tabla 1 se presentan los resultados de las velocidades de respiración y lipogénesis

de la incubación de astrocitos con [U-¹⁴C]-acetato, [1-¹⁴C]-acetato y [2-¹⁴C]-acetato sin y con los diferentes inhibidores.

El α -ciano-4-hidroxicinnamato (α -CN) ha sido reportado como un inhibidor específico de transportadores de monocarboxilatos. Para hacer estas comparaciones se tomaron los resultados con [U-¹⁴C]-acetato y [2-¹⁴C]-acetato que se hicieron en trabajos previos (Albarracín, 2002) y se compararon con los nuevos datos experimentales obtenidos con [1-¹⁴C]-acetato. Se encontró una disminución significativa ($p < 0.05$) en la respiración de los astrocitos y un incremento significativo ($p < 0.05$) en la lipogénesis. Estos resultados evidencian que el inhibidor no actúa a nivel de membrana plasmática pero sí sobre un transportador de monocarboxilatos a nivel de membrana mitocondrial como ha sido postulado anteriormente (Albarracín, 2002), no obstante, esta inhibición fue incompleta debido a que se observaron valores en la respiración. La caída en la respiración podría explicarse por la disminución tan significativa del aporte de acetil-CoA para mantener la respiración vía TCA y a la inhibición de la actividad anaplerótica que se evidencia al utilizar [1-¹⁴C]-acetato, pues disminuye significativamente el reservorio de malato, indicando a este sustrato como el limitante para la oxidación del acetato en los astrocitos.

Al integrar estos resultados con los de lipogénesis, se confirma que efectivamente hubo una disminución del citrato mitocondrial y que los datos obtenidos confirman la activación de la ruta de síntesis de lípidos vía acetil-CoA sintetasa citosólica (AceCS1) con los tres radioisótopos. Los resultados muestran una utilización mayor de ¹⁴C2, para la síntesis de lípidos que de ¹⁴C1. El hecho de que los lípidos con [1-¹⁴C]-acetato se vean disminuidos, posiblemente se puede explicar porque estos carbonos cuando entran por la ruta de síntesis de esteroides, tendrían mayor posibilidad de tener

descarboxilaciones en la reacción catalizada por la difosfomevalonato descarboxilasa que convierte mevalonato-3-fosfo-5-difosfato en isopentenil difosfato, ambos precursores de demosterol. Por otro, lado se ha reportado que en astrocitos en cultivo se sintetiza más demosterol que lanosterol (Taberner, 1993b), lo que favorecería estas descarboxilaciones adicionales.

Por otro lado, se utilizó el DCA el cual causa un incremento en la activación del complejo piruvato deshidrogenada (CPDH) acelerando la conversión de piruvato a acetil CoA. Los resultados indican que las velocidades de oxidación disminuyeron con [U-¹⁴C]-acetato, [1-¹⁴C]-acetato y [2-¹⁴C]-acetato con el DCA, siendo significativamente ($p < 0.05$) diferentes las dos primeras, en 1.4 y 8.6 respectivamente comparados con los sustratos sin inhibidor. Los resultados demuestran que al incrementar la actividad del CPDH, se induce la activación de la enzima málica mitocondrial (mME) para mantener las concentraciones del piruvato necesario para la síntesis de acetil-CoA indispensable para la respiración. Sin embargo, esta activación de la mME reduce la disponibilidad de oxalacetato para la síntesis de citrato. La incorporación de carbonos a lípidos se demuestra, ya que hubo disminución en los valores obtenidos con [U-¹⁴C]-acetato, [1-¹⁴C]-acetato y [2-¹⁴C]-acetato que disminuyeron significativamente ($p < 0.05$). Se refleja una inhibición en la velocidad del TCA sobre todo cuando se utiliza [2-¹⁴C]-acetato que es el sustrato que tiene mayor probabilidad de aportar carbonos para la síntesis de lípidos. El efecto de la AceSC1 no es tan marcado debido a que la AceSC2 tendría aumentada su actividad para ayudar a mantener los reservorios de acetil-CoA y oxalacetato en la mitocondria.

El aminoacetoacetato (AOA), un inhibidor de las aminotransferasas, tanto en el comparti-

miento citosólico como en el compartimiento mitocondrial tendría un efecto en las incubaciones de los astrocitos, principalmente sobre la aspartato aminotransferasa, que es un componente esencial de la lanzadera malato/aspartato, lo que afectaría el reciclaje de equivalentes de reducción en forma de NADH en los dos compartimentos, pero favorecería el incremento de las concentraciones mitocondriales de oxalacetato. Los resultados de respiración indican un aumento significativo ($p < 0.05$) con [U-¹⁴C]-acetato y [1-¹⁴C]-acetato en 3.62 y 1.09 veces respectivamente comparado con los sustratos sin inhibidor. Estos resultados demuestran que efectivamente se incrementó las concentraciones mitocondriales de oxalacetato favoreciendo la respiración en los astrocitos, este aumento sería apoyado por el reciclaje desde malato para la síntesis de piruvato. Esta última observación está apoyada por la observación del incremento de la respiración cuando se usó [1-¹⁴C]-acetato con AOA y soportan los resultados obtenidos con DCA donde se evidencia el caso contrario. En resumen, la concentración del oxalacetato es crítica y regularía el metabolismo del acetato en esta etapa del desarrollo de los astrocitos. El incremento con [1-¹⁴C]-acetato es un reflejo del incremento de la actividad anaplerótica promovido por el AOA aumentando las descarboxilaciones de ¹⁴C1. Por otra parte, la disminución en la oxidación del [2-¹⁴C]-acetato con AOA se debe a la pérdida de carbonos hacia la síntesis de glutamina pero no por la vía del aspartato aminotransferasa sino por la vía de la α -cetoglutarato deshidrogenasa, ya que la inhibición de la lanzadera activaría esta otra ruta para la síntesis de glutamato por incremento de los reservorios de α -cetoglutarato mitocondrial. En cuanto a la lipogénesis se observó un incremento significativo ($p < 0.05$) con [U-¹⁴C]-acetato con el AOA comparado con el mismo sustrato sin inhibidor. Este resultado soporta el incremento de la respiración en la mitocondria, que favorecería un au-

mento en la síntesis de citrato que saldría para la síntesis de lípidos, sin embargo, la disminución en la lipogénesis con los sustratos [1-¹⁴C]-acetato y [2-¹⁴C]-acetato, indican que el flujo de citrato hacia el citosol fue regulado por las concentraciones de oxalacetato mitocondrial, o que, la activación de la α -cetoglutarato deshidrogenasa favoreció más la salida de sustrato vía glutamina que vía citrato o posiblemente se disminuyeron las concentraciones de NADPH al disminuir las concentraciones de malato en el citosol disminuyendo la concentración de este cofactor necesario para la síntesis de lípidos. Estos resultados están resaltando que la principal ruta para la síntesis de glutamato como precursor de glutamina es la lanzadera aspartato/malato ya que al inhibirla, se observó una disminución significativa en la respiración y en la lipogénesis con [2-¹⁴C]-acetato.

Un resultado adicional que confirma la importancia de la lanzadera aspartato malato se obtuvo cuando se utilizó el butilmalonato (BM), un inhibidor del transporte de dicarboxilatos como malato y α -KG. Se pudo observar un incremento en la velocidad de oxidación con [U-¹⁴C]-acetato, [1-¹⁴C]-acetato y [2-¹⁴C]-acetato con el inhibidor de 6.8, 2.6 y 1.53 respectivamente, comparados con los sustratos sin inhibidor. El análisis de varianza revela diferencias significativas entre todos los valores de oxidación ($p < 0.05$). Estos resultados evidencian de nuevo que la concentración de oxalacetato es crítica para la utilización del acetato, ya que su incremento induce la activación de la AceSC2 para sintetizar acetyl-CoA y poder mantener la respiración. Los resultados con [1-¹⁴C]-acetato confirman los resultados con AOA y DCA, que indican una alta actividad anaplerótica. Los resultados con [2-¹⁴C]-acetato indican que la respiración fue activada al disminuir las posibles pérdidas de carbonos vía citrato, ya que la salida de este sustrato, está restringida sólo en un 54% (Meijer, 1974; Palmieri, 1972), favore-

ciendo las descarboxilaciones a través de las reacciones anapleróticas y a través del TCA. La incorporación del acetato a lípidos se incrementó significativamente ($p < 0.05$) con la utilización de BM en [U-¹⁴C]-acetato y [1-¹⁴C]-acetato en 4.8 y 1.8 veces respectivamente comparado con los sustratos sin inhibidor. Estos incrementos confirman activación de la AceSC1, ya que la contribución del citrato para la síntesis de lípidos se ve restringida. Adicionalmente, hay que tener en cuenta que al restringir la salida de citrato se está restringiendo la lanzadera citrato/piruvato disminuyendo la capacidad para reducir NADP⁺ vía enzima málica citosólica (cME) que se ha reportado que es más activa (95%) en este compartimiento de los astrocitos (Vogel, 1998a; Vogel, 1998b). También existe la posibilidad que se restrinja la salida de isocitrato que restringiría también la capacidad para reducir NADP⁺ vía isocitrato deshidrogenasa-NADP dependiente. La pequeña disminución en la lipogénesis a partir de [2-¹⁴C]-acetato es explicable si se tiene en cuenta disminución de la capacidad para reducir NADP⁺ en el citosol.

Adicionalmente se evaluó el efecto de la inhibición del transporte de citrato utilizando el 1,2,3-benceno tricarboxilato (BT). Los resultados indican una disminución de la oxidación con [U-¹⁴C]-acetato y con [1-¹⁴C]-acetato con inhibidor, comparados con los sustratos sin inhibidor y se mantuvo con [2-¹⁴C]-acetato con inhibidor. El análisis de varianza no reveló diferencias significativas entre los valores de oxidación para los sustratos [1-¹⁴C]-acetato y [2-¹⁴C]-acetato con y sin inhibidor, los demás sustratos presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$). Los resultados demuestran una pequeña disminución en la oxidación, debido a que las concentraciones de citrato en la mitocondria están aumentadas. Se sabe que la acumulación de citrato inhibe la citrato sintasa, por lo tanto, inhibe parcialmente el TCA e indirectamente la anaplerosis al

no sintetizarse suficiente malato, este hecho se confirma con los resultados con [2-¹⁴C]-acetato que reflejan una disminución en la actividad anaplerótica, mientras los resultados con [1-¹⁴C]-acetato indican que, al inhibir el escape de carbonos vía citrato se recuperan ¹⁴C₂ para ser oxidados en el TCA. En cuanto a lipogénesis se observó un pequeño aumento con [U-¹⁴C]-acetato, evidenciándose que se activó la AceCS1 para la lipogénesis, ya que aparentemente, al inhibir la salida de citrato el astrocito recurre a esta ruta para el mantenimiento de la misma. Los resultados con [2-¹⁴C]-acetato están resaltando la importancia que podría tener esta ruta lipogénica durante la prelactancia, ya que al verse restringida la síntesis de lípidos vía citrato, la AceSC1 sería la encargada del mantenimiento de aproximadamente el 50% de la lipogénesis de los astrocitos. No obstante, existe la posibilidad que se inhiba la capacidad para reducir NADP⁺ al inhibir la salida de citrato inhibiendo la lanzadera citrato/piruvato y la salida de isocitrato, que inhibiría también vía isocitrato deshidrogenasa-NADP dependiente, teniendo un efecto sobre la capacidad de síntesis de lípidos. Aparentemente esta dependencia de NADPH no sería muy importante, ya que las lipogénesis aumentaron o se mantuvieron cuando se utilizó BM, BT y α -CN posiblemente debido a que existe un reservorio importante de este cofactor en los astrocitos o se activarían otras reacciones que lo suplementarían.

CONCLUSIONES

Los resultados del presente trabajo, indican que los astrocitos pueden metabolizar acetato más como sustrato energético que lipogénico, lo que permite pensar que este sustrato puede llegar a ser importante para ayudar a mantener el metabolismo oxidativo, favoreciendo el reciclaje de carbonos en la prelactancia. Adicionalmente, se evidenció con el uso de [1-¹⁴C]-acetato una alta activi-

dad anaplerótica sobre todo cuando los astrocitos requieren mantener los reservorios de oxalacetato y acetyl-CoA para mantener la respiración. Estos resultados señalan a la acetyl-CoA sintetasa mitocondrial (AceCS2), la piruvato carboxilasa (PC) y la enzima málica citosólica (cME), como enzimas claves para mantener el funcionamiento de los astrocitos en la prelactancia. Con el uso de [2-¹⁴C]-acetato, los resultados sugieren que los astrocitos tienen un alto requerimiento de carbonos, principalmente para la síntesis de glutamina. A pesar de que los resultados indican que en los astrocitos 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 acetyl-CoA sintetasa citosólica (AceCS1) si hay deficiencia de citrato.

La utilización de [U-¹⁴C]-acetato y [2-¹⁴C] confirma que en los astrocitos es prioritaria la síntesis de glutamina, ya que se demuestra una salida de carbonos del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), como citrato para la síntesis de lípidos y α -cetoglutarato para la síntesis de glutamato (precursor de glutamina). Parece que los astrocitos *in vitro*, al no tener una fuente de glutamato intercelular, favorecen su síntesis intracelular para mantener la exportación de glutamina, confirmándose que la lanzadera del aspartato/malato es la principal ruta para la síntesis de glutamato en los astrocitos, y que la inhibición de esta ruta posiblemente activa la glutamato deshidrogenasa para mantener la exportación de glutamina de la célula.

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. 2002. *Metabolismo del [U - ^{14}C]-acetato y del [2 - ^{14}C]-acetato en astrocitos y en astrocitoma C_6* . Tesis de maestría. Programa de posgrado. Pontificia Universidad Javeriana: Bogotá. 170 p.
- BRÖER, S.; RAHMAN, B.; PELLEGRINI, G.; PELLERIN, L.; MARTIN, J.; VERLEYSDONK, S.; HAMPRECHT, B. and MAGISTRETTI, P. 1997. Comparison of lactate transport in astroglial cells and monocarboxylate transporter 1 (MCT 1) expressing *Xenopus laevis* oocytes. Expression of two different monocarboxylate transporters in astroglial cells and neurons. *J Biol Chem*, 272: 4830096-4830102.
- COLE, R. and De VELLIS, J. 1989. Preparation of astrocyte and oligodendrocyte cultures from primary rat glial cultures. In: *A Dissection and Tissue Culture Manual of the Nervous System*. A. Shahar, De vellis, J., Vernadakis, A. and Haber, B., eds. Alan R. Eds. Liss Inc. New York, NY. 121-133.
- EDMOND, E.; ROBBINS, R., BERGSTROM, J., COLE, R. And DE VELLIS, J. 1987. Capacity for substrates utilization in oxidative metabolism by neurons, astrocytes and oligodendrocytes from developing brain in primary culture. *J Neurosci Res*, 18: 551-561.
- ELLIOTT, K. 1969. The use of brain slices. In: *Handbook of neurochemistry*. Ed. A. Lajtha. Plenum Press. New York, NY, vol. 2, 103-115.
- FUJINO, T., KONDO, J., ISHIKAWA, M., MORIKAWA, K. and YAMAMOTO, T. 2001. Acetyl-CoA synthetase 2, a mitochondrial matrix enzyme involved in the oxidation of acetate. *J Biol Chem*, 276: 11420-11426.
- 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: C921-C930.
- HASSEL, B. and Brathe, A. 2000a. Neuronal pyruvate carboxylation supports formation of transmitter glutamate. *Neurosci* 20: 1342-1347.
- HASSEL, B. 2000b. Carboxylation and anaplerosis in neurons and glia. *Neurobiol* 22: 21-40.
- HASSEL, B. and Brathe, A. 2000c. Cerebral metabolism of lactate *in vivo*: evidence for neuronal pyruvate carboxylation. *Neurosci*, 20: 327-336.
- KURZ, G. M., WIESINGER, H., and HAMPRECHT, B. 1993. Purification of cytosolic malic enzyme from bovine brain, generation of monoclonal-antibodies, and immunocytochemical localization of the enzyme in glial-cells of neural primary cultures. *J Neurochem*, 60: 1467-1474.
- LEBON, V., PETERSEN, G., CLINE, G., SHEN, J., MASON, G., DUFOUR, S., BEHAR, K., SHULMAN, G. and ROTHMAN, D. 2002. Astroglial contribution to brain energy metabolism in humans revealed by ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy: elucidation of the dominant pathway for neurotransmitter glutamate repletion and measurement of astrocytic oxidative metabolism. *J Neurosci*, 22: 1523-1531.
- 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: 28959-28965.
- MCCARTHY, K. D. 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., TILDON, J., STEVENSON, H., HUANG, X. and KINGWELL, K. 1995. Regulation of mitochondrial and

- cytosolic malic enzymes from cultured rat brain astrocytes. *Neurochem Res*, 20: 1491-1501.
- MEDINA, J., TABERNERO, J., TOVAR, J. AND MARTIN-BARRIENTOS, J. 1996. Metabolic fuel utilization and pyruvate oxidation during the postnatal period. *J Inher Metab Dis*, 19: 432-442.
- MEIJER, A. and VAN DAM, K. 1974. The metabolic significance of anion transport in mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 346: 213-244.
- PALMIERI, F., STIPANI, I. and QUAGLIARIELLO, E. 1972. Kinetic study of the tricarboxylate carrier in rat liver mitochondria. *Eur J Biochem*, 26: 587-594.
- PIERRE, K., PELLERIN, L., DEBERNARDI, R., RIEDERER, B. and MAGISTRETTI, P. 2000. Cell-specific localization of mono-carboxylate transporter, MCT1 and MCT2, in the adult mouse brain revealed by double immunohistochemical labeling and confocal microscopy. *Neuroscience*, 100: 617-627.
- SANETO, R. and DE VELLIS, J. 1987a. Neuronal and glial cells: Cell culture of the central nervous system. In: *Neurochemistry a Practical Approach*. J. Turner & H.S. Bachelard. Eds. IRL Press, 27-64.
- SCHOUSBOE, A. 1980. Primary cultures of astrocytes from mammalian brain as a tool in neurochemical research. *Cel Mol Biol*, 26: 505-513.
- SYKES, J., LÓPEZ-CARDOSO, M. and VAN DEN BERGH, S. 1986b. Substrate utilization for energy production and lipid synthesis in oligodendrocyte-enriched cultures prepared from rat brain. *Neurochem Int*, 8: 67-75.
- TABERNERO, A. 1993a. 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. Salamanca España. 186 p.
- TABERNERO, A., BOLAÑOS, J. and MEDINA, J. 1993b. 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 Ciencias Químicas. 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: 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.
- VOGEL, R., HAMPRECHT, B. and 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. and 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. and MARTIN, D. 1998. Preferential utilization of acetate by astrocytes is attributable to transport. *J Neurosci*, 14: 5225-5233.

Recibido: 23-05-2005

Aceptado: 12-09-2005