

La albúmina se comporta como un potente activador de la piruvato deshidrogenasa en neuronas y astrocitos de rata en cultivo primario

Albumin strongly activates pyruvate dehydrogenase-catalyzed reaction in rat neurons and astrocytes from primary culture.

TABERNERO, A., MEDINA, A., SÁNCHEZ-ABARCA, L. I. 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

El cerebro de neonato es capaz de captar albúmina de la sangre, exclusivamente, durante el período perinatal (1). Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio indicaban que la presencia de albúmina afectaba al metabolismo del cerebro de neonato (2, 3). En el presente trabajo estudiamos las vías metabólicas afectadas por la albúmina, en neuronas y astrocitos en cultivo primario. Para ello empleamos glucosa marcada radiactivamente en distintos carbonos (4). Nuestros resultados muestran que los efectos más importantes de la proteína tienen lugar a nivel de la piruvato deshidrogenasa y del "escape de carbonos" para la síntesis de neurotransmisores. En astrocitos, el efecto es, cuantitativamente, más importante que en neuronas, y se ven afectados también el ciclo tricarbónico y el ciclo de las pentosas fosfato. Por último, nuestros resultados muestran que el efecto de la albúmina sobre el metabolismo parece tener dos componentes, uno dependiente de calcio y otro independiente del mismo.

Palabras clave: Neuronas. Astrocitos. Albúmina. Metabolismo. Calcio.

ABSTRACT

Albumin is uptaken by newborn brain from blood during the perinatal period (1). Previous works showed that the presence of albumin activated newborn brain metabolism (2) in both neurons and astrocytes (3). In this work, the metabolic pathways implicated in this effect has been studied. The fate of glucose was studied using ¹⁴C-labeled glucose in different carbons in the presence or in the absence of albumin as it has been previously reported (4). Here we report that albumin highly activated pyruvate dehydrogenase-catalyzed reaction. Since the tricarboxylic acid cycle was not activated to the same extent, the efflux of carbons from the pyruvate dehydrogenase-catalyzed reaction was strongly increased. Albumin activated the pentose phosphate shunt and the tricarboxylic acid cycle in astrocytes but not in neurons. Our results showed that albumin activated astrocytes metabolism by two mechanism, and one of them was calcium-dependent.

Key words: Neurons. Astrocytes. Albumin. Metabolism. Calcium.

Recibido: 28-22-96

Aceptado: 12-12-96

BIBLID [0004-2927(1996) 37:4; 771-779]

INTRODUCCIÓN

Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio indicaban que la presencia de albúmina afectaba al metabolismo del cerebro de neonato (2), tanto en neuronas como en astrocitos (3). De hecho, el efecto de la albúmina era específico, puesto que no era mimetizable por sustancias de semejante peso molecular, como el dextrano, o por captadores artificiales de ácidos grasos, como la α -ciclodextrina (2). Estos resultados demostraban la necesidad de la entrada de la albúmina en el interior de la célula como requisito previo para llevar a cabo su efecto. En este sentido, se ha demostrado que el cerebro de neonato es capaz de captar albúmina de la sangre (1, 5) de donde, posiblemente, es transportada por los astrocitos (6) al interior de las estructuras cerebrales. Finalmente, el recambio de la albúmina intracelular obliga a su excreción en el líquido cefalorraquídeo. Es más, el proceso de captación de la albúmina parece ser una característica del cerebro en desarrollo. De hecho, se ha propuesto la existencia de un mecanismo específico de transferencia de albúmina a través de la barrera hematoencefálica, operativo exclusivamente durante la vida postnatal que desaparece una vez realizado el destete (1).

Además de los efectos provocados por la proteína en sí, hay que mencionar que la albúmina es portadora de moléculas de carácter lipofílico que pueden acceder al cerebro gracias al mecanismo arriba mencionado. En este sentido, la albúmina parece ser portadora de un fosfolípido, cuya estructura *no ha sido caracterizada, que provoca importantes efectos en astrocitos en cultivo primario* (7). Así, la albúmina incrementa los niveles citoplasmáticos de calcio y estimula la síntesis de DNA en astrocitos (7). El objetivo del presente trabajo fue conocer los pasos metabólicos afectados por la proteína, así como la posible implicación del calcio como mediador de este fenómeno.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material

La albúmina empleada, a menos que se especifique otro tipo, fue de suero bovino Sigma A7303; también se empleó albúmina delipidada de Sigma A3803 y Boehringer 238031. Otros productos utilizados en la preparación de disoluciones procedieron de las casas Sigma Cheemical Co. (St. Louis, Mo., U.S.A.) y Merck (Darmstadt, Alemania). Los productos radiactivos se obtuvieron de New England Nuclear (Boston, MA).

Métodos

Para la preparación de cultivos primarios de neuronas y astrocitos se emplearon fetos de 17 días de gestación o neonatos de rata albina Wistar de 0-24 h de vida postnatal, respectivamente, siguiendo el método comúnmente empleado en nuestro laboratorio (3). Las células se cultivaron en DMEM suplementado con un 10% de FCS. Las neuronas se utilizaron después de 7 días en cultivo y los astrocitos después de 5 ó 13 días. La velocidad de oxidación y lipogénesis se determinó siguiendo el método previamente descrito (4). Las neuronas o los astrocitos se incubaron durante 1 hora a 37 °C en PBS que contenía glucosa 5 mM ó lactato 10 mM y aproximadamente 600-900 DPM/nmol de [1-¹⁴C]-glucosa, [6-¹⁴C]-glucosa, [3,4-¹⁴C]-glucosa ó 100 DPM/nmol de [U-¹⁴C]-lactato en presencia o ausencia de un 2% de albúmina. En algunos experimentos, los astrocitos se incubaron en ausencia de calcio, para ello se preincubaron durante 20 minutos con EGTA 1mM y se mantuvo esta misma concentración durante la incubación en un medio libre de calcio. No se observaron diferencias significativas entre los valores obtenidos en medio con calcio y los obtenidos en medio sin calcio + EGTA. Se determinó la velocidad de oxidación mediante la cuantificación del [¹⁴CO₂] liberado durante la incubación. Asimismo se determinó la velocidad de síntesis de lípidos, cuantificando la radioactividad existente en el extracto lipídico.

RESULTADOS

Debido a que la albúmina activa el metabolismo tanto en neuronas como en astrocitos (3), nos propusimos investigar las vías metabólicas afectadas por la proteína en estos dos tipos de células. Para ello, empleamos glucosa marcada radiactivamente en distintos carbonos. Así, la glucosa pierde el carbono 6 en forma de CO₂ en el ciclo tricarbóxico, mientras que el carbono 1 se pierde, además, en el ciclo de las pentosas fosfato. Por tanto la velocidad de oxidación de [6-¹⁴C]glucosa será un índice de la velocidad del ciclo tricarbóxico y la diferencia entre la velocidad oxidación de la [1-¹⁴C]glucosa y la [6-¹⁴C]glucosa será un índice de la velocidad del ciclo de las pentosas fosfato (8, 9, 10). Por otra parte, la glucosa se descarboxila en la reacción catalizada por la piruvato deshidrogenasa perdiendo los carbonos 3 y 4. Por tanto, la oxidación de la [3,4-¹⁴C]glucosa será un índice de la actividad de esta enzima (8, 9, 11). Por lo que respecta a la incorporación en lípidos, los carbonos 3 y 4 de la glucosa sólo se incorporan en glicerol, mientras que el resto lo hace, además, en ácidos grasos y esteroides. Por tanto la lipogénesis a partir de [3,4-¹⁴C]glucosa podrá ser empleada como índice de la síntesis de glicerol, mientras que la diferencia entre la lipogénesis a partir

de [6-¹⁴C]glucosa y [3,4-¹⁴C]glucosa será un índice de la síntesis de ácidos grasos y esteroides.

Nuestros resultados muestran que la vía metabólica más afectada por la presencia de la albúmina fue la reacción catalizada por la piruvato deshidrogenasa tanto en neuronas (55%) como en astrocitos (141%). La velocidad del ciclo tricarboxílico experimentó un incremento del 68% en astrocitos, sin modificarse de forma significativa en neuronas. Por su parte, el ciclo de las pentosa fosfato aumentó un 28% en astrocitos y no se modificó de forma significativa en neuronas (figura 1). Además cuantificamos el "escape de carbonos" del ciclo tricarboxílico, es decir los carbonos procedentes de la reacción catalizada por la piruvato deshidrogenasa que no se oxidan en el ciclo tricarboxílico. Para ello calculamos la diferencia entre la velocidad de oxidación de [3,4-¹⁴C]glucosa y [6-¹⁴C]glucosa. La albúmina aumentó de forma considerable el "escape de carbonos" en astrocitos un 150% y en neuronas un 57% (figura 1).

Las vías responsables de la síntesis de lípidos no se vieron modificadas de forma significativa por la presencia de la albúmina en astrocitos (figura 2a). Sin embargo, en neuronas la albúmina provocó una disminución en la velocidad de síntesis de glicerol de aproximadamente un 50% sin modificar de forma significativa la síntesis de ácidos grasos y esteroides (figura 2b).

Con objeto de conocer si los efectos sobre el metabolismo de la albúmina eran consecuencia de un incremento en los niveles intracelulares de calcio, depletamos las células en calcio tal y como se describe en "Material y Métodos". La presencia de albúmina duplicó la oxidación de lactato en astrocitos en cultivo primario, sin embargo, en ausencia de calcio el incremento en la velocidad de oxidación de lactato fue la mitad, aproximadamente un 50% (figura 3). El incremento en los niveles de calcio intracelulares provocado por la albúmina, es mediado por una sustancia lipídica, de manera que la albúmina fuertemente delipidada (por ejemplo, Sigma A3803 ó Boehringer 238031) carece de efecto (7). La figura 3 muestra como estos dos tipos de albúmina incrementaron la velocidad de oxidación de lactato aproximadamente un 60%, sin llegar al 104% de la proteína parcialmente purificada.

DISCUSIÓN

En trabajos previos llevados a cabo por nuestro grupo se puso de manifiesto la importancia de la albúmina como activador del metabolismo en el cerebro de neonato (2), este efecto se observó tanto en neuronas como en astrocitos (3). En el presente trabajo se muestran las principales vías metabólicas reguladas por la albúmina en neuronas y astrocitos en cultivo primario. Así, en neuronas (figura 1a) observamos un incremento en la utilización de gluco-

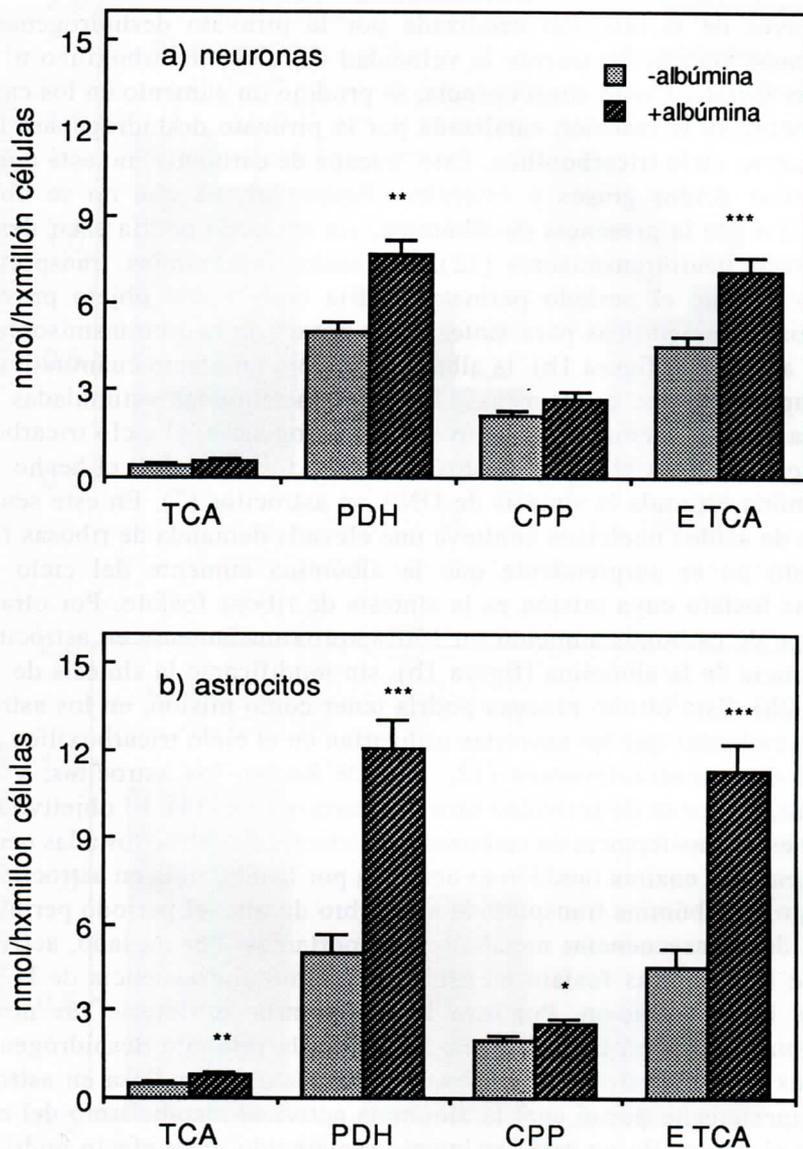


Fig. 1.—Efecto de la albúmina en la oxidación de glucosa en neuronas y astrocitos. Neuronas (a) y astrocitos (b) en cultivo primario se incubaron en presencia de glucosa 5mM y [6-¹⁴C]glucosa, [1-¹⁴C]glucosa ó [3,4-¹⁴C]glucosa (600-900DPM/nmol), en presencia o en ausencia de albúmina 2%. Se determinó la velocidad de oxidación y se estimó la velocidad de las diferentes vías metabólicas como se describe en la sección de Resultados. Los resultados son medias±SEM de 5 experimentos. La significatividad de las diferencias entre los valores obtenidos en ausencia de albúmina vs en presencia se expresa como * p<0.05, **p<0.01, *** p<0.001 (según el test de la t de student). TCA, ciclo tricarboxílico; PDH, piruvato deshidrogenasa; CPP, ciclo de las pentosas fosfato; E TCA, “escape de carbonos” del ciclo tricarboxílico.

sa a través de la reacción catalizada por la piruvato deshidrogenasa, sin modificarse significativamente la velocidad del ciclo tricarboxílico ni de las pentosas fosfato. Como consecuencia, se produjo un aumento en los carbonos procedentes de la reacción catalizada por la piruvato deshidrogenasa que no se oxidan en ciclo tricarboxílico. Este "escape de carbonos" no está destinado a sintetizar ácidos grasos y esteroides (figura 2a), ya que no se observan diferencias por la presencia de albúmina, sin embargo podría estar destinado a sintetizar neurotransmisores (12). Por tanto, la albúmina transportada al cerebro durante el período perinatal podría tener como objeto proveer de carbonos a las neuronas para síntesis "de novo" de neurotransmisores.

En astrocitos (figura 1b), la albúmina ejerció un efecto cuantitativamente más importante que en neuronas. Las vías metabólicas estimuladas por la proteína fueron, además de la piruvato deshidrogenasa, el ciclo tricarboxílico y en menor medida el de las pentosas fosfato. Cabe resaltar el hecho de que la albúmina estimula la síntesis de DNA en astrocitos (7). En este sentido la síntesis de ácidos nucleicos conlleva una elevada demanda de ribosas fosfato. Por tanto no es sorprendente que la albúmina aumente del ciclo de las pentosas fosfato cuya misión es la síntesis de ribosa fosfato. Por otra parte, el escape de carbonos aumentó un 150% aproximadamente en astrocitos por la presencia de la albúmina (figura 1b), sin modificarse la síntesis de lípidos (figura 2b). Este último proceso podría tener como misión, en los astrocitos, proveer carbonos que las neuronas utilizarían en el ciclo tricarboxílico para la síntesis de neurotransmisores (12, 13). De hecho, los astrocitos, y no las neuronas, disponen de actividad piruvato carboxilasa (14). El objetivo de esta enzima es la transferencia de carbonos procedentes de astrocitos a las neuronas, pues bien, esta enzima también es activada por la albúmina en astrocitos (15). Por tanto, la albúmina transportada al cerebro durante el período perinatal (1) tendría dos consecuencias metabólicas importantes. Por un lado, activaría el ciclo de las pentosas fosfato en astrocitos, como consecuencia de la activación de la proliferación. Por otro lado, activaría la síntesis "de novo" de neurotransmisores en las neuronas, activando la piruvato deshidrogenasa en neuronas y la piruvato deshidrogenasa y piruvato carboxilasa en astrocitos.

El mecanismo por el cual la albúmina activa el metabolismo del cerebro durante el desarrollo no está totalmente esclarecido. Este efecto podría tener lugar mediante la captación de acil-CoA por la albúmina. En este sentido, se ha descrito que los acil-CoA inhiben la piruvato deshidrogenasa (16). Esta hipótesis requiere la entrada de la albúmina en el interior de la célula, hecho que tiene lugar específicamente durante el período perinatal (1). Es más Vicario y col. (2) demostraron que sustancias captadoras de ácidos grasos, pero incapaces de ser transportadas al interior de la célula como la α -ciclodextrina, no son capaces de mimetizar el efecto de la albúmina. Por otra parte, en astrocitos, la albúmina provoca un aumento en los niveles citoplasmáticos de

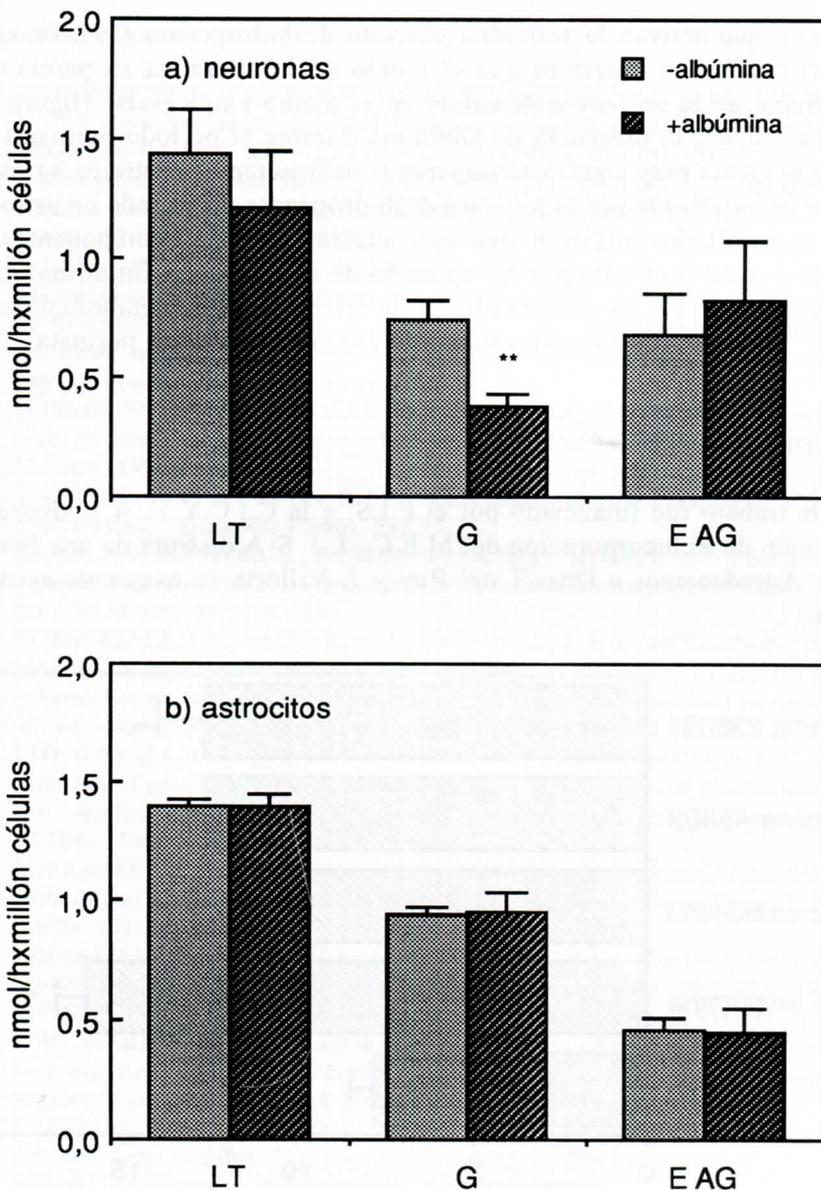


Fig. 2.—Efecto de la albúmina en la lipogénesis de glucosa en neuronas y astrocitos. Neuronas (a) y astrocitos (b) en cultivo primario se incubaron en presencia de glucosa 5mM y [6-¹⁴C]glucosa, [1-¹⁴C]glucosa ó [3,4-¹⁴C]glucosa (600-900DPM/nmol). Se determinó la velocidad de lipogénesis y se estimó la velocidad de las diferentes vías metabólicas como se describe en la sección de Resultados. Los resultados son medias±SEM de 5 experimentos. La significatividad de las diferencias entre los valores obtenidos en ausencia de albúmina vs en presencia se expresa como **p<0.01 (según el test de la t de student). LT, lipogénesis total; G, síntesis de glicerol; E AG, esteroles y ácidos grasos.

calcio (7), que activan la actividad piruvato deshidrogenasa (17). En efecto, nuestros resultados muestran que el efecto de la albúmina es parcialmente dependiente de la presencia de calcio en el medio extracelular (figura 3).

En resumen, la presencia de albúmina durante el período perinatal en el cerebro aumenta muy significativamente la utilización de sustratos a través de la reacción catalizada por la piruvato deshidrogenasa sobre todo en astrocitos. Nuestros resultados sugieren que este efecto tiene dos componentes, uno mediado por calcio y otro por la captación de acil-CoA. El fin último de este fenómeno sería proveer a las neuronas de intermediarios metabólicos para la síntesis "de novo" de neurotransmisores durante el período perinatal.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el F.I.S. y la C.I.C.Y.T. A.T. disfruta de una Acción de Reincorporación del M.E.C., L.I. S-A disfruta de una Beca del M.E.C. Agradecemos a Dña. T del Rey y J. Villoria su excelente asistencia técnica.

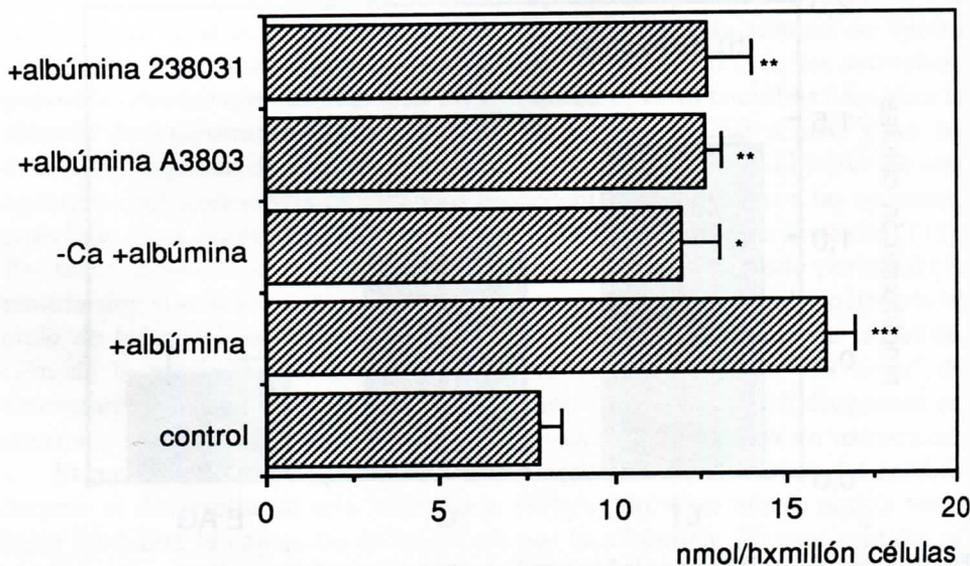


Fig. 3.—Dependencia del calcio en el efecto de la albúmina sobre el metabolismo de astrocitos. Astrocitos en cultivo primario se incubaron en presencia de Lactato 10mM y [U-¹⁴C]lactato (600-900DPM/nmol), en medio con o sin calcio+EGTA 1mM, y las diferentes albúminas 2%. Se determinó la velocidad de oxidación. Los resultados son medias±SEM de 5 experimentos. La significatividad de las diferencias entre los valores obtenidos en ausencia de albúmina vs en presencia se expresa como * p<0.05, **p<0.01, *** p<0.001 (según el test de la t de student).

BIBLIOGRAFÍA

- (1) HABGOOD, M. D., SEDGWICK, J. E. C., DZIEGIELEWSKA, K. M., SAUNDERS, N. R.: "A developmentally regulated blood-cerebrospinal fluid transfer mechanism for albumin in immature rats". *J Physiol-London* (1992), **456**:181-192.
- (2) VICARIO, C., ARIZMENDI, C., MALLOCH, J. G., CLARK, J. B., MEDINA, J. M.: "Lactate utilization by isolated cells from early neonatal rat brain". *J Neurochem* (1991), **57**:1700-1707.
- (3) VICARIO, C., TABERNERO, A., MEDINA, J. M.: "Regulation of lactate metabolism by albumin in rat neurons and astrocytes from primary culture". *Pediatr Res* (1993), **34**:709-715.
- (4) TABERNERO, A., GIAUME, C., MEDINA, J. M.: "Endothelin-1 regulates glucose utilization in cultured astrocytes by controlling intercellular communication through gap junctions". *Glia* (1996), **16**:187-195.
- (5) OHSUGI, M., SATO, H., YAMAMURA, H.: "Transfer of I-125-albumin from blood to brain in newborn rats and the effect of hyperbilirubinemia on the transfer". *Biol Neonate* (1992), **62**:47-54.
- (6) JUURLINK, B. H. J., DEVON, R. M.: "Macromolecular translocation-a possible function of astrocytes". *Brain Res* (1990), **533**:73-77.
- (7) NADAL, A., FUENTES, E., PASTOR, J., MCNAUGHTON, P. A.: "Plasma albumin is a potent trigger of calcium signals and DNA synthesis in astrocytes". *Proc Natl Acad Sci USA* (1995), **92**:1426-1430.
- (8) HOTHERSALL, J. S., BAQUER, N. Z., GREENBAUM, A. L., MCLEAN, P.: "Alternative pathways of glucose utilization in brain. Changes in the pattern of glucose utilization in brain during development and the effect of phenazine methosulphate on the integration of metabolic routes". *Arch Biochem Biophys* (1979), **198**:478-492.
- (9) HOTHERSALL, J. S., ZUBARIU, S., MCLEAN, P., GREENBAUM, A. L.: "Alternative pathways of glucose utilization in brain; changes in the pattern of glucose utilization in brain resulting from treatment of rats with 6-aminonicotinamide". *J Neurochem* (1981), **37**:1484-1496.
- (10) LARRABEE, M. G.: "Evaluation of the pentose phosphate pathway from $^{14}\text{CO}_2$ data. Fallibility of a classic equation when applied to non-homogeneous tissues". *Biochem J* (1990), **272**:127-132.
- (11) CHEESEMAN, A. J., CLARCK, J. B.: "Influence of the malate-aspartate shuttle on oxidative metabolism in synaptosomes". *J Neurochem* (1988), **50**:1559-1565.
- (12) SONNEWALD, U., WESTERGAARD, N., KRANE, J., UNSGARD, G., PETERSEN, S. B., SCHOUSBOE, A.: "First direct demonstration of preferential release of citrate from astrocytes using ^{13}C -NMR spectroscopy of cultured neurons and astrocytes". *Neurosci Lett* (1991), **128**:235-239.
- (13) KAUFMAN, E. E., DRISCOLL, B. F.: "Carbon dioxide fixation in neuronal and astroglial cells in culture". *J Neurochem* (1992), **58**:258-262.
- (14) SHANK, R., BENNETT, G., FREYTAG, S. O., CAMPBELL, G. L.: "Pyruvate carboxylase: an astrocyte-specific enzyme implicated in the replenishment of amino acid neurotransmitter pools". *Brain Res* (1985), **329**:364-367.
- (15) GIAUME, C., TABERNERO, A., MEDINA, J. M.: "Metabolic trafficking through astrocytic gap junctions". *Glia* (in press).
- (16) LAI, J. C. K., COOPER, A. J. L.: "Neurotoxicity of ammonia and fatty acids: differential inhibition of mitochondrial dehydrogenases by ammonia and fatty acyl CoA derivatives". *Neurochem Res* (1991), **16**:795-803.
- (17) HANSFORD, R. G., CASTRO, F.: "Role of calcium in pyruvate dehydrogenase interconversion in brain mitochondria and synaptosomes". *Biochem J* (1985), **227**:129-136.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) HABGOOD, M. D., SEDGWICK, J. E. C., DZIEGIELEWSKA, K. M., SAUNDERS, N. R.: "A developmentally regulated blood-cerebrospinal fluid transfer mechanism for albumin in immature rats". *J Physiol-London* (1992), **456**:181-192.
- (2) VICARIO, C., ARIZMENDI, C., MALLOCH, J. G., CLARK, J. B., MEDINA, J. M.: "Lactate utilization by isolated cells from early neonatal rat brain". *J Neurochem* (1991), **57**:1700-1707.
- (3) VICARIO, C., TABERNERO, A., MEDINA, J. M.: "Regulation of lactate metabolism by albumin in rat neurons and astrocytes from primary culture". *Pediatr Res* (1993), **34**:709-715.
- (4) TABERNERO, A., GIAUME, C., MEDINA, J. M.: "Endothelin-1 regulates glucose utilization in cultured astrocytes by controlling intercellular communication through gap junctions". *Glia* (1996), **16**:187-195.
- (5) OHSUGI, M., SATO, H., YAMAMURA, H.: "Transfer of I-125-albumin from blood to brain in newborn rats and the effect of hyperbilirubinemia on the transfer". *Biol Neonate* (1992), **62**:47-54.
- (6) JUURLINK, B. H. J., DEVON, R. M.: "Macromolecular translocation-a possible function of astrocytes". *Brain Res* (1990), **533**:73-77.
- (7) NADAL, A., FUENTES, E., PASTOR, J., MCNAUGHTON, P. A.: "Plasma albumin is a potent trigger of calcium signals and DNA synthesis in astrocytes". *Proc Natl Acad Sci USA* (1995), **92**:1426-1430.
- (8) HOTHERSALL, J. S., BAQUER, N. Z., GREENBAUM, A. L., MCLEAN, P.: "Alternative pathways of glucose utilization in brain. Changes in the pattern of glucose utilization in brain during development and the effect of phenazine methosulphate on the integration of metabolic routes". *Arch Biochem Biophys* (1979), **198**:478-492.
- (9) HOTHERSALL, J. S., ZUBARIU, S., MCLEAN, P., GREENBAUM, A. L.: "Alternative pathways of glucose utilization in brain; changes in the pattern of glucose utilization in brain resulting from treatment of rats with 6-aminonicotinamide". *J Neurochem* (1981), **37**:1484-1496.
- (10) LARRABEE, M. G.: "Evaluation of the pentose phosphate pathway from $^{14}\text{CO}_2$ data. Fallibility of a classic equation when applied to non-homogeneous tissues". *Biochem J* (1990), **272**:127-132.
- (11) CHEESEMAN, A. J., CLARCK, J. B.: "Influence of the malate-aspartate shuttle on oxidative metabolism in synaptosomes". *J Neurochem* (1988), **50**:1559-1565.
- (12) SONNEWALD, U., WESTERGAARD, N., KRANE, J., UNSGARD, G., PETERSEN, S. B., SCHOUSBOE, A.: "First direct demonstration of preferential release of citrate from astrocytes using ^{13}C -NMR spectroscopy of cultured neurons and astrocytes". *Neurosci Lett* (1991), **128**:235-239.
- (13) KAUFMAN, E. E., DRISCOLL, B. F.: "Carbon dioxide fixation in neuronal and astroglial cells in culture". *J Neurochem* (1992), **58**:258-262.
- (14) SHANK, R., BENNETT, G., FREYTAG, S. O., CAMPBELL, G. L.: "Pyruvate carboxylase: an astrocyte-specific enzyme implicated in the replenishment of amino acid neurotransmitter pools". *Brain Res* (1985), **329**:364-367.
- (15) GIAUME, C., TABERNERO, A., MEDINA, J. M.: "Metabolic trafficking through astrocytic gap junctions". *Glia* (in press).
- (16) LAI, J. C. K., COOPER, A. J. L.: "Neurotoxicity of ammonia and fatty acids: differential inhibition of mitochondrial dehydrogenases by ammonia and fatty acyl CoA derivatives". *Neurochem Res* (1991), **16**:795-803.
- (17) HANSFORD, R. G., CASTRO, F.: "Role of calcium in pyruvate dehydrogenase interconversion in brain mitochondria and synaptosomes". *Biochem J* (1985), **227**:129-136.