

Descarboxilación extramitocondrial del piruvato en cerebro de rata

Extramitochondrial pyruvate decarboxylation in rat brain

MARTÍN-BARRIENTOS, J.; ALONSO, M. A. y MEDINA, J. M.

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Farmacia. Universidad de Salamanca. Edificio Departamental. Avda. Campo Charro, s/n. 37007 Salamanca. España.

RESUMEN

Hemos investigado la presencia de una actividad de piruvato descarboxilasa (PDC) (2-oxoácido carboxilasa; EC 4.1.1.1.) en cerebro de rata durante el periodo perinatal, basándonos en trabajos previos sobre síntesis de acetilcolina, síntesis de lípidos en cerebro de rata y en resultados obtenidos en nuestro laboratorio con inhibidores de aminotransferasas. Así, hemos detectado una actividad de piruvato descarboxilasa, con características similares a la descrita en levaduras. La actividad es extramitocondrial, presenta una cinética sigmoidal con respecto al piruvato, es resistente al calentamiento a 60 °C y se inhibe por exceso de acetaldehído y por glioxilato. Durante los dos últimos días de la gestación la PDC cuadruplica su actividad y decrece después del nacimiento, hasta llegar a los valores del adulto, que representan la mitad de los correspondientes al cerebro de feto a término.

Palabras clave: Cerebro. Piruvato. Piruvato descarboxilasa.

ABSTRACT

On the basis of previous work on acetylcholine and lipid synthesis and results obtained with aminotransferase inhibitors in our laboratory, we have studied a pyruvate decarboxylase activity (PDC) (2-oxoacid carboxylase; EC 4.1.1.1.) from rat brain during the perinatal period. We have found an extramitochondrial PDC activity similar to described yeast PDC. That enzyme activity showed sigmoidal kinetic with pyruvate maintaining full activity after heating at 60 °C and it also was inhibited by acetaldehyde or glyoxylate. Therefore, that activity increased immediately before birth decreasing quickly in the early extrauterine life and even more in the adult.

Key words: Brain. Pyruvate. Pyruvate decarboxylase.

Recibido: 12-12-96.

Aceptado: 20-12-96.

BIBLID [0004-2927(1996) 37:4; 729-738]

INTRODUCCIÓN

La piruvato descarboxilasa (PDC) (2-oxoácido carboxilasa; EC 4.1.1.1.) cataliza la descarboxilación no oxidativa, de piruvato y otros oxoácidos, dando el correspondiente aldehído y CO₂. Es una liasa TPP-dependiente de localización citosólica. La PDC de levaduras ha sido estudiada, aislada y purificada por varios grupos de investigadores. Hess y Boiteux (1), encontraron que la PDC tiene propiedades alostéricas, con un grado de cooperatividad dependiente de la concentración de fosfato. Así, se obtiene una relación sigmoidal entre la velocidad de la reacción enzimática y la concentración de sustrato (2). La PDC mantiene su actividad aún después de ser sometida a un calentamiento a 60 °C durante 30 minutos (3,4). También cataliza una condensación aldólica entre dos moléculas de acetaldehído, formándose acetoína (5,6). La enzima posee dos sitios de unión para el acetaldehído en su centro activo: el primero une acetaldehído e inhibe, de manera no competitiva, la descarboxilación del piruvato; el segundo acepta una molécula de acetaldehído para la reacción de condensación. Un inhibidor descrito para piruvato descarboxilasa de levaduras es el ácido glioxílico; en su presencia se produce la descarboxilación pero no se libera el aldehído correspondiente (7). Pero aunque la vía principal de descarboxilación del piruvato es la formación de acetil-CoA, catalizada por el complejo enzimático mitocondrial de la piruvato deshidrogenasa, Lefresne y col. (8,9), estudiando la síntesis de acetilcolina en sinaptosomas de rata, apuntaron la posibilidad de la existencia de alguna enzima que permitiera la formación de acetil-CoA, en el citosol, a partir de piruvato. Además, Patel y Clark (10), al estudiar la síntesis de lípidos en cerebro de ratas lactantes, utilizando inhibidores de aminotransferasas y del transportador de monocarboxilatos de la membrana mitocondrial, encontraron una lipogénesis residual que únicamente podría ser explicada por la existencia, en el citosol, de una vía de transformación de piruvato en acetil-CoA. Por otra parte, resultados obtenidos en nuestro laboratorio, referentes a cerebro de rata durante el período perinatal, y realizados con inhibidores de aminotransferasas y del transportador de citrato, hacen pensar también en la posible existencia de una enzima con actividad similar a la piruvato descarboxilasa estudiada de levaduras (11).

El objetivo de nuestro trabajo fue la caracterización de una actividad de piruvato descarboxilasa en el cerebro de rata y su evolución durante el período perinatal.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se emplearon ratas albinas Wistar de distintas edades, que se alimentaron

ad libitum con una dieta sólida estándar (17% de proteínas, 3% de lípidos, 58,7% de glúcidos, 4,3% de celulosa, 5% de minerales y 12% de humedad) y con acceso libre al agua de bebida. La edad gestacional de la rata se controló limitándose a una noche el tiempo de cohabitación de ratas vírgenes con machos. A la mañana siguiente se separaron aquellas que presentaban en el frotis vaginal espermatozoides, acompañados de células epiteliales de la vagina. Teniendo en cuenta que la duración media de la gestación en la rata es de 21,7 días, a los fetos de 21,5 días de gestación, los hemos considerado "a término". Las ratas gestantes se sacrificaban por dislocación cervical, posteriormente se extraían los fetos por cesárea y se sacrificaban éstos, extrayéndoseles los cerebros inmediatamente. El cerebro de rata adulta se extraía tras dislocación cervical, y se trataba de modo similar a los de los fetos. Una vez extraídos los cerebros, se pesaban, se troceaban y se colocaban, en proporción 1/3 (p/v), en una solución amortiguadora isotónica compuesta por $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{KOH}$ 0,2M pH 7,4 y sacarosa 0,25M.

Seguidamente se homogeneizaba la muestra en un potter mecánico y el homogenado resultante se centrifugaba a 30.000 x g durante 25 minutos, a 4 °C. Al sobrenadante obtenido se le añadía 1% de PMSF 36 mM como inhibidor de proteasas. Si el sobrenadante no era utilizado inmediatamente se congelaba y mantenía a -20 °C hasta el momento de su utilización. En algunos de los experimentos realizados se utilizó muestra mantenida a 60 °C durante 30 minutos. Para este tratamiento la muestra se mezclaba con solución amortiguadora $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{KOH}$ 0,2 M, pH 6,5 (concentración final 45 mM), MgCl_2 (6 mM), TPP (0,8 mM) y DTT (6 mM). Después de transcurrido el tiempo indicado, los tubos se mantenían en hielo 15 minutos, se centrifugaban y se recogía el sobrenadante. La actividad de la piruvato descarboxilasa se midió a través de la formación de acetaldehído, etanol y, sobre todo, acetato, teniendo en cuenta que el acetaldehído puede ser transformado en acetato por una reacción irreversible. La incubación de las muestras se realizó (excepto cuando se indiquen otras condiciones), de la siguiente manera: Se preincubaban con solución amortiguadora $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{KOH}$ (concentración final 45 mM) pH 6,5, Mg_2Cl (3,5 mM), TPP (0,5 mM), DTT (3,5 mM) y albúmina (1%) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después se añadía el sustrato: piruvato (45mM) y se incubaban a 30 °C. Según el caso se añadían, o no, a la mezcla de incubación distintos efectores. La reacción se paraba con ácido perclórico, se centrifugaba y se neutralizaba el sobrenadante, en el que posteriormente se medían acetaldehído, etanol y acetato.

El acetaldehído y el etanol producidos se valoraron en la reacción catalizada por la alcohol deshidrogenasa, según el método descrito por Beutler, (12,13) adaptado por nosotros para fluorimetría. El acetato se midió por la reacción catalizada por la acetato kinasa, siguiendo el método descrito por Holz (14). La concentración proteica de las muestras se calculó según el método de

Markwell (15) y la glutamato deshidrogenasa, marcadora de mitocondrias, se midió según el método descrito por Schmidt y Schmidt (16). Para comparar los datos y analizar la significatividad se utilizó el test "t" de Student.

RESULTADOS

En la bibliografía existente sobre piruvato descarboxilasas, mayoritariamente referida a estudios realizados en levaduras, la actividad de la enzima se mide por la desaparición del NADH en la formación de etanol. Los sobrenadantes utilizados por nosotros, libres de mitocondrias, como se comprobó por la actividad de GIDH, son muy complejos, porque tienen una alta actividad de lactato deshidrogenasa, aminotransferasas y otras enzimas que también utilizan NADH. Por esta razón, hemos desarrollado un método basado en la valoración de los productos formados, y no en la desaparición de NADH. Teniendo en cuenta que la producción de acetato comprende dos reacciones consecutivas, catalizadas por PDC y AIDH, respectivamente, hemos medido el acetato formado utilizando un medio de incubación con los cofactores y requerimientos para las dos reacciones y, además, acetato kinasa. Teniendo en cuenta que la PDC estudiada en levaduras y otros organismos es termoestable; nosotros mantuvimos nuestra muestra a 60 °C durante 30 minutos, y pudimos comprobar que se mantenía la actividad de descarboxilación de piruvato.

En muestras tratadas a 60 °C 30 minutos, se midió la actividad de la PDC por el acetaldehído producido a lo largo del tiempo de incubación. La figura 1 muestra los resultados obtenidos. Puede observarse una linealidad hasta los 5 minutos de incubación; después desaparece la linealidad e, incluso, se detecta una inhibición de la PDC.

El ácido glioxílico es un inhibidor descrito en piruvato descarboxilasa de levaduras, que provoca la inhibición uniéndose al sitio activo e impidiendo la liberación de producto. La figura 2 representa el efecto del glioxilato en la producción de acetaldehído por piruvato descarboxilasa de cerebro de rata, en fetos a término; en ella se pone de manifiesto una clara inhibición de la producción de acetaldehído, durante los primeros 5 minutos de incubación.

En muestra tratada a 60 °C durante 30 minutos, se midió la actividad de la PDC por el acetato producido a lo largo del tiempo de incubación. En todos los experimentos llevados a cabo con este tipo de muestra, se incluyó en la mezcla de incubación AIDH, ya que no teníamos la seguridad de que no se hubiera inactivado por el calentamiento. La figura 3 representa el acetato producido a lo largo del tiempo de incubación (figura 3a) de incubación y en relación con la cantidad de muestra, expresada en cantidad de proteína (figura 3b). En ambos casos se observa una relación lineal. Como muestra la figura 4, el

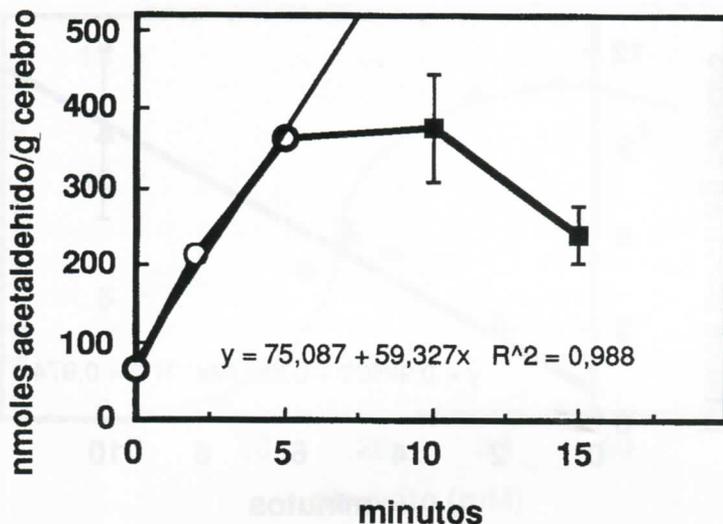


Fig. 1.—Variación de la producción de acetaldéhid con respecto al tiempo de incubación. La muestra se obtuvo de cerebro de fetos de 21,5 días de gestación, mantenida previamente a 60 °C 30 minutos. Los resultados son medias \pm SEM de 3 a 5 experimentos distintos. La ecuación corresponde a la recta de regresión de los valores representados en círculos blancos.

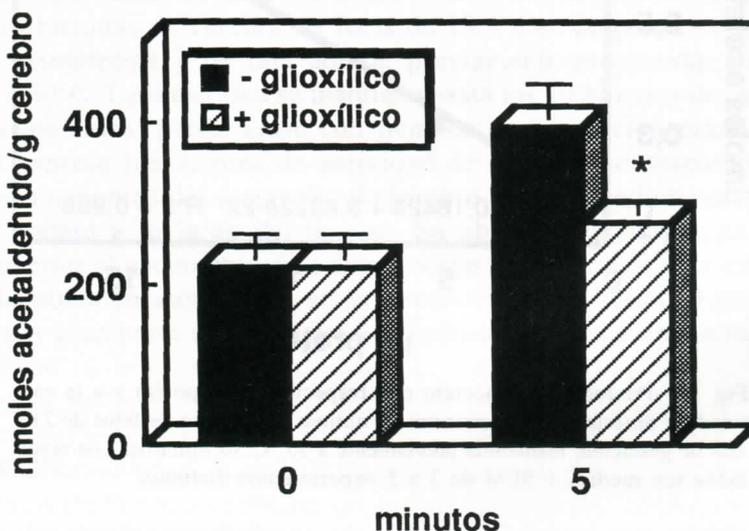


Fig. 2.—Efecto del ácido glioxílico en la producción de acetaldéhid. La muestra se obtuvo de cerebro de fetos de 21,5 días de gestación. La concentración de glioxilato fue de 50 mM y el tiempo de incubación 5 minutos. Los resultados son medias \pm SEM de 3 a 4 experimentos distintos.*:p<0,05.

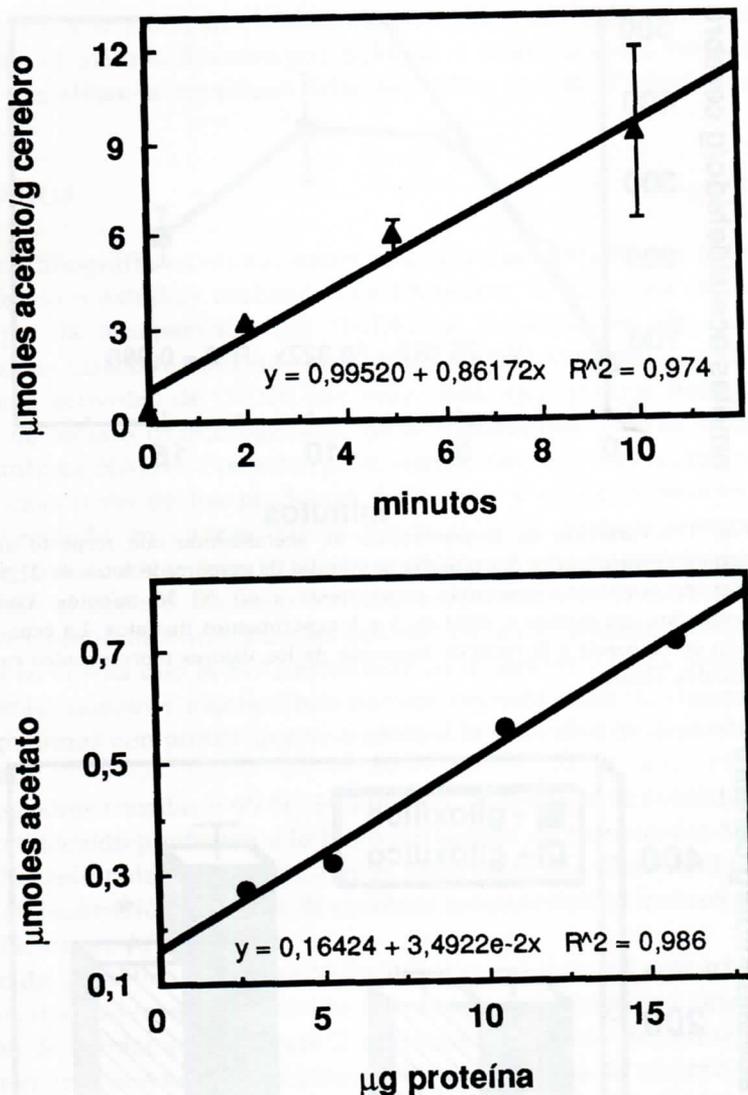


Fig. 3.—Producción de acetato con respecto al tiempo (a) y a la cantidad de muestra (b). La muestra se obtuvo de cerebro de fetos de 21,5 días de gestación, mantenida previamente a 60 °C 30 minutos. Los resultados son medias \pm SEM de 3 a 5 experimentos distintos.

efecto de la variación en la concentración de sustrato sigue una cinética sigmoideal. El coeficiente de Hill es mayor que la unidad, lo que indica cooperatividad positiva para el piruvato. La saturación parece conseguirse a concentraciones de piruvato de alrededor de 40mM.

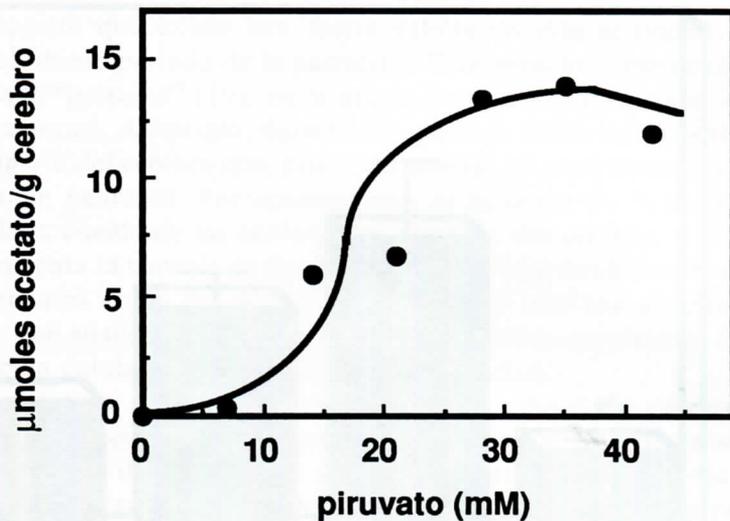


Fig. 4.—Efecto de la concentración de piruvato sobre la producción de acetato. La muestra se obtuvo de cerebro de fetos de 21,5 días de gestación, mantenida previamente a 60 °C 30 minutos. El tiempo de incubación fue de 3 minutos.

Se estudió, también, la producción de acetato con respecto al tiempo en muestras obtenidas de cerebro de fetos de 19,5 días de gestación, de un día de vida extrauterina y de rata adulta, previamente mantenidas durante 30 minutos a 60°C. La linealidad se mantiene hasta los 10 minutos de incubación, en todos los casos, perdiéndose con tiempos de incubación más largos. La figura 5 expresa los valores de actividad de la piruvato descarboxilasa en diferentes momentos del desarrollo de cerebro de rata, medida por la producción de acetato a lo largo del tiempo. Se observa claramente un aumento brusco anterior al nacimiento, una disminución al iniciarse la vida extrauterina y una disminución aún mayor en el cerebro de rata adulta. Esta pauta es seguida por gran parte de las enzimas estudiadas en mamíferos a lo largo del desarrollo.

DISCUSIÓN

Una vez que las condiciones experimentales estuvieron establecidas, sobre todo en lo referente a la medida de la actividad de piruvato descarboxilasa por la producción de acetato, la enzima se caracterizó mediante el estudio de la cinética respecto al tiempo (fig. 3a), la concentración de enzima (fig. 3b) y la concentración de sustrato (fig. 4). El comportamiento de la enzima con

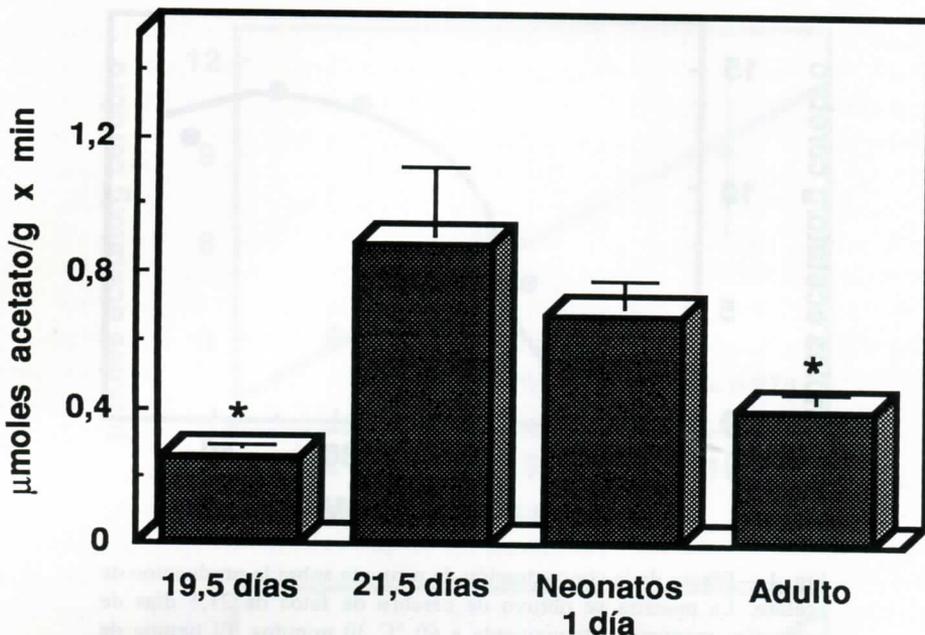


Fig. 5.—Producción de acetato por cerebro de rata en diferentes estadios del desarrollo.
 *: $p < 0,05$, en comparación con los fetos de 21,5 días de gestación.

respecto a la concentración de sustrato es de tipo sigmoideal saturándose, aproximadamente, a concentraciones de piruvato 40mM y el cálculo del coeficiente de Hill indica cooperatividad positiva. Esta cinética coincide, bastante aproximadamente, con la descrita para la enzima de levaduras, en la que la saturación se alcanza a concentraciones de piruvato de aproximadamente 30 mM (7,17). Otra coincidencia con enzimas de levaduras fue la resistencia de la enzima de cerebro a la temperatura, característica bien conocida de esta enzima de otros orígenes (3). La síntesis de acetaldehído catalizada por la PDC resultó ser lineal durante los primeros 5 minutos, a partir de los cuales hay una estabilización de la cantidad de acetaldehído producido, seguida de una inhibición a partir de los 10 minutos (fig. 1). Este hecho puede ser explicado por la existencia de una inhibición de la enzima por el producto acumulado en el medio de reacción (6). Asimismo, la enzima de cerebro se inhibió por la presencia de glioxilato, siendo esta inhibición ostensible pasados 5 minutos de incubación con el inhibidor (fig.2). La inhibición por glioxilato es otra característica coincidente con la enzima de levaduras (18).

Por otra parte, la actividad detectada en el cerebro de feto de 19,5 días de gestación es considerable y casi se cuadruplica justo antes del nacimiento,

lo que sugiere que existe una fuerte subida de esta actividad enzimática durante el último período de la gestación. Este período coincide con la etapa denominada "parto" (19), en la que el feto se prepara para el acceso a la vida extrauterina. Asimismo, durante este período existe un aumento ponderal extraordinario del cerebro que, histológicamente, se caracteriza por una fuerte proliferación neuronal. Por consiguiente, el aumento de la actividad de la enzima daría cuenta de las necesidades plásticas del cerebro, al permitir una vía "extra" para la síntesis de lípidos. De hecho, la actividad de la enzima cae en los neonatos de un día de vida extrauterina y más aún alcanzada la vida adulta, lo que añade significado fisiológico a nuestros resultados, dado que la proliferación celular es mínima en el cerebro adulto.

La existencia de actividad de PDC en el citosol de cerebro, permite sugerir la existencia de una vía extramitocondrial de síntesis de acetil-CoA, presumiblemente destinado a la síntesis de lípidos (10). La vía completa consistiría en la transformación de piruvato en acetato, catalizada por la PDC, seguida de la conversión del acetato formado en acetil-CoA, mediante la reacción catalizada por la acetil-CoA sintetasa. Desde el punto de vista energético, la conversión de piruvato en acetil-CoA por esta vía, requeriría el equivalente a 2 ATP por molécula de piruvato transformada. Sin embargo, este gasto de ATP no es excesivo, si tenemos en cuenta que la vía mitocondrial gasta 1 ATP a nivel de la citrato liasa. Por otro lado, la vía citoplasmática tiene la ventaja de ser exclusivamente lipogénica, por lo que el piruvato que toma la vía extramitocondrial no será oxidado en el ciclo tricarbólico. Finalmente, la existencia de la vía extramitocondrial explica la importancia del lactato como sustrato del cerebro en desarrollo (11,20,21,22,23, ver 24 para revisión). En efecto, la existencia de dicha vía, permitiría altos rendimientos en la transformación del lactato en lípidos. De hecho, los lípidos, tanto fosfolípidos como esteroides, son uno de los principales destinos del lactato en cerebro. (11,21,22). Según estos resultados, el metabolismo del lactato en el cerebro implicaría la existencia de una enzima ad hoc, diseñada para la rápida utilización de este importante sustrato perinatal.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) HESS B., BOITEUX, A.: In: "Regulatory Functions of Biological Membranes" (1968), pp. 149, Elsevier, Amsterdam.
- (2) LEHMAN, H., FISCHER, G., HÜBNER, G., KOHNERT, K.-D., SCHELLENBERGER A.: *Eur J Biochem* (1973), **32**: 83-87.
- (3) FARRENKOPF, B., JORDAN F.: *Prot Expres Purif* (1992), **3**: 101-107.
- (4) KUO, D., DIKDAN, G., JORDAN F.: *J Biol Chem* (1986), **261**: 3316-3319.
- (5) CHEN, G., JORDAN F.: *Biochemistry* (1984), **23**: 3576-3582.
- (6) STIVERS, J., WASHABAUGH M.: *Biochemistry* (1993), **32**: 13472-13482.