

\$ 15000 =

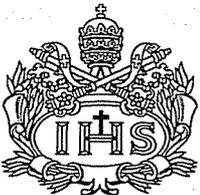
UNIVERSITAS SCIENTIARUM

REVISTA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS

Volumen 8, N° 1: Enero-Junio de 2003

Esta Revista está indexada y referenciada
en Chemical Abstracts (CA)

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA





EFFECTO DE LA UTILIZACIÓN DE DIFERENTES SUSTRATOS COMPARTIMENTADOS POR NEURONAS Y ASTROCITOS, SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE CALCIO EXTRA E INTRACELULAR

Elsa Guzmán de Aristizábal, Jairo Alfonso Tovar Franco

Laboratorio de Neurobioquímica. Departamento de Nutrición y Bioquímica. Facultad de Ciencias,
Pontificia Universidad Javeriana, Carrera 7 N° 43-82. Bogotá.

E-mail: eguzman@javeriana.edu.co; jatovar@javeriana.edu.co

RESUMEN

El mecanismo de intercambio de sustratos entre neuronas y astrocitos, no es claro y menos claro es, si los efectos metabólicos en las células receptoras, son resultado de señalización por calcio. Se plantea la posibilidad de que existan señales entre neuronas y astrocitos que relacionen su funcionamiento metabólico a través de las concentraciones de calcio. La concentración de calcio se midió por absorción atómica en el medio intra y extracelular de cultivos primarios de neuronas y astrocitos y posteriormente en el medio intra y extracelular después de una hora de incubación con lactato, glutamato, glutamina y acetato a concentraciones fisiológicas. Las comparaciones estadísticas se efectuaron con ANOVA y Duncan ($p < 0.05$). Se hicieron 3 repeticiones de cada experimento con 5 repeticiones. Los resultados permiten afirmar que al hacer incubaciones *in vitro* con los sustratos, se producen variaciones en las concentraciones de calcio extra e intracelular. El estrés metabólico puede estar influyendo en estas variaciones. Adicionalmente, se demuestra que los astrocitos son menos dependientes del calcio extracelular que las neuronas. Las variaciones del calcio intracelular pueden incrementar el metabolismo de estas células y acelerar el metabolismo mitocondrial. Se postula que cambios en la concentración de calcio afectan el metabolismo de células excitables en incubaciones *in vitro* usando diferentes sustratos.

Palabras clave: Acetato, astrocito, calcio, glutamato, glutamina, lactato, neurona.

ABSTRACT

The substrate exchange mechanism between neurons and astrocytes is far from clear; even we do not acknowledge if the metabolic effects on host cells, are the result of calcium signaling. We expected that the neurons and astrocytes link up through calcium concentrations, affect their metabolic functions. Calcium concentration was measure through atomic absorption in the intra and extracellular media of primary cultures of astrocytes and neuronas, and after one hour incubation with different substrates such as lactate, glutamate, glutamine and acetate, at physiological concentrations. ANOVA and Duncan methods ($p < 0.05$) were used for the statistical analysis, using three replications with five repetitions. Results show that *in vitro* incubations with the different substrates cause variations in calcium concentration, of both media (intra and extra). Certainly, metabolic stress also may influence such variations. In addition, astrocytes are less dependent on extracellular calcium than neurons. Differences in intracellular calcium concentrations, can increase cell metabolism, and raise up mitochondrial metabolism. It has been proposed that changes in calcium concentration affect cell metabolism in experiments *in vitro*, using different substrates.

Key words: Acetate, astrocyte, calcium, glutamate, glutamine, lactate, neuron.

INTRODUCCIÓN

El sistema nervioso regula el funcionamiento del organismo con base en un complejo siste-

ma de comunicación e interconexión entre diferentes células, como neuronas y astrocitos. Esta comunicación se realiza mediante dos procesos conocidos como señalización y

compartimentación en los cuales se ha descrito la participación activa del calcio. El proceso de señalización puede ser eléctrica y química. La señalización química se realiza a través de la transmisión de mensajes que involucran moléculas y receptores. El proceso de compartimentación se define como un mecanismo de colaboración metabólica que puede ser intercelular, entre diferentes tipos de células (como neuronas y astrocitos) o intracelular entre los diferentes compartimentos que se encuentran en el interior de la célula.

Universalmente se venía asumiendo el papel casi único de las neuronas en las dos funciones más importantes del sistema nervioso, codificación y procesamiento de la información, y generación de comportamientos específicos vía señalización. Sin embargo, en la actualidad se ha descrito el papel de los astrocitos como neuromoduladores que participan muy activamente en el proceso de información neuronal a través de la compartimentación. Este concepto de compartimentación viene apoyado por los estudios funcionales en los que se ha llevado a cabo la estimulación neuronal *in vivo* (Sánchez-Abarca, 1998; Tovar, 1995; Smith, 1994; Bradford, 1988).

La cinética del transporte de glutamato y glutamina entre neuronas y astrocitos está a favor de la hipótesis de que los astrocitos establecen una cooperación metabólica con las neuronas ayudando a controlar la síntesis y, por tanto, la concentración de neurotransmisores (Palaiologos, *et al.*, 1989). El que el γ -aminobutirato (GABA) sea producido solamente por neuronas y la glutamina sólo en los astrocitos demuestra una compartimentación intracelular diferente. Por otro lado, la liberación de glutamato o GABA desde las neuronas está íntimamente relacionado con el flujo de glutamina en el sentido contrario desde los astrocitos, lo que demuestra una compartimentación intercelular. La producción y liberación de glutamina por los astrocitos, está a favor de la hipótesis de

compartimentación del ciclo de la glutamina (Pascual, *et al.*, 1998; Sonnewald, *et al.*, 1993; Waniewski, 1992; Ramaharobandro, *et al.*, 1982).

El calcio en una gran variedad de células animales actúa a modo de mensajero iónico casi universal, transmitiendo los mensajes recibidos en la superficie celular hasta la maquinaria bioquímica intracelular. El desempeño del calcio como mensajero intracelular requiere sólo pequeños flujos de iones a través de la membrana celular, y lo realiza a concentraciones muy bajas y estrechamente controladas. Las altas concentraciones van en detrimento del normal funcionamiento de las células y un aumento prolongado puede ocasionar la muerte celular.

En general, la concentración de calcio en el medio que rodea a las células suele ser, del orden de 1-2 mM. En estado de reposo la concentración intracelular de calcio es del orden de 0.1 μ M (100 nM), pero cuando las células son activadas los niveles de calcio en el citosol aumentan hasta aproximadamente 500-1000 nM. En la matriz mitocondrial se puede acumular calcio a un nivel de 0.5 μ M; mientras que en el retículo endoplásmico la concentración de calcio es de aproximadamente 100 μ M (Berridge *et al.*, 2000; Clapham, 1995; Carafoli y Penniston, 1986).

Existen muchos sustratos cuya función aun es desconocida en las neuronas y los astrocitos y su integración al metabolismo con otro tipo de células cerebrales como oligodendrocitos y la microglia están aún por dilucidar. Se ha comprobado que los astrocitos son excitables por algunos sustratos, aumentando la concentración de calcio intracelular e induciendo ondas de calcio que pueden alterar el metabolismo de las células adyacentes. El mecanismo por el cual algunos sustratos son compartimentados por las neuronas y los astrocitos no es claro y menos claro es, si estos sustratos inducen señales mediadas por calcio y sus efectos metabólicos en las células.

las receptoras. Debido a esto se ha planteado la posibilidad de que existan señales entre neuronas y astrocitos que relacionen más estrechamente el funcionamiento metabólico de ambos tipos de células, permitiendo construir un esquema coordinado de interacciones entre ellas.

En este estudio se propuso determinar si el lactato, el glutamato, la glutamina y el acetato, sustratos que son compartimentados por las neuronas y los astrocitos durante el desarrollo del cerebro, inducen señales mediadas por calcio en experimentos metabólicos en cultivos primarios de estas células. Para ello, inicialmente se estandarizaron los protocolos de cultivos primarios de neuronas y astrocitos y se determinaron las variaciones de calcio intra y extracelular en condiciones normales durante el crecimiento de los cultivos. Posteriormente se evaluó el efecto de los diferentes sustratos sobre las concentraciones de calcio intra y extracelular en cultivos primarios de neuronas cerebelosas y astrocitos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el cultivo de neuronas y astrocitos se emplearon ratas Wistar de 5 a 7 días de nacidas para la preparación de cultivos de neuronas cerebelosas. Para cultivar neuronas de origen cerebral se utilizaron fetos de 17.5 días de gestación, para cultivar astrocitos de origen cerebral se utilizaron recién nacidos de 1 día (Pascuas y Patiño, 1999; Roa y Méndez, 1999; Cohen y Wilkin, 1995; Tovar, 1995; Freshney, 1994; Saneto y De Villes, 1987).

Los cultivos se hicieron con medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM). A esta solución se le adicionó bicarbonato de sodio anhidro (3.7 g/l) que tiene incorporado el indicador rojo de fenol (316 mOsm/kg H₂O ± 5%). Para el cultivo de neuronas además se le adicionó cloruro de potasio (1.86 g/l) (316 mOsm/kg H₂O). Al (DMEM) se le adicionó suero fetal de bovino (FBS) a una concentración del 10%. Este medio con suero fue em-

pleado para los cultivos de neuronas y astrocitos (Taberero, 1993a; Saneto, 1987a; Kimelberg, 1983; Hertz, 1982; Rose, 1969).

Durante los cultivos, se evaluó la proliferación celular, mediante conteo de células y determinando la cantidad de proteína (mg/ml) y el contenido de DNA (µg/ml) por espectrofotometría ultravioleta. Se determinó la concentración de calcio en el medio (mM) y en las células de neuronas y astrocitos (µM) mediante la técnica de absorción atómica.

Para las incubaciones se utilizó medio de incubación Elliott con una composición aproximada a la del fluido cerebro espinal. (Elliott, 1969). El pH se ajustó a 7.38, y se gaseó con oxígeno durante dos horas (292.4 mOsm/kg H₂O). Se utilizaron concentraciones saturantes de cada uno de los sustratos según resultados previos (Taberero, 1993; Vicario, 1991), L-lactato (10.5 mM); L-glutamina (2.5 mM); acetato (5 mM) y glutamato (2.5 mM) y se verificó el pH a 7.32. Neuronas de 7 días y astrocitos de 14 días de incubación *in vitro* (DIV), se lavaron 2 veces con PBS y se añadió el medio de incubación, con los sustratos señalados. Seguidamente se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ por una hora. Al finalizar la incubación, se recolectaron los medios y las células para la determinación analítica de calcio. En paralelo se llevaron blancos del medio de incubación sin y con los sustratos por separado. Adicionalmente se determinó el aporte de calcio del suero.

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con triplicado como mínimo para cada determinación. En las curvas de crecimiento se hizo un análisis de regresión simple tomando la cantidad de proteína (mg) y el contenido de DNA (µg) como variables dependientes y el tiempo de crecimiento (días) como variable independiente. Se determinaron los coeficientes de correlación simple entre las diferentes variables de respuesta y se utilizó la prueba de t-Student para determinar la posible relación entre ellas.

Se realizaron comparaciones múltiples utilizando el análisis de varianza (ANOVA), para determinar los efectos de los factores considerados, este análisis incluyó el test F de significancia. Las comparaciones entre los diferentes tratamientos se realizó aplicando la prueba de Duncan para los experimentos cuyo F fue significativo. (Daniel, 1995; Steel y Torrie, 1998).

RESULTADOS

Evolución de cultivos primarios

En la tabla 1 se muestran las variaciones en el número de células, cantidad de proteína, contenido de DNA y calcio en el medio y en las células durante la evolución de cultivos primarios de astrocitos. Los tres primeros parámetros revelaron un perfil similar que indica claramente un crecimiento entre los 4-10 días de incubación (DIV), como se ilustra en la figura 1. En cuanto al número de células, se encontró que durante los 7 DIV su aumento no fue significativo ($p < 0.01$), mientras que a los 10 DIV se produce un aumento altamente significativo que continúa hasta el final del cultivo. Sin embargo, a partir del día 10, el contenido en DNA y la cantidad de proteína no sufren modificaciones significativas, lo que indica que, a partir de ese momento, el cultivo está alcanzando la quiescencia. Con respecto al DNA y a la proteína, los análisis revelaron que durante los 7 DIV hubo un aumento significativo ($p < 0.05$) alcanzando una estabilización hacia el final del cultivo. Estos resultados corroboran trabajos hechos en este tipo de cultivos (Roa y Méndez, 1999; Tovar, 1995).

La evolución de la proliferación celular de cultivos primarios de neuronas cerebrales y cerebelosas en cuanto a número de células, cantidad de proteína y contenido de DNA y calcio en el medio y en las células, se presentan en la tabla 2. Como puede apreciarse en la figura 2 hay un crecimiento significativo ($p < 0.01$) entre los 3 y 5 DIV en los dos tipos de células. En cuanto al número de células y la cantidad de

proteína se encontró que entre el 3 y 5 DIV hasta el final del cultivo el aumento no fue significativo ($p < 0.01$) en los dos tipos de células. Los resultados del contenido en DNA muestran un aumento significativo ($p < 0.01$) durante el desarrollo de los dos cultivos. Los resultados en su conjunto indican que hay una mayor proliferación de neuronas en los primeros días de cultivo que tiende a estabilizarse a los 7 DIV. Estos resultados corroboran trabajos hechos en neuronas cerebrales y cerebelosas (Pascuas y Patiño, 1999; Tovar, 1995) y evidencian que las neuronas cerebelosas tienden a madurar más rápido que las cerebrales y por lo tanto a estabilizarse más prontamente.

Determinación de calcio en el medio y en astrocitos y neuronas

En las tablas 1 y 2 aparecen los resultados de las determinaciones de calcio (ppm; mM) en el medio (extracelular). En las figuras 3 y 4, se señalan las líneas de tendencia de la concentración de calcio durante el crecimiento de los astrocitos y las neuronas. Los resultados de las determinaciones de calcio muestran una disminución en todas las curvas durante el crecimiento de las células, encontrándose que en los astrocitos varió de 1.65 a 1.26 mM (véase figura 3B), en las neuronas cerebrales de 2.03 a 1.83 mM y en las neuronas cerebelosas de 2.44 a 2.29 mM (véase figura 4B). El análisis de varianza reveló diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los valores de calcio en el medio.

Los resultados de las determinaciones de calcio (ppm; μM) en astrocitos y neuronas (intracelular) aparecen en las tablas 1 y 2. En las figuras 3 y 4 se señala la tendencia del comportamiento del calcio intracelular durante los días de crecimiento de los astrocitos y las neuronas. Como se observa hubo un aumento significativo ($p < 0.05$) en todas las curvas durante el crecimiento de las células, encontrándose que en los astrocitos varió de 1.33 a 1.46 μM (véase figura 3A), en las neuronas cerebrales de 210 a 290 μM y en las neuronas cerebelosas de 1.66 a 1.78 μM (véase figura 4A).

TABLA 1. Comparación entre el número de células, cantidad de proteína, contenido de DNA y calcio durante la evolución del cultivo de astrocitos. A distintos días de incubación *in vitro* se determina el número de células *10⁶, la cantidad de proteínas (mg/ml), el contenido de DNA (mg/ml) y la cantidad de calcio en el medio (ppm, mM) y en las células (ppm, mM). Los resultados son medias \pm s n-1 procedentes de tres replicaciones.

DIV Astrocitos	4		7		10		14	
	X \pm s ⁿ⁻¹	CV						
Número de células*10 ⁶	2.00 \pm 0.45	22,50	2.83 \pm 0.86	30,38	4.34 \pm 1.04	23,96	7.13 \pm 1.18	16,54
Proteína (mg/ml)	398 \pm 151	37,90	576 \pm 202	35,06	682 \pm 133	19,50	766 \pm 201	26,24
DNA (mg/ml)	30.65 \pm 5.58	18,00	43.86 \pm 16.76	38,20	57.43 \pm 11.87	20,66	64.86 \pm 12.79	19,71
Calcio medio + FBS (ppm)	66.14 \pm 5.60	8,47	58.49 \pm 4.40	7,52	51.49 \pm 9.00	17,45	50.33 \pm 6.6	13,11
Calcio medio + FBS (mM)	1.65 \pm 0.14	8,48	1.45 \pm 0.10	6,89	1.28 \pm 0.22	17,19	1.26 \pm 0.16	12,70
Calcio células (ppm)	5.35 \pm 0.65	12,13	6.31 \pm .48	7,60	5.78 \pm 0.38	6,57	5.86 \pm 0.50	8,53
Calcio células (mM)	133.49 \pm 16.22	12,15	157.44 \pm 11.97	7,60	144.22 \pm 9.48	6,57	146.21 \pm 12.47	8,53

DIV = Días de incubación *in vitro*.

CV = coeficiente de variación.

TABLA 2. Comparación entre el número de células, cantidad de proteína, contenido de DNA y calcio durante la evolución del cultivo de neuronas cerebrales y cerebelosas. A distintos días de incubación *in vitro* se determina el número de células $\times 10^6$, la cantidad de proteínas (mg/ml), el contenido de DNA (mg/ml) y la cantidad de calcio en el medio (ppm, mM) y en las células (ppm, mM). Los resultados son medias \pm s n-1 procedentes de tres replicaciones.

Neuronas cerebrales

DIV	3		5		7	
	$\bar{X} \pm \sigma^{n-1}$	CV	$\bar{X} \pm \sigma^{n-1}$	CV	$\bar{X} \pm \sigma^{n-1}$	CV
Número de células $\times 10^6$	1.48 \pm 0.22	14,94	2.16 \pm 0.37	16,99	2.40 \pm 0.24	9,88
Proteína (mg/ml)	388.6 \pm 64.8	16,70	520.1 \pm 47.8	9,20	562.5 \pm 48.8	8,70
DNA (μ g/ml)	31.7 \pm 4.00	12,70	52.4 \pm 11.8	22,50	66.5 \pm 7.4	11,20
Calcio medio + FBS (ppm)	81.59 \pm 15.55	19,06	81.52 \pm 14.18	17,39	73.48 \pm 8.52	11,59
Calcio medio + FBS (mM)	2.04 \pm 0.39	19,12	2.03 \pm 0.35	17,24	1.83 \pm 0.21	11,47
Calcio células (ppm)	8.45 \pm 1.53	18,12	11.54 \pm 1.10	9,56	11.66 \pm 1.08	9,25
Calcio células (μ M)	210.84 \pm 38.18	18,11	287.94 \pm 27.45	9,53	290.93 \pm 26.95	9,26

DIV = Días de incubación *in vitro*.

CV = Coeficiente de variación

Neuronas cerebelosas

DIV	3		5		7	
	$\bar{X} \pm \sigma^{n-1}$	CV	$\bar{X} \pm \sigma^{n-1}$	CV	$\bar{X} \pm \sigma^{n-1}$	CV
Número de células $\times 10^6$	1.21 \pm 0.19	15,92	1.63 \pm 0.15	0,15	1.70 \pm 0.21	12,41
Proteína (mg/ml)	276.2 \pm 22.1	8,00	445.8 \pm 23.3	5,20	453.4 \pm 29.2	6,40
DNA (mg/ml)	30.4 \pm 2.9	9,50	40.4 \pm 1.6	4,00	45.3 \pm 2.0	4,50
Calcio medio + FBS (ppm)	97.62 \pm 9.96	10,20	91.75 \pm 14.50	15,79	91.42 \pm 19.22	21,03
Calcio medio + FBS (mM)	2.44 \pm 0.25	10,25	2.29 \pm 0.36	15,73	2.28 \pm 0.50	21,92
Calcio células (ppm)	6.68 \pm 1.09	16,32	7.61 \pm 1.72	22,65	7.15 \pm 2.17	30,34
Calcio células (μ M)	166.67 \pm 27.20	16,32	189.88 \pm 42.92	22,60	178.40 \pm 54.14	30,35

DIV = Días de incubación *in vitro*.

CV = Coeficiente de variación.

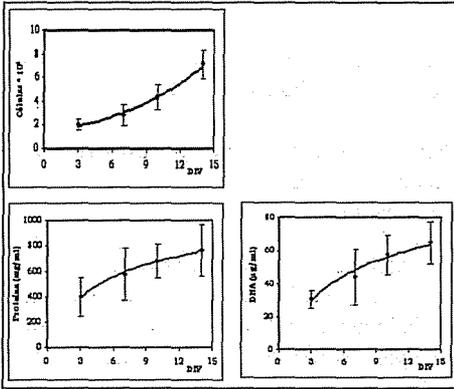


FIGURA 1. Evolución de parámetros de proliferación celular durante el cultivo de astrocitos. A distintos días de incubación *in vitro* (DIV) se reporta el número de células * 10⁶, la cantidad de proteínas (mg/ml) y el contenido de DNA (µg/ml). Los resultados son medias de $\pm \sigma^{n-1}$ procedentes de tres replicasiones (n = 15).

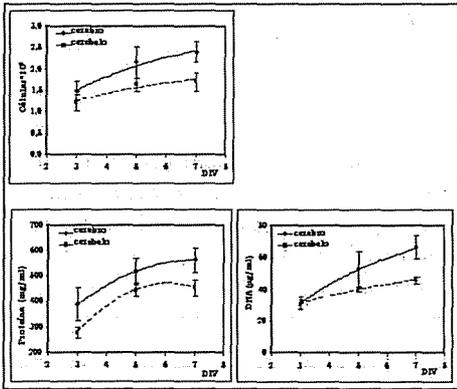


FIGURA 2. Evolución de parámetros de proliferación celular durante el cultivo de neuronas cerebrales y cerebelosas. A distintos días de incubación *in vitro* (DIV) se reporta el número de células * 10⁶, la cantidad de proteínas (mg/ml) y el contenido de DNA (µg/ml). Los resultados son medias de $\pm \sigma^{n-1}$ procedentes de tres replicasiones (n = 15).

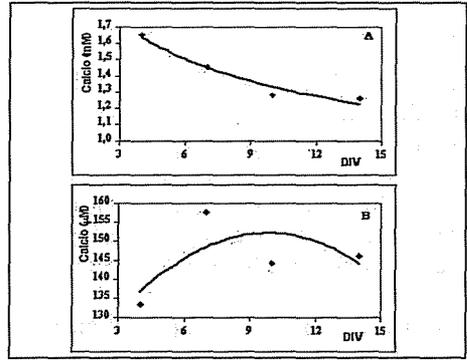


FIGURA 3. Variación de la concentración de calcio durante el crecimiento de astrocitos. El gráfico señala las líneas de tendencia durante los días de crecimiento. **A.** Se reportan los valores de la concentración de calcio (mM) en el medio de cultivo de astrocitos a los cuatro, siete, diez y catorce días de incubación *in vitro* (DIV). **B.** Reporta los valores de la concentración de calcio (µM) en las células de astrocitos en los mismos días del cultivo. Los resultados son medias de 6-10 datos de 3 cultivos.

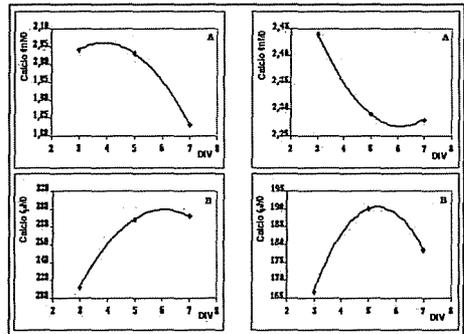


Figura 4. Variación de la concentración de calcio durante el crecimiento de neuronas cerebrales y cerebelosas. El gráfico señala las líneas de tendencia durante los días de crecimiento. **A.** Se reportan los valores de la concentración de calcio (mM) en el medio de cultivo de neuronas cerebrales y cerebelosas a los tres, cinco y siete días de incubación *in vitro* (DIV). **B.** Reporta los valores de la concentración de calcio (µM) en las células de neuronas cerebrales y cerebelosas en los mismos días del cultivo. Los resultados son medias de 4-6 datos de 3 cultivos.

Concentración de calcio en los medios y en el suero

Los resultados de la cantidad de calcio en el medio de cultivo 71.79 ± 8.35 (ppm) es muy similar al cálculo del valor teórico de acuerdo a la composición reportada para este medio de 72.50 (ppm) dando una desviación del 11.63% , como se muestra en la tabla 3. En cuanto al medio Elliott la cantidad de calcio en el medio de incubación da 51.91 ± 9.26 (ppm), el cálculo teórico para este medio da 53.70 (ppm) dando una desviación del 17.84% . Estas diferencias en desviación pueden deberse principalmente a que uno de los medios es comercial (cultivo) y el otro ha sido preparado en el laboratorio (incubación).

Con respecto al suero empleado se encontró que la cantidad de calcio fue del 35.62 ± 6.28 (ppm) dando una desviación del 17.62% . Esta variación en la composición de calcio del suero puede deberse a que se trabajó con varios lotes de la misma casa comercial.

Por otro lado, también se muestra que la adición de suero al medio de cultivo no afecta

las concentraciones de calcio 68.88 ± 8.45 (ppm), aunque sí se observa una ligera disminución de la cantidad de calcio posiblemente por efecto de dilución.

Efecto de la incubación con diferentes sustratos sobre los niveles de calcio extra intracelular

En las tablas 4 y 5 se muestran las concentraciones de calcio en el medio Elliott antes de la incubación con los diferentes sustratos que para astrocitos fue en promedio de 0.97 mM y para neuronas cerebelosas fue 0.51 mM y se compararon con las concentraciones de calcio en los medios después de la incubación. La comparación se ilustra en las figuras 5 y 6 y muestra una disminución en la concentración de calcio después de las incubaciones en los dos tipos de células, siendo más pronunciada con glutamina (0.64 mM) y acetato (0.69 mM) en las incubaciones con astrocitos. Un efecto similar se apreció en las incubaciones con lactato (0.26 mM) y glutamato (0.27 mM) en el cultivo de neuronas.

TABLA 3. Contenido de calcio en el medio Eagle modificado por Dulbecco, medio de incubación Elliott y suero fetal bovino (FBS). Se reporta el valor teórico y experimental de la concentración promedio ($X \pm sn-1$) de calcio (ppm y mM) de los medios de cultivo y de incubación sin sustrato, el valor experimental del suero fetal bovino (FBS) y del medio con suero (9:1).

		$X \pm s^{n-1}$	CV	V_{TEO}
Medio de cultivo	ppm	71.79 ± 8.35	11,63	72,50
Dulbecco	mM	1.79 ± 0.21	11,73	1,81
Suero fetal bovino	ppm	35.62 ± 6.28	17,62	
	mM	0.89 ± 0.16	17,98	
Medio de cultivo + FBS (9 : 1)	ppm	68.88 ± 8.45	12,26	
	mM	1.72 ± 0.21	12,20	
Medio de incubación	ppm	51.91 ± 9.26	17,84	53,70
Elliott sin sustrato	mM	1.29 ± 0.23	17,82	1,34

TABLA 4. Resultados de la comparación de las variaciones de calcio utilizando diferentes sustratos en cultivos de astrocitos. Se reportan las concentraciones de calcio (ppm, mM) en los medios de incubación con lactato (10.5 mM), glutamato (2.5 mM), glutamina (2.5 mM) y acetato (5 mM) antes y después de la incubación y la concentración de calcio (ppm y mM) en las células de astrocitos después de la incubación a los 14 días de cultivo.

Astrocitos incubados 1 h.		Lactato		Glutamato		Glutamina		Acetato	
		X ± s ⁿ⁻¹	CV						
Medio de incubación	ppm	42.97 ± 5.87	13,67	39.97 ± 7.56	18,92	37.20 ± 9.61	25,84	35.53 ± 7.85	22,10
Elliot antes	mM	1.07 ± 0.15	13,67	1.00 ± 0.19	18,92	0.93 ± 0.24	25,84	0.89 ± 0.20	22,10
Medio de incubación	ppm	32.41 ± 8.19	25,26	28.90 ± 6.73	23,29	25.80 ± 5.97	23,14	27.66 ± 6.68	24,15
Elliot después	mM	0.81 ± 0.20	25,26	0.72 ± 0.17	23,29	0.64 ± 0.15	23,14	0.69 ± 0.17	24,15
Células	ppm	5.03 ± 1.54	30,67	4.73 ± 1.16	24,52	2.25 ± 0.65	28,91	2.10 ± 0.67	31,87
	mM	125.59 ± 38.52	30,67	117.96 ± 28.92	24,52	56.25 ± 16.26	28,91	52.40 ± 16.70	31,87

CV= Coeficiente de variación.

TABLA 5. Resultados de la comparación de las variaciones de calcio utilizando diferentes sustratos en cultivos de neuronas. Se reportan las concentraciones de calcio (ppm, mM) en los medios de incubación con lactato (10.5 mM), glutamato (2.5 mM), glutamina (2.5 mM) y acetato (5 mM) antes y después de la incubación y la concentración de calcio (ppm y mM) en las células de neuronas después de la incubación, a los 7 días de cultivo.

Neuronas cerebrales incubados 1 h.		Lactato		Glutamato		Glutamina		Acetato	
		X ± s	CV	X ± s	CV	X ± s	CV	X ± s	CV
Medio de incubación	ppm	20.16 ± 5.68	28,16	17.99 ± 5.68	28,03	18.84 ± 8.92	28,72	24.98 ± 5.60	21,52
Elliot antes	mM	0.50 ± 0.14	28,16	0.45 ± 0.13	28,03	0.47 ± 0.13	28,72	0.62 ± 0.14	22,43
Medio de incubación	ppm	10.61 ± 3.24	30,54	10.78 ± 3.09	28,64	14.03 ± 3.10	22,09	11.91 ± 2.89	24,25
Elliot después	mM	0.26 ± 0.08	30,54	0.27 ± 0.08	28,64	0.35 ± 0.08	22,09	0.30 ± 0.07	23,37
Células	ppm	2.57 ± 0.50	19,34	3.28 ± 0.60	18,41	2.61 ± 0.42	16,16	3.9 ± 0.28	7,13
	mM	64.04 ± 12.38	19,34	81.89 ± 15.08	18,41	65.23 ± 10.54	16,16	97.36 ± 6.94	7,13

CV = Coeficiente de variación.

Por otro lado, se escogió la concentración de calcio en las células al final de cultivo que para astrocitos fue de 0.146 mM y para neuronas cerebelosas fue 0.178 mM, como aparece en las tablas 1 y 2 y se compararon con las concentraciones de calcio en las células después de la incubación. En las figuras 5 y 6 la comparación muestra una disminución después de las incubaciones en los dos tipos de células, siendo más pronunciada con glutamina (0.056 mM) y acetato (0.052 mM) en las incubaciones con astrocitos. Un efecto similar se apreció en las incubaciones con lactato (0.064 mM) y glutamina (0.065 mM) en el cultivo de neuronas.

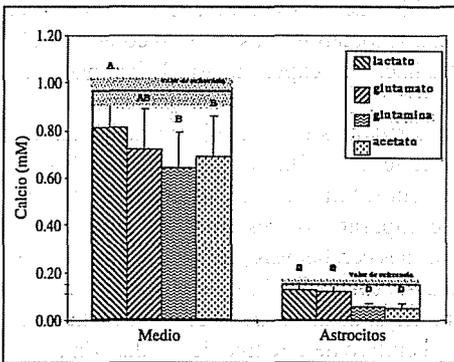


FIGURA 5. Comparación del efecto de diferentes sustratos sobre los niveles de calcio en el medio y en los astrocitos. Astrocitos de 14 días de incubaron a 37 °C durante una hora, en tampón fosfato a pH 7.4 que contiene lactato (10.5 mM), glutamato (2.5 mM), glutamina (2.5 mM) y acetato (5 mM). Posteriormente, se determinó la cantidad de calcio en las células y el medio de incubación por absorción atómica. Los resultados se expresan como mM de calcio. Las letras mayúsculas representan diferencias significativas en el medio y las letras minúsculas representan las diferencias significativas en las células. Diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los valores obtenidos con diferentes letras ($n = 6-18$ procedentes de 3 cultivos).

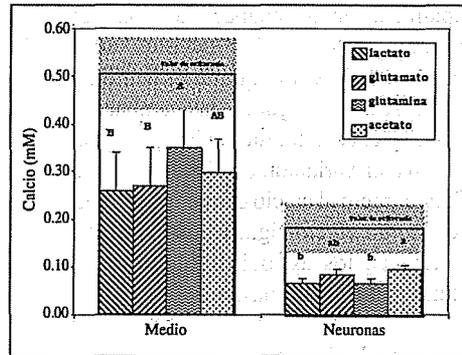


Figura 6. Comparación del efecto de diferentes sustratos sobre los niveles de calcio en el medio y en las neuronas. Neuronas cerebelosas de 7 días se incubaron a 37 °C durante una hora, en tampón fosfato a pH 7.4 que contiene lactato (10.5 mM), glutamato (2.5 mM), glutamina (2.5 mM) y acetato (5 mM). Posteriormente, se determinó la cantidad de calcio en las células y el medio de incubación por absorción atómica. Los resultados se expresan como mM de calcio. Las letras mayúsculas representan diferencias significativas en el medio y las letras minúsculas representan las diferencias significativas en las células. Diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los valores obtenidos con diferentes letras ($n = 4-12$ procedentes de 3 cultivos).

Se hicieron comparaciones múltiples entre los resultados obtenidos solamente en los experimentos de incubación en el medio y en las células. En las tablas 4 y 5 se presentan los resultados obtenidos después de la incubación por 1 hora con diferentes sustratos sobre las concentraciones de calcio extra e intracelular en astrocitos y en neuronas cerebelosas y en los medios de incubación Elliott con el sustrato correspondiente. El análisis de varianza revela diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los valores de calcio en el medio y en las células de los dos cultivos al ser incubados con los diferentes sustratos.

Los resultados que se ilustran en la figura 5 revelan que en astrocitos sí hay un efecto, prin-

cialmente en las incubaciones con glutamina y acetato, sobre los niveles de calcio intracelular. Mientras que en las neuronas como se muestra en la figura 6, las incubaciones con lactato y el acetato, fueron las que presentaron una mayor variación en el calcio extracelular. Con respecto al calcio extracelular (medios) se detectó un efecto significativo ($p < 0.05$) del lactato en los astrocitos y un efecto de la glutamina en neuronas.

Estos resultados en su conjunto apoyan nuestra hipótesis de que pueden tener un efecto sobre los niveles de calcio intracelular los sustratos que son compartimentados por las neuronas y los astrocitos.

DISCUSIÓN

En cuanto a los resultados de las concentraciones de calcio (mM) a los 4, 7, 10 y 14 DIV en el medio de astrocitos, se puede apreciar una disminución significativa ($p < 0.05$) en las concentraciones de calcio que tiende a estabilizarse hacia el final del cultivo. En el caso de las células de astrocitos el comportamiento de la concentración de calcio (μM) es diferente, presentándose un aumento durante la evolución del cultivo siendo más marcado a los 7 DIV tendiendo a estabilizarse al final del cultivo. El incremento a los 7 DIV coincide con un aumento en la proliferación de astrocitos tipo 2 como se demuestra en trabajos previos (Roa y Méndez, 1999; Sánchez-Abarca, 1998).

Estos resultados en su conjunto muestran que durante el crecimiento de los astrocitos aumentan los requerimientos de calcio por las células, posiblemente contribuyendo a acelerar el metabolismo mitocondrial aumentando de esta forma el contenido de ATP necesario para mantener los requerimientos energéticos incrementados durante la proliferación (Swanson *et al.*, 1997; Budd y Nicholls, 1996). Igualmente, se demuestra que se pueden hacer incubaciones con este tipo de células a los 14 DIV porque todos los parámetros medidos

(proteína, DNA, número de células y calcio) tienden a estabilizarse.

En cuanto a los resultados de las concentraciones de calcio (mM) en el medio de cultivos (extracelular) las neuronas cerebrales y cerebelosas a los 3, 5 y 7 DIV, se puede apreciar una disminución en las concentraciones de calcio en los dos cultivos. Sin embargo, en el cultivo de neuronas cerebelosas tiende a estabilizarse más rápido hacia el final del cultivo. En el caso de las concentraciones de calcio (μM) en las células (intracelular) el comportamiento de la concentración de calcio fue similar, presentando un aumento marcado entre los 3 y 5 DIV. No obstante, los parámetros de proliferación mostraron una tendencia a estabilizarse más rápidamente en el cultivo de neuronas cerebelosas y por esta razón se tomaron estos cultivos como modelo para hacer los experimentos de incubación.

Los resultados en su conjunto muestran una tendencia similar a los encontrados en astrocitos. Sin embargo, hay que resaltar que al comparar los tres tipos de cultivos las neuronas cerebelosas presentaron mayor cantidad de calcio en el medio, lo que puede estar reflejando una menor actividad metabólica en el cultivo de este tipo de células. En cuanto a su actividad metabólica se puede decir que las neuronas cerebrales tienen mayor demanda de calcio (entre 210.84-290.93 μM), que las neuronas cerebrales (entre 166.67-178.4 μM) y que los astrocitos (entre 133.49-146.21 μM), resaltándose que las concentraciones de calcio en las neuronas presentaron valores más altos que en los astrocitos y que la exigencia de calcio fue superior en las neuronas cerebrales que en las neuronas cerebelosas.

Efecto de diferentes sustratos sobre las concentraciones de calcio extracelular

Se ha encontrado que astrocitos y neuronas difieren en la utilización particular de sustratos, en sus productos metabólicos y en

la presencia de enzimas características lo que les da una identidad diferente. Los dos tipos de células compiten por la glucosa como principal sustrato, pero pueden utilizar lactato, 3-hidroxibutirato, acetato, glutamato, glutamina, GABA y posiblemente otros sustratos como alternativas para mantener su oxidación en el ciclo del ácido tricarboxílico (Pascual *et al.*, 1998; Tovar, 1995). La actividad de varias vías metabólicas en las cuales se encuentra involucrada la homeostasis de iones como sodio, potasio y calcio pueden influenciar su capacidad de producir ATP como una respuesta a la disminución energética de estos tipos de células (Silver, *et al.*, 1997).

Los hallazgos encontrados en este estudio muestran que la concentración de calcio tiene un comportamiento diferente en dos tipos de células, astrocitos y neuronas cerebelosas. La concentración de calcio en el medio después de las incubaciones en astrocitos y neuronas presenta una disminución con los cuatro sustratos utilizados con respecto a la concentración de calcio en el medio de incubación Elliott inicial.

El comportamiento del calcio extracelular variando el sustrato no es el mismo en astrocitos y neuronas. Al comparar la concentración de calcio en el medio Elliott antes de la incubación en los astrocitos (valor promedio 0.97 ± 0.08 mM) con las concentraciones de calcio después de las incubaciones con los 4 sustratos se encontró que con lactato (0.81 ± 0.20 mM) y con glutamato (0.72 ± 0.17 mM) no hubo variaciones grandes con respecto al valor inicial. No pasó así con la glutamina y el acetato, donde sí se encontraron disminuciones en las concentraciones de calcio extracelular. Al hacer las comparaciones estadísticas de los resultados de calcio después de las incubaciones solamente con los 4 sustratos, se evidenciaron claramente las disminuciones de calcio en el medio. El calcio extracelular en los medios de astrocitos se vio afectado principalmente por la glutamina y el acetato que presentaron diferencias significati-

vas ($p < 0.05$) con respecto al lactato en un -23.7 y -12.5% , respectivamente. Se utilizaron los resultados de las incubaciones con lactato como referencia, debido a que de los sustratos utilizados, es el más importante durante el período perinatal (Tovar, 1995).

Por otro lado, al comparar la concentración de calcio en el medio Elliott antes de la incubación con las neuronas cerebelosas (valor promedio 0.51 ± 0.08 mM) con las concentraciones de calcio después de las incubaciones con los 4 sustratos se encontró que con glutamina (0.35 ± 0.08 mM) y con acetato (0.30 ± 0.07 mM) no hubo variaciones grandes con respecto al valor inicial. No pasó así con el lactato y el glutamato, donde sí se encontraron disminuciones en las concentraciones de calcio extracelular. Al hacer las comparaciones estadísticas de los resultados de calcio después de las incubaciones solamente con los 4 sustratos, se evidenciaron claramente las disminuciones de calcio en el medio. El calcio extracelular en los medios de neuronas se vio afectado principalmente por el lactato y el glutamato que presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto a la glutamina en un -25.7 y -22.8% , respectivamente. Aparentemente, la entrada de glutamina no es calcio dependiente ya que tiene su propio transportador que está reportado en neuronas cerebelosas (GlnT) (Varoqui, *et al.*, 2000).

Estos resultados en su conjunto muestran que los astrocitos son menos dependientes del calcio extracelular que las neuronas y que se aprecian diferencias significativas en las concentraciones de calcio al variar los sustratos. Igualmente, revelan una diferencia en los niveles de calcio requeridos. Cuando se incubaban los astrocitos con glutamina y acetato y, las neuronas con lactato y glutamato los requerimientos de calcio son menores. Este hecho puede explicarse porque las células al no contar con los mecanismos normales de transporte hacia el interior de estos sustratos, se ven obligadas a utilizarlos y esto puede tener

un efecto favoreciendo la absorción de calcio del medio, estimulando el aumento de calcio en las mitocondrias y acelerando el metabolismo general de las células, pero no a niveles suficientes que permitan mantener la homeostasis metabólica.

Efecto de los diferentes sustratos sobre las concentraciones de calcio intracelular

Los resultados de este estudio muestran que la concentración de calcio tiene un comportamiento diferente en los dos tipos de células. Al comparar la concentración de calcio en los astrocitos al final del cultivo (14 DIV) ($146.21 \pm 12.47 \mu\text{M}$) con las concentraciones de calcio después de las incubaciones con los 4 sustratos se encontró que con lactato ($125.59 \pm 38.52 \mu\text{M}$) y con glutamato ($117.96 \pm 28.92 \mu\text{M}$) no hubo variaciones grandes con respecto al valor inicial. No pasó así con la glutamina y el acetato, donde sí se encontraron disminuciones en las concentraciones de calcio intracelular. Al hacer las comparaciones estadísticas de los resultados de calcio después de las incubaciones solamente con los cuatro sustratos, se evidenciaron claramente las disminuciones de calcio en las células. El calcio intracelular de los astrocitos se vio afectado principalmente por la glutamina y el acetato que presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto al lactato en un -61.6 y -64.16% , respectivamente.

Por otro lado, al comparar la concentración de calcio en las neuronas cerebelosas al final del cultivo (7 DIV) ($178.40 \pm 54.14 \mu\text{M}$) con las concentraciones de calcio después de las incubaciones con los cuatro sustratos se encontró que disminuyeron principalmente con lactato ($64.04 \pm 12.38 \mu\text{M}$) y con glutamina ($65.23 \pm 10.54 \mu\text{M}$). Al hacer las comparaciones estadísticas de los resultados de calcio después de las incubaciones solamente con los cuatro sustratos, se evidenciaron claramente las disminuciones de calcio en las células. El calcio intracelular en las neuronas cerebelosas se vio afectado principalmente por el lactato

y la glutamina que presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto al acetato en un -34.2 y -33.0% , respectivamente.

Estos resultados revelan que las células expresaron una respuesta al estrés metabólico al que fueron sometidas. El aumento de calcio intracelular en los astrocitos puede deberse al mantenimiento del metabolismo celular estimulado por el lactato y el glutamato. El glutamato en los astrocitos actúa en varios receptores metabotrópicos, modulando la actividad de la glía mediante la estimulación de oscilaciones de calcio (Haak, *et al.*, 1997; Pellegrini-Gianpetro, *et al.*, 1991) que pueden inducir señales de calcio al interior de la célula para movilizar calcio de sus depósitos y aumentar su concentración intracelular. En astrocitos de rata, la iniciación de la propagación de ondas de calcio involucra una secuencia de pasos intra e intercelulares en los cuales la fosfolipasa C, el inositol trifosfato, las reservas internas de calcio y las uniones comunicantes juegan un papel crítico. La identificación de estos diferentes eventos permite determinar blancos en los cuales el nivel de señalización de los astrocitos, puede estar controlada (Venance, *et al.*, 1997). Este efecto no se ve con glutamina y acetato ya que estos sustratos no son fácilmente metabolizados por los astrocitos, porque ellos son productores de los mismos.

Las diferencias en los resultados del efecto de cada sustrato en las neuronas puede deberse a que las neuronas pueden metabolizar fácilmente lactato y glutamato y que éstos podrían equilibrarse con el calcio extracelular. Sin embargo, con la glutamina se encontró que su presencia no favorece la entrada de calcio, porque como ya se discutió, las concentraciones en el medio no variaron significativamente. Una explicación para que no se haya detectado una variación grande en las neuronas, es que estas células podrían estar recurriendo a sus depósitos de calcio, lo que permitiría modular el equilibrio con las concentraciones extracelulares como eviden-

cian los resultados. La diferencia con el acetato posiblemente se deba a que puede existir un transportador específico para el acetato que sería dependiente de iones, lo que favorecería el transporte de acetato al interior de la célula y su metabolismo, al acelerarse las funciones mitocondriales con el aumento de calcio en el citosol (Zhu, 1999; Van der Heiden, *et al.*, 1997; Zanotti y Charles, 1997).

CONCLUSIONES

Todos los resultados mostraron que la concentración de calcio tiene un comportamiento diferente en las células de astrocitos y neuronas. Durante el crecimiento de los astrocitos neuronas cerebrales y neuronas cerebelosas, aumentaron los requerimientos de calcio por las células. Las neuronas presentaron concentraciones más altas de calcio intracelular que los astrocitos y la exigencia de calcio fue superior en las neuronas cerebrales que en las cerebelosas. Las neuronas cerebelosas presentaron mayor cantidad de calcio en el medio, lo que puede estar reflejando una menor actividad metabólica en el cultivo de este tipo de células.

Se evidenció que durante la incubación de los astrocitos y neuronas con lactato, glutamato, glutamina y acetato, la concentración de calcio en el medio y en las células tiene un comportamiento diferente en los dos tipos de células. En general, se presentó una disminución con los cuatro sustratos teniendo en cuenta la concentración de calcio en el medio de incubación inicial. El calcio extracelular en los medios de astrocitos, después de la incubación no disminuyó principalmente por la glutamina y el acetato, en tanto que en las neuronas disminuyó principalmente por el lactato y el glutamato.

Los resultados muestran que los astrocitos son menos dependientes del calcio extracelular que las neuronas y que se aprecian diferencias significativas en las concentraciones de calcio al variar los sustratos. Los niveles de

calcio requeridos cuando se utiliza glutamato y acetato son más altos en neuronas que en astrocitos, mientras que los requerimientos de calcio cuando se utiliza glutamina son similares en ambas células.

La concentración de calcio en las células después de las incubaciones en astrocitos fue superior principalmente por el lactato y el glutamato, en tanto que en las neuronas fue superior principalmente por el acetato. Estos resultados pueden estar indicando un aumento en el metabolismo celular inducido por el aumento del calcio dependiendo del tipo de sustrato.

LITERATURA CITADA

- BERRIDGE, M., LIPP, P. Y BOOTMAN, D. The versatility and universality of calcium signalling. *Nature*, 2000; 1:11-21.
- BRADFORD, H. *Fundamentos de neuroquímica*. Editorial Labor, S.A. Imprenta Juvenil, S.A. Barcelona, España, 1988; 485 págs.
- BUDD, S. y NICHOLLS, D. A reevaluation of the role of mitochondria in neural Ca^{2+} homeostasis. *Journal of Neurochemistry*, 1996; 66: 403-411.
- CARAFOLI, E. y PENNISTON, J. La señal de calcio. *Investigación y Ciencia*, 1986; 112: 28-38.
- CLAPHAM, D. Calcium signaling. *Cell*, 1995; 80: 259-268.
- COHEN, J. y WILKIN, G. Neural cell culture. A practical approach. IRL Press at Oxford University Press. London, England, 1995; 248 págs.
- DANIEL, W. *Bioestadística. Base para el análisis de la ciencias de la salud*. Uthea, Noriega Editores. México D.F., México, 1995; 877 págs.
- ELLIOTT, K. The use of brain slices. En: *Handbook of neurochemistry*. Ed. A.

- Laftha. Plenum Press. New York, NY, vol. 2, 1969; 103-115.
- FRESHNEY, R. Culture of animal cells. Alan R. Liss, Inc. NY, USA. 1994; 309 págs.
- HAAK, L., SÉLLER, H. y VAN DEN POL, A.. Metabotropic glutamate receptor activation modulates kainate and serotonin calcium response in astrocytes. *Journal of Neuroscience*, 1997; 5: 1825-1837.
- HERTZ, L., JUURLINK, B., FOSMARK, H. y SCHOUSBOE, A. Methodological appendix: astrocytes in primary cultures. En: *Neuroscience approached through cell culture*. Ed. Pfeiffer S.E. CRC Press. Boca Raton, FL, vol. 1, 1982; 175-186.
- KIMELBERG, H. Primary astrocyte cultures - A key to astrocyte function. *Cell Molecular Neurobiology*, 1983; 3: 1-16.
- PALAIOLOGOS, G., HERTZ, L. y SCHOUSBOE, A. Role of aspartate aminotransferase and mitochondrial dicarboxylate transport for release of endogenously and exogenously supplied neurotransmitter in glutamatergic neurons. *Neurochemistry Research*, 1989; 14: 359-366.
- PASCUAL, J., CARCELLER, F., RODA, J. y CERDÁN, S. Glutamate, glutamine, and GABA as substrates for the neuronal and glial compartments after focal cerebral ischemia in rats. *Stroke*, 1998; 29: 1048-1057.
- PASCUAS, A. y PATIÑO, Y. Cultivos primarios de neuronas de cerebro y cerebelo de rata. Trabajo de grado. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia, 1999.
- PELLEGRINI-GIAMPIETRO, D., BENNET, M. y ZUKIN, S. Differential expression of three glutamate receptor genes in developing rat brain: an *in situ* hybridization study. *Neurobiology*, 1991; 88: 4157-4161.
- RAMAHAROBANDRO, N., BORG, J., MANDEL, P. y MARK, J. Glutamine and glutamate transport in cultured neuronal and glial cells. *Brain Research*, 1982; 44: 113-121.
- ROA, L. y MÉNDEZ, L. Cultivo primario de astrositos de neonatos de rata. Trabajo de grado. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia, 1999.
- ROSE, S. y SINHA, A. Some properties of isolated neuronal cell fractions. *Journal of Neurochemistry*, 1969; 16: 1319-1328.
- SÁNCHEZ-ABARCA, L. Colaboración de los astrocitos tipo-1 y tipo-2 para el funcionamiento del ciclo del ácido γ -aminobutírico (GABA). Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca, Salamanca, España, 1998.
- SANETO, R. y DE VELLIS, J. Neuronal and glial cells: Cell culture of the central nervous system. En: *Neurochemistry a Practical Approach*. Ed. A.J. Turner & H.S. Bachelard. IRL Press, 1987; 27-64.
- SILVER, I. DEAS, J. y ERECINSKA, M. Ion homeostasis in brain cells: differences in intracellular ion responses to energy limitation cultured neurons and glial cells. *Neuroscience*, 1997; 78: 589-601.
- SMITH, S. Neuromodulatory astrocytes. *Current Biology*, 1994; 4: 807-810.
- SONNEWALD, U., WESTERGAARD, N., SCHOUSBOE, A., SVENDSEN, G., UNSGARD, G. y PETERSEN, S.B. Direct demonstration by [^{13}C] NMR spectroscopy that glutamine from astrocytes is a precursor for GABA synthesis in neurons. *Neurochemistry International*, 1993; 22: 19-29.
- STEEL, R. y TORRIE, J. *Bioestadística principios y procedimientos*. McGraw-Hill. México, D.F., 1998; 136-139, 178-183. 574.

- SWANSON, C., ARKIN, A. y ROSS, J. An endogenous calcium oscillator my control early embryonic division. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1997; 94: 1194-1197.
- TABERNEO, A. Regulación del metabolismo del lactato en neuronas y astrocitos en cultivo primario. Tesis doctoral. Universidad de Salamanca. Salamanca, España. 1993.
- TOVAR, J. Compartimentación celular del metabolismo del lactato en neuronas y astrocitos en cultivo primario. Tesis doctoral. Universidad de Salamanca. Salamanca, España, 1995.
- VAN DER HEIDEN, M., CHANDEL, N., WILLIAMSON, E., SHUMACKER, P. y THOMPSON, C. Bcl-x1 regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell*, 1997; 91: 627-637.
- VAROQUI, H., ZHU, H., YAO, D., MING, H., And ERICKSON, J. Cloning and functional identification of a neuronal glutamine transporter. *Journal of Biology Chemistry*, 2000; 275: 4049-4054.
- VENANCE, L., STELL, N. GLOWINSKI, J., GIAUME, C. Mechanism involved in initiation and propagation of receptor-induced intercellular calcium signaling in cultured rat astrocytes. *Journal of Neuroscience*, 1997; 17: 1981-1992.
- VICARIO, C. Regulación del metabolismo del lactato en células aisladas de cerebro de rata. Universidad de Salamanca. Facultad de Farmacia. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, 1991; 263 págs.
- WANIEWSKI, R. Physiological levels of ammonia regulate glutamine synthesis from extracellular glutamate in astrocyte cultures. *Journal of Neurochemistry*, 1992; 58: 167-174.
- ZANOTTI, S.; CHARLES, A. Extracellular calcium sensing by glía cells: low extracellular calcium induces intracellular calcium release and intracellular signaling. *Journal of Neurochemistry*, 1997; 2: 594-602.
- ZHU, L. Modulation of mitochondrial Ca^{+2} homeostasis by Bcl-2. *Journal of Biology Chemistry*, 1999; 274: 33267-33273.