

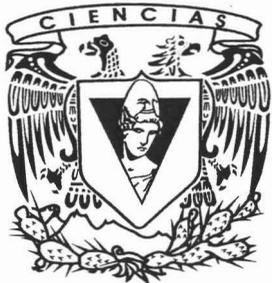


**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**ASOCIACIÓN DEL EDEMA CELULAR CON EL
ESTRÉS OXIDATIVO EN LA RETINA. LIBERACIÓN
DE AMINOÁCIDOS.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G O
P R E S E N T A:
JOSUÉ ORLANDO RAMÍREZ JARQUÍN



**FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM**

DIRECTOR DE TESIS: DR. LENIN DAVID OCHOA DE LA PAZ



**FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR**

2005

m. 348458



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Josué Orlando Ramírez Jarquín

FECHA: 28 / SEPTIEMBRE / 05

FIRMA: [Signature]

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:
"Asociación del edema celular con el estrés oxidativo en la Retina.
Liberación de aminoácidos."

realizado por Josué Orlando Ramírez Jarquín

con número de cuenta 09718828-3 , quien cubrió los créditos de la carrera de: **Biología**

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario Dr. Lenin David Ochoa de la Paz

Propietario Dra. Herminia Pasantes Morales

Propietario Dr. Julio Eduardo Roque Morán Andrade

Suplente Dr. José Fernando Peña Ortega

Suplente M. en C. Benito Ordaz Sánchez

[Handwritten signatures of the listed faculty members]

Consejo Departamental de Biología

[Signature of Juan Manuel Rodríguez Chávez]
M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de la Dra.

Herminia Pasantes-Morales.

Instituto de Fisiología Celular. Universidad Nacional

Autónoma de México.

A MI FAMILIA CON TODO MI CARIÑO,
ADMIRACIÓN Y RESPETO...

MIS PADRES:

CAMELIA JARQUÍN LÓPEZ
Y
FRANCISCO RAMÍREZ

Gracias jefecitos....

Y MIS HERMANOS:

URI NIMROD RAMÍREZ JARQUÍN
ARELY ESMERALDA RAMÍREZ JARQUÍN

Gracias carnalitos...

Agradecimientos:

A mis padres, **Francisco y Camelia**, por toda su paciencia, cariño, cuidados, apoyo y comprensión en todo momento.

A mis hermanos **Uri-Nimrod y Arely-Esmeralda** por apoyarme en todo momento y por la paciencia que me han tenido durante tantos años.

A mi gran amigo **Etienne Rajchenberg Ceceña**, por todo el apoyo que me dio durante el transcurso de la carrera y por cada uno de los grandes momentos vividos a lo largo de la misma, pero sobre todo por su amistad, sencillez y honestidad.

A la Dra. **Herminia Pasantes** por permitirme hacer mi tesis en su laboratorio y por su apoyo moral y académico.

Al Doctor **Lenin David Ochoa-de la Paz** porque, aún en momentos muy duros, nunca dejó de apoyarme y de dirigir este trabajo. Sobretodo gracias por permitirme considerarlo un amigo.

Al M. en C. y cas cas cas, casi pues, doitor **Benito Ordaz-Sánchez** por todo su apoyo y amistad, confianza y sinceridad, no sólo durante mi estancia en el laboratoio, sino también fuera de éste.

Al Dr. **Fernando Peña** porque siempre me ha brindado su apoyo; y por la sinceridad con la que me ha tratado. Además de los partidos de pumas, a los que nos tocó ir a verlos perder en unas ocasiones y ganar en otras.

Al Dr. **Julio Morán** por sus consejos, críticas y apoyo.

A mis padrinos: **Ligorio Juárez Ramírez y Lucia Gutiérrez Guzmán**, por todo el apoyo y la confianza que me han otorgado durante toda mi vida.

A mis tíos, **Bertario Ramírez el "Filo"** y mi tía **Blanca Estela Hernández** por siempre contar con su confianza y ayuda. A mis primos **Rolando Ramírez Hernández y Ma. de Lourdez Ramírez Hernández** por su amistad y permitirme convivir con ellos.

A mi tío **Alfredo Jarquín López** por su amistad y por ser un ejemplo a seguir como ser humano.

A la familia Ramírez-Rios: mis tíos **Paula Ríoz-Gutiérrez y Domingo Ramírez Juárez** por todo el apoyo otorgado a lo largo de este tiempo; y mis primos **Sergio-Octavio Ramírez Ríos y René-Rodrigo Ramírez Ríos** por ayudarme y darme confianza en todo momento y por haberme permitido convivir, pocos sí, pero muy gratos momentos con ellos.

A mi prima **Yolanda Jarquín Jiménez** por brindarme tanto apoyo y confianza durante tantos años y a mi tía **Vicenta Jiménez Reyes** por su apoyo.

A mi primos **José Juan Jarquín Cortés y María López Hernández, Nieves**, por permitirme convivir con ellos tantos momentos tan alegres y cotorros; y por permitirme tener su confianza.

A mi tío **Jaime Ramírez** por siempre brindarme su apoyo y un lugar dentro de su hogar.

A **Martha Alejandra Gómez-López** por hacer que mis clases de inglés sean amenas y por tener su amistad.

A la doitora **Deyanira Guadalupe Acuña-Hernández** por las porras que me ha dado y por darme ánimos para continuar.

A **Claudia Alva Sánchez** por toda la ayuda que me brindó y por su amistad.

A **Rosita (Rosa Rivera Alvarado)** por todas las lecciones que aprendí gracias a sus palabras de apoyo, incluyendo los castigos de lavar el material de laboratorio.

A mis amigos: **Etienne** (otra vez), **Gustavo Becerra-Durán, Carlo Ríos, la Bere, Lorena, Yuko**, por cada momento que tuvimos, cada práctica de campo, cada chela y cada ... pues cada cosa que pasamos. A **Ángel Andrade** por cada platica y chesta que hemos tenido y por su amistad. A **Héctor Hernández-Martínez** por ser mi amigo en las buenas y en las malas. A **Alejandra** (también otra vez), **Deyanira** (Again), **la Gelis, la Fatima, Erika Teresa, Olivia, Freddy Arturo, Erika VJ** y a los que se me estén escapando en el trance, porque todos me han apoyado. A **Erika Vázquez Juárez** por los partidos de los pumas a los que asistimos y por las porras que me dio en esos momentos para acabar este trabajo.

A mis compañeros del laboratorio en que estoy actualmente: **María García Anaya "La Feroz"** ups! No, perdón, "**La ex-feroz**" por todos los paros hechos y por esas pláticas tan amenas en el metro Xola; a **Daniel Chapela** por darme su amistad y apoyo en cada momento; a **Cecila Zavala** por los paros que me ha hecho; al doc **Sergio Lara** por hacer divertidos los momentos en el lab; a **Armando, Miguelitro, Roberto Liliana**, etc etc..

A la Gelis, **Angela Cortés Hernández**, y la **Fátima** por las clases de baile y por su paciencia en las mismas; y por cada chilena que hemos bailado.

A Biól. **Claudia Peña-Segura** por el apoyo técnico brindado durante mi estancia en el laboratorio y por apoyarme en aquellos momentos difíciles.

Y a todos los que se me hayan escapado, de antemano una disculpa, pero si sigo así no acabo y lo peor es que no alcanzaría para las chelas.

Y finalmente a **Dios** por permitirme seguir en este camino.

INDICE

Resumen.....	4
Introducción.....	5
1) Volumen celular.....	5
2) Cambios de volumen en el cerebro.....	7
3) Mecanismos de regulación de volumen celular.....	10
I. Decremento Regulator del Volumen (DRV).....	11
II. Incremento Regulator del Volumen (IRV).....	12
4) Mecanismos de liberación de osmolitos.....	13
I. Movilización del Cl ⁻	15
II. Movilización del K ⁺	17
III. Movilización de aminoácidos que funcionan como osmolitos.....	18
5) Fisiología de la retina.....	21
6) Radicales libres y retina.....	25
7) Edema celular en la retina.....	26
I. Edema anisomótico.....	27
II. Edema isomótico.....	27
a. Condiciones de K ⁺ extracelular elevado.....	28
b. Estrés oxidativo.....	29
Objetivos generales y específicos.....	33
Metodología.....	33
Resultados.....	38
Discusión.....	50
Conclusiones.....	59
Referencias.....	60

RESUMEN

Los cuadros de isquemia-reperfusión en la retina son causa de edema celular y degeneración macular, debido a la formación de radicales libres y a la baja en la carga energética de la célula. Estos efectos podrían estar asociados a la liberación y acumulación excesiva de aminoácidos excitadores, en particular el ácido glutámico. El objetivo de este trabajo fue examinar una posible relación entre el edema celular y el estrés oxidativo, midiendo la liberación de aminoácidos en la retina aislada de pollo. Los aminoácidos estudiados fueron el ácido glutámico y la taurina. En presencia de H_2O_2 (100 μM) se observó una liberación de ácido glutámico y taurina con un máximo a los 20 minutos de exposición. Esta liberación no se ve afectada en condiciones hiperosmóticas (400mOsm), lo que indica que no es producto de un incremento del volumen celular. Algunos bloqueadores de canales de Cl^- , como el DIDS (500 μM), el NPPB (100 μM) y el ácido niflúmico (600 μM), inhibieron la liberación de ácido glutámico y taurina estimulada por H_2O_2 , lo que sugiere que estos aminoácidos se están movilizand por una vía aniónica, posiblemente activada y/o modulada por H_2O_2 . Con estos resultados se puede concluir que la liberación de aminoácidos que se observa en condiciones de estrés oxidativo no se debe a un incremento de volumen celular, sino posiblemente a la activación de una vía aniónica inducida por H_2O_2 .

INTRODUCCION

1. Volumen celular

La capacidad que tienen las células para mantener su volumen constante es una propiedad fundamental para su supervivencia. Es uno de los mecanismos homeostáticos más importantes y, probablemente, uno de los más antiguos, siendo un distintivo a lo largo de la escala evolutiva (Chamberlin y Strange, 1989). Esta capacidad de adaptación se identificó inicialmente en las células de especies eurihalinas, las cuales se encuentran expuestas a condiciones de osmolaridad externa variable (Gilles, 1987). Esta respuesta adaptativa se ha encontrado consistentemente en prácticamente todas las células animales que están siempre rodeadas de fluidos de osmolaridad muy controlada, en valores de aproximadamente 285 mOsm/L, con sólo pequeñas fluctuaciones que no exceden de un 3% (Hoffmann y Simonsen, 1989). Sin embargo, a nivel celular existen numerosas situaciones fisiológicas en las que pueden generarse microgradientes osmóticos que producen cambios locales y transitorios en el volumen de los compartimentos intracelulares y que deben ser ajustados. Procesos como el transporte iónico, la secreción y la acumulación de nutrientes producen continuos cambios de volumen celular (Hoffmann y Simonsen, 1989; Chamberlin y Strange, 1989).

Las células pueden hacer uso de varias estrategias para manejar el estrés osmótico: 1) los cambios osmóticos pueden ser ignorados por la presencia de una pared celular rígida como en las células vegetales (Chamberlin y Strange, 1989;

Gutknecht y cols., 1978), 2) pueden ser eludidos, como en el caso de ciertos moluscos, al cerrar su concha (Chamberlin y Strange, 1989; Smith y Pierce, 1987) ó 3) pueden ser contrarrestados por la modificación de la concentración intracelular de solutos osmóticamente activos (osmolitos) y, consecuentemente, por un cambio en el contenido de agua. Los organismos con pared celular, como las plantas y las bacterias, pueden ignorar cambios osmóticos dentro de cierto límite, ya que la rigidez de la pared previene cambios en el volumen celular. En cambio las membranas de las células animales son elásticas y no pueden soportar una diferencia significativa en la presión hidrostática, por lo que tienen que activar mecanismos de transporte de osmolitos, los que al ser traslocados contrarrestan los cambios del volumen celular en condiciones anisomóticas (Chamberlin y Strange, 1989; Pasantes-Morales y cols., 1990; Sarkadi y Parker, 1991; Lang, 1998; Wegmann, 1986; Moran y Pierce, 1984; Gutknecht, y cols., 1978; Smith y Pierce, 1987). La movilización de solutos en respuesta a los cambios en la osmolaridad del medio externo ocurre a través de canales y acarreadores especializados en el transporte de especies moleculares diversas y en menor medida, a través de procesos de síntesis (Chamberlin y Strange, 1989).

La regulación de volumen celular es un proceso complejo que implica varios eventos: primero, la célula debe ser capaz de sensor los cambios en su volumen, posteriormente la célula debe reaccionar a los cambios de volumen que ha detectado, iniciando un proceso regulador que modifique el contenido intracelular de solutos en la dirección necesaria para corregir el contenido celular de agua. Finalmente, la célula, durante el proceso regulador, debe "recordar" su volumen

original e inactivar los mecanismos que se dispararon por el cambio de presión osmótica (Sánchez-Olea y Pasantes-Morales, 1993). En términos generales, en condiciones hiposmóticas las células ganan agua, y por consecuencia aumentan su volumen. Ante estas condiciones, las células responden expulsando osmolitos hacia el medio extracelular, para alcanzar el equilibrio osmótico con el medio externo. Este proceso se denomina decremento regulador de volumen (DRV) (Okada y cols., 2001; Chamberlin y Strange, 1989; Sánchez Olea y Pasantes-Morales, 1993). Cuando, por el contrario, las células se encuentran en condiciones hiperosmóticas, pierden agua y su tamaño disminuye. El mecanismo activado es opuesto al activado bajo condiciones hiposmóticas, es decir, acumulan osmolitos en su interior lo que induce una entrada de agua. Este proceso se conoce como incremento regulador de volumen (IRV) (Esquema 1) (Okada y cols., 2001; Chamberlin y Strange, 1989; Sánchez Olea y Pasantes-Morales, 1993).

En el caso de las neuronas, éstas están continuamente sometidas a alteraciones en el contenido de solutos intracelulares, debido a la generación de impulsos nerviosos, y a cambios en la concentración de neurotransmisores los cuales producen cambios en los flujos netos de agua y solutos a través de la membrana plasmática (Choi, 1985).

2. Cambios de volumen en el cerebro

Si bien, un aumento en el volumen celular es un inconveniente para cualquier órgano, es particularmente dramático en el caso del cerebro pues los límites a la

expansión impuestos por el cráneo, no dan márgenes para el amortiguamiento de los cambios en el volumen celular intracraneal y, a medida que la presión aumenta, el desplazamiento caudal del parénquima cerebral a través del *foramen magnum* lleva a la muerte del individuo por paro respiratorio y cardiaco (Kimelberg, 1995). Este edema cerebral está dado por un incremento en la concentración de agua intracerebral, en respuesta a cuadros de daño como compresión vascular, anoxia y muerte neuronal (McManus y Churchwell, 1994). Por esto mismo, el estudio de los procesos que intervienen en la regulación del volumen celular en el cerebro es de gran importancia

Las patologías que desencadenan cambios en el volumen celular en el cerebro se pueden dividir en dos grupos: 1) **Anisomóticas** y 2) **Citotóxicas**.

El edema celular anisomótico es originado por una disminución en la osmolaridad del plasma (hiponatremia), lo cual produce una entrada de agua a las células, con el fin de alcanzar un equilibrio osmótico, y no genera daño celular en primera instancia. La hiponatremia es la causa más común de edema cerebral celular (Kimelberg y Ramson, 1986; McManus y Churchwell, 1994). Esta condición es consecuencia de un desbalance entre la ingesta y la excreción de agua y electrolitos. Este desbalance se presenta más frecuentemente en condiciones de insuficiencia hepática o renal, o por una deficiente secreción de la hormona antidiurética. Las secuelas clínicas de estas alteraciones pueden ser crisis epilépticas, edema cerebral severo y daño neuronal. La osmolaridad tiene un efecto determinante en la excitabilidad y actividad convulsiva del cerebro (Jefferys

y Haas, 1982; Taylor y Dudek, 1982; Rosen y Andrew, 1990; Andrew, 1991). Se ha observado que la hiposmolaridad acentúa la intensidad de diversos cuadros convulsivos, mientras que la hiperosmolaridad la mitiga (Rosen y Andrew, 1990; Andrew, 1991). En diferentes preparaciones, el medio hiposmótico induce una actividad epileptiforme, incluso en ausencia de comunicación sináptica (Jefferys y Hass, 1982; Taylor y Dudek, 1982).

El edema celular citotóxico o isosmótico ocurre en condiciones de osmolaridad plasmática normal y se origina por alteraciones en el transporte activo de iones y moléculas hidrosolubles. Esto trae como consecuencia un incremento en la concentración intracelular de iones, seguida por agua con el fin de alcanzar el equilibrio osmótico. Este tipo de edema se relaciona con patologías asociadas a la hiperamonemia, como la isquemia, la epilepsia, la encefalopatía hepática y el traumatismo craneoencefálico (Kimelberg y Ramson, 1986; McManus y Churchwell, 1994). En este último caso, es imperativo controlar el edema cerebral para evitar la muerte por paro cardíaco o respiratorio, como ya se mencionó. En el caso de la isquemia, el daño es debido principalmente a la reducción del flujo sanguíneo cerebral, con la subsecuente privación del oxígeno y nutrientes, junto con una liberación de ácido glutámico, que lleva a un daño neuronal irreversible en el foco isquémico, es decir, la zona donde se interrumpe por completo el flujo sanguíneo (Choi, 1996). Sin embargo, en la zona de penumbra (zona que rodea el foco isquémico) el daño se desarrolla lentamente afectando incluso otras zonas del cerebro (Choi, 1996). Los principales procesos fisiopatológicos que ocurren durante la isquemia son: 1) disminución de ATP, 2) incremento en la

concentración intracelular de Na^+ , 3) aumento en la concentración extracelular de K^+ , 4) acidosis intracelular, 5) aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular, 5) excitotoxicidad (Small y cols., 1999; Kato y Kogure, 1999; Lee y cols., 2000; Lerouet y cols., 2002; Rodrigo y cols., 2005). Posterior a estos procesos se genera una lipoperoxidación de la membrana celular, lo que conduce a un desbalance iónico y a una acumulación de agua intracelular (Macdonald y Stoodley, 1998). En general, cualquier patología que conlleve una situación de estrés oxidativo, particularmente la lipoperoxidación de las membranas celulares, tiene el riesgo de resultar en edema celular, debido a un desbalance iónico a través de las membranas deterioradas.

3. Mecanismos de regulación de volumen celular

Como se mencionó anteriormente, los cambios de volumen celular pueden desencadenar condiciones patológicas. Para evitar esto, las células deben ser capaces de regular su volumen de manera eficiente ante condiciones de estrés osmótico.

Cuando las células se encuentran en condiciones hiposmóticas, generalmente, el volumen celular se incrementa alcanzando un máximo en un tiempo variable, que depende de: 1) la velocidad en el cambio en la osmolaridad extracelular en el plano inmediatamente adyacente a la membrana plasmática, 2) la permeabilidad de la membrana plasmática al agua, 3) la relación entre área de la membrana y el volumen de la célula (Hallows y Knauf, 1994, Hoffmann y Simonsen, 1989, Lang y cols., 1998). Después de alcanzar este máximo, el volumen celular comienza a

disminuir, aún cuando la osmolaridad extracelular se mantenga por debajo del valor inicial. A este proceso activo de compensación del volumen, que generalmente ocurre en un periodo de varios minutos, se le denomina como decremento regulador del volumen (DRV) (Okada y cols., 2001; Chamberlin y Strange, 1989; Sánchez Olea y Pasantes-Morales, 1993). En la mayoría de los casos, las células no retornan totalmente a su volumen inicial, sino que alcanzan un nivel estable ligeramente superior (Pasantes-Morales y cols., 1993). De manera análoga, cuando las células se mantienen en una solución hiperosmótica, su volumen disminuye y en la mayoría de los casos, tienden a recuperarse mediante el proceso conocido como Incremento Regulador del Volumen (IRV) (Okada y cols., 2001; Chamberlin y Strange, 1989; Sánchez Olea y Pasantes-Morales y cols., 1993).

I) Decremento Regulador del Volumen (DRV)

Cuando las células se exponen a un medio hiposmótico aumentan su volumen en respuesta a esta condición encontrando el máximo hinchamiento un minuto después del estímulo (Pasantes-Morales y cols., 1993). A partir de este momento, la célula desencadena un mecanismo de recuperación de su volumen inicial, lo cual toma un lapso de entre 15 y 30 minutos posterior al estímulo, aún cuando persistan las condiciones hiponatrémicas (Pasantes-Morales y cols., 1993). A este proceso de regulación de volumen celular en condiciones hiposmóticas, se le denomina DRV (Okada y cols., 2001; Chamberlin y Strange, 1989; Sánchez-Olea

y Pasantes-Morales, 1993, Hoffmann y Simonsen, 1989). El DRV se realiza mediante la movilización de osmolitos intracelulares hacia el espacio extracelular. Los principales osmolitos involucrados en el DRV son el K^+ y el Cl^- , aminoácidos y el mioinositol. (Pasantes-Morales, 1996). Este proceso de regulación ha sido ampliamente estudiado en células en cultivo, en líneas celulares y en células gliales (Kimmelberg y Ramson 1986; Pasantes-Morales y Schousboe, 1988; Pasantes-Morales y cols., 1993; Sánchez-Olea y cols., 1991). En el cerebro, en respuesta a condiciones de hiponatremia crónica, se ha visto una liberación de taurina, ácido glutámico, ácido aspártico, alanina y glutamina, a diferencia de GABA y glicina los cuales se liberan en áreas más localizadas (Sánchez-Olea y cols., 1991).

II) Incremento Regulador del Volumen (IRV)

De manera contraria, cuando las células son expuestas a soluciones hiperosmóticas, hay una disminución del volumen; este encogimiento es proporcional al aumento de osmolaridad (Lang y cols., 1998; Hoffmann y Simonsen, 1989). En estas condiciones, las células presentan una respuesta bifásica. La primera fase es rápida y consiste de una rápida acumulación de osmolitos inorgánicos (Na^+ , K^+ y Cl^-) y la segunda fase es una respuesta adaptativa más lenta, donde se incorporan principalmente osmolitos orgánicos (Lang y cols., 1998). El mecanismo identificado en el transporte de estos iones es el cotransportador $Na^+/K^+/2Cl^-$ (Geck y Pfeiffer, 1985), los intercambiadores Na^+/H^+

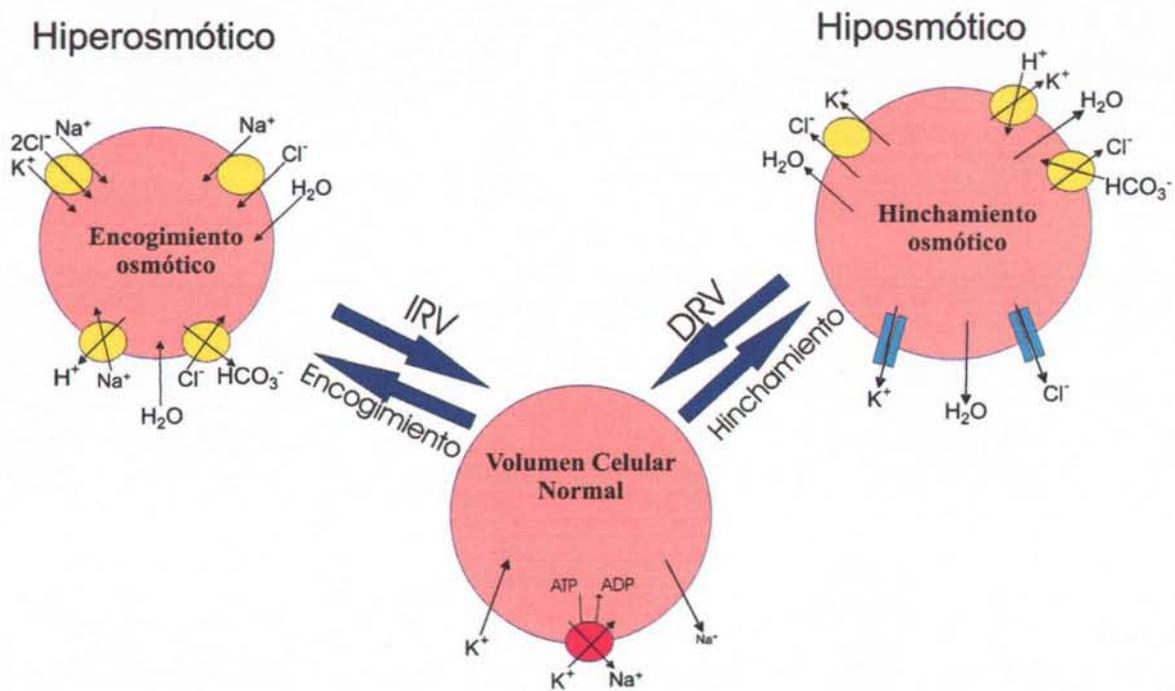
(Grinstein y cols., 1983), $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (Cala, 1980) y la ATPasa Na^+/K^+ (Siebens y Kregenow, 1985; Roy y Sauvé, 1987; Lang y cols., 1998). En general los canales iónicos no participan en esta respuesta. Las dos fases del IRV representan un mecanismo de adaptación clave en el sistema nervioso, ya que mantienen el contenido de agua y el tamaño celular cercanos a los niveles basales durante las primeras etapas de la hipernatremia (aumento en la osmolaridad del medio extracelular, respecto a la del medio intracelular).

4. Mecanismos de liberación de osmolitos

Los mecanismos adaptativos de regulación del volumen celular se establecen a través de cambios en la concentración intracelular de solutos osmóticamente activos u osmolitos, los cuales se movilizan en la dirección necesaria para recuperar el equilibrio osmótico de la célula (Lang y cols., 1998; Hoffmann y Simonsen, 1989; Pasantes-Morales y cols., 1993). Estos osmolitos se agrupan en dos categorías: 1) iones inorgánicos Na^+ , K^+ , Cl^- (Grinstein y cols., 1982; Roy y Sauvé, 1987); y 2) moléculas orgánicas, como aminoácidos libres (Smith y Pierce, 1987), metilaminas (Nakanishi y cols., 1988) y polialcoholes (Balaban y Burg, 1987; Wirthensihn y cols., 1987). En general, durante la regulación del volumen las células de los invertebrados y de los vertebrados de especies acuáticas utilizan preferentemente los osmolitos orgánicos, mientras que en las células de vertebrados terrestres los iones parecen tener un papel más importante (Sánchez-Olea y Pasantes-Morales, 1993). Una excepción a esto puede ser el sistema nervioso central, en el cual los iones **no** participan preferentemente en el proceso

de regulación de volumen celular sino en condiciones extremas de cambios en el volumen celular (Sánchez-Olea y cols., 1992). Este comportamiento puede explicarse al considerar la participación del K^+ y el Cl^- en el control de la excitabilidad y en la comunicación interneuronal, por lo que su homeostasis debe ser regulada de manera muy estricta (Sánchez-Olea y Pasantes-Morales 1993). Los principales iones involucrados en el mantenimiento de la osmolaridad interna y externa de la célula son el K^+ , el Na^+ , el Cl^- y el HCO_3^- , siendo el K^+ y el Cl^- los de mayor concentración intracelular y el Na^+ el más concentrado en el espacio extracelular (Okada y cols., 2001; Hoffmann y Simonsen, 1989; Chamberlin y Strange, 1989). Estos iones participan de manera importante en la regulación del volumen después de alguna alteración en la osmolaridad del medio externo, por lo que su transporte a través de la membrana es muy importante en los procesos de regulación del volumen.

Por otra parte, los osmolitos orgánicos relacionados con la regulación del volumen celular presentan una característica interesante, a diferencia de los iones inorgánicos, y es que poseen lo que se conoce como propiedades osmoprotectoras, es decir, que además de funcionar como osmolitos pueden acumularse en concentraciones muy altas en el compartimiento intracelular sin alterar significativamente la estructura y la función de las macromoléculas citosólicas, como enzimas y proteínas (Jacobsen y Smith, 1968; Pasantes-Morales y cols., 1991; García y cols., 1991). Los principales osmolitos orgánicos usados como moléculas osmoefectoras en las células de mamíferos son los aminoácidos libres (Smith y Pierce, 1987), metilaminas (Nakanishi y cols., 1988) y polialcoholes (Balaban y Burg, 1987) como el sorbitol y el mio-inositol (Lang y cols., 1998).



Esquema 1. Mecanismos de Regulación del Volumen Celular. Adaptado de Okada y cols., 2001

La concentración de cada uno de estos osmolitos varía según la especie y tipo celular; de esta manera varía también la importancia que tiene en la regulación del volumen (Pasantes-Morales y cols., 2000; Verbalis y Gullans, 1991; Sterns y cols., 1993). Las células pueden acumular osmolitos ya sea aumentando la síntesis, disminuyendo la degradación o estimulando el transporte de estos. Para disminuir la concentración intracelular de éstos puede degradarlos o activar su liberación (Sánchez-Olea y Pasantes-Morales, 1993).

I. Movilización del Cl^- .

Durante el DRV, el hinchamiento celular induce la liberación de Cl^- (Hoffmann y Simonsen, 1989). Se ha visto que la salida de estos dos iones se lleva a cabo a través de la apertura selectiva de canales activados por hinchamiento, que funcionan como vías difusionales, los cuales son específicos para cada ion pero independientes (Okada y cols., 2001; Grinstein y cols., 1982; Kimelberg y Kettenmann, 1990). Estudios electrofisiológicos han demostrado que el Cl^- sale de la célula por su propio canal (Strange y cols., 1996). Esta vía aniónica, es permeable a un gran número de aniones incluyendo los de gran tamaño como benzoato, tiocianato y sulfato (Pasantés-Morales y cols., 1994). Además, se ha visto que los bloqueadores de canales de Cl^- tienen un efecto importante en el DRV, lo que sugiere que estos canales no sólo son permeables al flujo de Cl^- , sino que también a otros osmolitos orgánicos incluyendo aminoácidos (Schousboe y cols., 1991).

Durante condiciones de hiposmolaridad se presenta un aumento de la permeabilidad aniónica en neuronas en respuesta a un incremento del volumen celular (Pasantés-Morales y cols., 1994). Sin embargo, aún no se ha identificado la naturaleza molecular del canal de Cl^- activado por volumen. Entre las moléculas que posiblemente actúan como canales de Cl^- durante el proceso de regulación del volumen se encuentran: 1) el canal CIC-2 (Grunder y cols., 1992); 2) la glicoproteína-P (Gill y cols., 1992; Valverde y cols., 1992); 3) ICln (Paulmichl y cols., 1992) ; 4) Fosfolema (Moorman y cols., 1995; Morales-Mulia y cols., 2000); 5) canales aniónicos dependientes de voltaje (Thinnes y cols., 2000 a, b).

II. Movilización del K^+ .

La vía por la que se mueve el K^+ asociado al DRV no está bien caracterizada. Lo que sí se sabe es que esta vía de movilización es específica para el K^+ y bastante impermeable a otros cationes. Sin embargo, no es claro si los canales de K^+ son activados por el hinchamiento *per se* o por factores asociados al cambio en el volumen celular como son: un incremento en la concentración intracelular de Ca^{2+} (Fernández-Fernández y cols., 2002), cambios en la organización del citoesqueleto (Morán y cols., 1996), fosforilación de varias proteínas y la expresión de algunos genes (Sinning y cols., 1997).

Respecto a los canales de K^+ involucrados en la regulación del volumen celular, se observan algunas diferencias notables con los canales de Cl^- . Así, a diferencia de lo que ocurre con los canales de Cl^- , cuyas características son esencialmente las mismas en los distintos tipos celulares, los canales de K^+ que se activan por hiposmolaridad, se han encontrado que presentan propiedades muy distintas entre los diferentes tipos de células (Pasantes-Morales y cols., 2000). Así, en la mayor parte de las células epiteliales, los canales de K^+ activados por volumen son dependientes de Ca^{2+} (Pasantes-Morales y Morales-Mulía, 2000). Mientras que en un gran número de tipos celulares no epiteliales los canales de K^+ podrían ser activados directamente por el cambio en volumen o en osmolaridad y ser independientes del Ca^{2+} (Pasantes-Morales y Morales-Mulía, 2000). En linfocitos, y en algunas neuronas, se ha encontrado que los canales de K^+ activados en condiciones hiposmóticas son canales dependientes de voltaje (K_v) (Deutsch y

Chen, 1993). El hinchamiento celular también afecta el potencial de membrana de acuerdo a la naturaleza y cinética de la corriente activada. Muchos tipos celulares se despolarizan en respuesta al hinchamiento, y esta despolarización activa subsecuentemente canales de K^+ de tipo Kv durante el DRV. Esto se ha observado en células de neuroblastoma (Falke y Mislner, 1989), en donde la despolarización activa en primer lugar canales catiónicos inespecíficos sensibles a la tensión membranal. En muchas células, hay una salida de Cl^- producida por hinchamiento (Sánchez-Olea y cols., 1996), que conduce a una despolarización, la cual posiblemente pueda activar a canales de K^+ tipo Kv, los cuales son los candidatos a ser las vías por las que sale el K^+ de estas células. Existe evidencia que respalda esta idea, Deutsch y Chen, (1993) demostraron que linfocitos T que carecen de la habilidad de regular el volumen celular, adquieren esta habilidad al ser transfectados con el gen de los canales Kv 1.3. Además, Barabán y cols. (1997) demostraron una modulación directa, por condiciones hiposmóticas, de los canales Kv en interneuronas de hipocampo, pero no en células piramidales de la región CA1 (Barabán y cols., 1997).

III. Movilización de aminoácidos que funcionan como osmolitos.

Aún no están totalmente identificados los mecanismos de movilización de los osmolitos orgánicos en el DRV. Se ha demostrado que la exposición de diferentes tipos celulares a medios hiposmóticos produce un incremento en los flujos de taurina y de otros aminoácidos a través de la membrana (Lambert, 2004; Ordaz y cols., 2004; Pasantes-Morales y cols., 2002). En estudios cuantitativos de la

pérdida de aminoácidos en el DRV se ha demostrado que la liberación de taurina en respuesta al cambio de volumen es independiente del Na^+ extracelular y de la temperatura, lo que descarta la participación del transportador de este aminoácido dependiente de Na^+ en el DRV (Schousboe, y Pasantes-Morales, 1992). Se ha encontrado, en cambio, que el movimiento de taurina en respuesta al aumento en el volumen tiene lugar a través de vías difusionales en los que el movimiento de taurina se encuentra dirigido únicamente por su gradiente de concentración (Sánchez-Olea y cols., 1991; Schousboe, y Pasantes-Morales, 1992).

Del total de aminoácidos que existen en la naturaleza sólo algunos (alanina, glicina, taurina, glutamato, β -alanina, y prolina) son de importancia cuantitativa para la regulación del volumen celular (Lambert., 2004; Pasantes-Morales y cols., 2002). El uso consistente de uno o más de estos aminoácidos por muchos grupos de organismos, sugiere que tienen características compatibles con la función de la regulación del volumen celular (Lambert., 2004). Sin embargo, la concentración y movilización de los aminoácidos que funcionan como osmolitos, y que además tienen importancia en diversas funciones metabólicas o como transmisores sinápticos son estrictamente regulados mediante distintos mecanismos como son: la captura, la liberación pasiva, y la biosíntesis y degradación de estos (Lang y cols., 1998).

En este sentido, una de las moléculas osmoefectoras especialmente importante es la taurina (Pasantes-Morales y cols., 1993; Roy y Malo, 1992; Morán y cols.,

1997). Este compuesto es un β -aminoácido sulfónico producto del metabolismo de la cisteína, que se encuentra presente en las células animales, desde los grupos más sencillos hasta los más complejos (Wright y cols., 1986). La taurina se acumula intracelularmente y su gradiente de concentración se mantiene por un transportador dependiente de Na^+ (Banderali y Roy, 1992). Además, la taurina cumple los requisitos de un osmolito ideal: es movilizada a través de la membrana en respuesta a cambios en la osmolaridad y en la composición iónica (Lambert., 2004; Pasantes-Morales y cols., 1993). Debido a su naturaleza electroneutra puede acumularse en el citosol sin alterar el potencial de membrana ni otros procesos celulares; metabólicamente es inerte, no forma parte de proteínas (Schuller-Levis y Park, 2003) Por el contrario, todos los otros aminoácidos usados como osmolitos tienen importancia en diversas funciones metabólicas y como transmisores sinápticos.

La concentración de taurina en algunos tejidos es muy alta, como en el caso de la retina, en donde alcanza valores de 50 a 70 Mm (Wright y cols., 1986; Huxtable, 1989; Schuller-Levis y Park, 2003; Lima, 1999). El trabajo realizado por Sánchez-Olea y cols., (1996) en neuronas cultivadas muestra una gran similitud en la sensibilidad farmacológica, entre los flujos de taurina y de Cl^- activados por hiposmolaridad, a bloqueadores de canales de Cl^- . Por otro lado, la taurina en células excitables de mamíferos y tejidos susceptibles a oxidación, parece tener una acción antioxidante (Pokhrel y Lau-Cam. 2000). Algunas funciones antioxidantes que se proponen para la taurina son: 1) scavenger de ácido hipocloroso (HOCl) (Aruoma y cols., 1988); 2) disminuir la formación de malonaldehído y especies reactivas de oxígeno (Aruoma y cols., 1988); 3)

minimizar la pérdida de la actividad de la ATPasa (Kocak-Toker y cols., 2005); y 4) revertir el decremento de la actividad de enzimas antioxidantes, como la glutatión peroxidasa (Sener y cols., 2005; Yan y Huxtable, 1998) causado por el estrés oxidativo (Pokhrel y Lau-Cam. 2000).

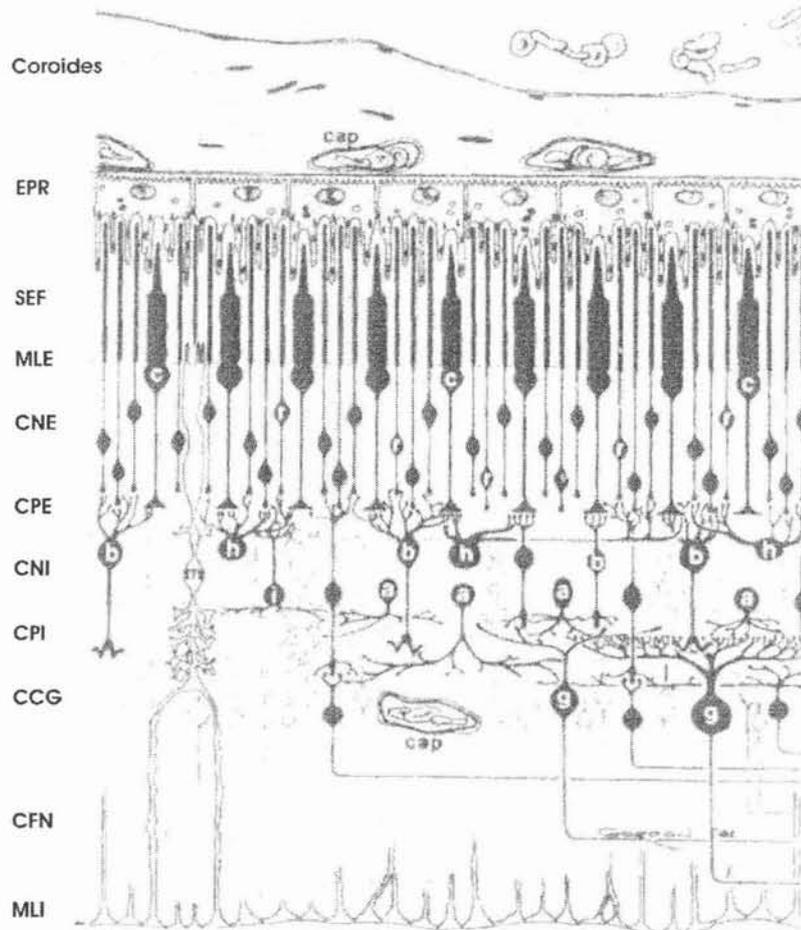
5. Fisiología de la retina

La retina es una estructura muy especializada cuya función consiste en convertir la luz en señales eléctricas que procesan las neuronas (Gordon y Bazan, 1997). Es un tejido neural delgado que en muchas especies recibe nutrientes de la coroides pasando por el epitelio pigmentado retinal. La retina es una preparación accesible para la experimentación *in vivo* e *in vitro* y puede ser manipulada química y farmacológicamente administrando sustancias por el vítreo o en medios de incubación (Krebs, 1935; Cohen y Noell, 1960; Ames y cols., 1992; Tsacopoulos y cols., 1998). Su capacidad para procesar el estímulo luminoso transformarlo y transmitirlo a través de distintas capas celulares está intacta en los sistemas *in vitro*, por lo que es un excelente modelo para el estudio de los mecanismos de transmisión que participan en la comunicación intercelular por neurotransmisores o neuromoduladores.

Comparada con otras estructuras del cerebro, la retina en vertebrados es relativamente simple. Tiene una estructura bien estratificada, con una organización separada para los somas celulares (capas nucleares) y las terminaciones sinápticas (capas plexiformes) (Gordon y Bazan, 1997) (Esquema 2). Los distintos

estratos celulares de este tejido se organizan en la siguiente forma: 1. La capa del epitelio pigmentado retinal, la cual está en íntimo contacto con el segmento externo de los fotorreceptores. Esta capa celular sirve como mediador en el intercambio de sustancias entre la retina externa y la circulación coroidal, participa en la fagocitosis de los discos desechados por los conos y bastones; 2. La capa de los segmentos externos, conos y bastones; 3. La membrana limitante externa, formada por los procesos apicales de las células de Müller, que están contiguos al segmento interno de los fotorreceptores; 4. La capa nuclear externa, compuesta por los núcleos de los fotorreceptores; 5. La capa plexiforme externa, formada por las terminaciones sinápticas de los fotorreceptores, las células bipolares y las células horizontales; 6. La capa nuclear interna, en donde se localizan los cuerpos de las células bipolares, horizontales y amacrinas. También se localizan en esta capa los somas de las células interplexiformes que son aquellas que conectan con las capas plexiforme externa e interna; 7. La capa plexiforme interna es otra región sináptica en donde establecen contactos sinápticos las células bipolares, amacrinas y las ganglionares; 8. La capa de células ganglionares, cuyos axones forman el nervio óptico; 9. La membrana limitante interna, constituida por los procesos basales de las células de Müller, que forman la interfase retino-vitreal (Gordon y Bazan, 1997).

Los fotorreceptores son de dos tipos, los conos y los bastones. Los bastones son sensibles a bajos niveles de luz, mientras que los conos se estimulan a intensidades altas de luz y además están especializados en la visión a color. Funcionalmente en la retina se encuentran dos vías sinápticas: una glutamatérgica (fotorreceptores → células bipolares → células ganglionares) y una gabaérgica.



Esquema 2. Esquema de la retina en el que se muestran las diferentes capas celulares de la retina. EPR Epitelio Pigmentado Retinal; SEF Segmento Externo de los Fotorreceptores, MLE Membrana Limitante Externa; CNE Capa Nuclear Externa; CPE Capa Plexiforme Externa; CNI Capa Nuclear Interna; CPI Capa Plexiforme Interna; CCG Capa de las Células Ganglionares; CFN Capa de la Fibra del Nervio; MLI Membrana Limitante Interna. b células bipolares; i células interplexiformes; h células horizontales; a células amácricas; g células ganglionares; c conos; cap capilares; r bastones; c conos. Tomado de Gordon y Bazan (1997) en Harding (1997).

Esta última está modulada por las interneuronas, células interplexiformes, horizontales y amacrinas (Kalloniatis y Tomisich, 1999).

Como se mencionó anteriormente, la retina de los vertebrados es un tejido neural delgado que fácilmente se puede extraer, por lo que se puede contar con un

circuito neuronal íntegro. Además, este tejido es accesible la experimentación *in vivo* e *in vitro*. Esto permite que la retina sea un buen modelo para el estudio de los mecanismos de regulación que participan en la comunicación interneural por neurotransmisores o neuromoduladores (Krebs, 1935; Cohen y Noell, 1960; Ames y cols., 1992; Tsacopoulos y cols., 1998).

La retina contiene tanto sinapsis eléctricas (uniones comunicantes) como sinapsis químicas, con mayor predominancia de estas últimas (Mariani, 1984). Las sinapsis eléctricas se forman generalmente entre neuronas del mismo tipo, como es el caso de los fotorreceptores y las células horizontales (Mariani, 1984). En los fotorreceptores existen dos tipos de sinapsis químicas con una morfología distinta, las sinapsis que presentan una estructura característica llamada cinta sináptica y las sinapsis basales (Mariani, 1984). Las sinapsis con cinta sináptica se establecen entre receptores, específicamente conos (presinapsis); y las dendritas de células horizontales (postsinapsis) (Mariani, 1984). Las sinapsis basales se establecen específicamente entre conos (presinapsis) y células bipolares (postsinapsis). Las terminales presinápticas de las células bipolares contienen, al igual que los fotorreceptores, la cinta sináptica, las cuales hacen sinapsis con las células ganglionares (Mariani, 1984).

La mayor parte de los estratos celulares de la retina contienen, además de los neurotransmisores clásicos (gutamato, GABA y glicina) (Kalloniatis y Tomisich, 1999), una concentración muy alta de taurina y su función precisa se desconoce (Militante y Lombardini, 2002). El 80% de la taurina se encuentra en los fotorreceptores y se ha propuesto que podría participar en el mantenimiento de la

estructura y la viabilidad de los estas células, con un mecanismo poco conocido (Schmidt y cols., 1976; Pasantes-Morales y cols., 1986; Militante y Lombardini, 2002). En experimentos en gatos a los que se alimentó con dietas deficientes de taurina se observó una desorganización de los segmentos externos de los fotorreceptores, lo que resultó en una subsecuente muerte celular y pérdida de la visión (Pasantes-Morales y cols., 1986). Como ya se mencionó, una propuesta, que cuenta con evidencia experimental sólida, es que la taurina participa como un osmolito en el control del volumen celular.

6. Radicales libres y retina

Debido a su alto consumo de oxígeno, la retina es altamente susceptible al daño producido por especies reactivas de oxígeno (ERO). Se sabe que aproximadamente el 2% del oxígeno utilizado en la retina es convertido a radicales libres de oxígeno (Boveris y Chance, 1973). Este alto consumo de oxígeno se realiza principalmente en los fotorreceptores debido, probablemente, a un aumento en el metabolismo de estas células durante el proceso de fototransducción (Zuckerman y Welter, 1982). Por otro lado, la presencia de un alto porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados en la membrana del segmento externo de los fotorreceptores los hace particularmente susceptibles al daño oxidativo (Fliester y Anderson 1983). Esta proximidad espacial entre ácidos grasos poliinsaturados y mitocondrias hace que los discos intermembranales del segmento externo de los fotorreceptores estén continuamente expuestos a estrés oxidativo en condiciones fisiológicas (Fliester y Anderson 1983). La susceptibilidad

de los ácidos grasos poliinsaturados al daño oxidativo, puede comprometer la viabilidad membranal, debido a que la oxidación de estos ácidos grasos genera una serie de reacciones que tienden a autopropagarse (Kehrer, 1993).

Las especies reactivas de O_2 (ERO) o radicales libres, son derivados del oxígeno que tienen desapareado un electrón de su último orbital. Las ERO están involucradas en una variedad de procesos fisiológicos y son generadas en los tejidos a través de reacciones metabólicas en donde participan oxigenasas y oxidasas (Gutteridge y Halliwell, 1989; Bonne y cols., 1998). Entre las ERO encontramos el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^{\cdot}), este último es el más reactivo y puede ser generado a partir del H_2O_2 mediante reacciones de Fenton o Haber-Weiss (Bonne y cols., 1998).

7. Edema celular en la retina

Como se mencionó anteriormente, el edema isosmótico en el cerebro está asociado a patologías como la isquemia, la encefalopatía hepática, y la epilepsia. En la retina también existen algunas patologías a las que se asocia un incremento de volumen celular; entre ellas pueden citarse la degeneración retiniana, el glaucoma, la retinopatía diabética y la retinopatía hipertensiva (Ito y cols., 1995; Cringle y cols., 1992; Zhang y cols., 1991). Los cuadros de isquemia y reperfusión son causa de edema y degeneración macular (Finkelstein, 1992; Gehlbach y Purple, 1994a,b; Iversen, 1991). Los mecanismos que generan edema celular en

estas patologías son, en general, los mismos que se asocian a un cuadro isquémico en el cerebro.

I. Edema Anisomótico

Estudios realizados por Morán y cols., (1991), indican que al exponer la retina de rata a una reducción en la osmolaridad se produce un aumento en el volumen celular acompañado de una rápida liberación de taurina. Aunque aún no se tienen identificadas cuáles son las neuronas que liberan taurina subsecuentemente a una estimulación con hiposmolaridad. En las retinas de rata incubadas con luz hay una gran captura de taurina por los fotorreceptores, las células amacrinas, las células bipolares y las células de Müller, por lo que la liberación de taurina asociada al hinchamiento puede ocurrir en cualquiera de estas células. Además, la liberación de taurina, estimulada por hiposmolaridad, en la retina de rata es sensible a bloqueadores de canales de Cl^- (Morán y cols., 1991), como sucede en la liberación de taurina estimulada por hiposmolaridad en astrocitos y células granulares en cultivo (Pasantes-Morales y cols., 1990); esto demuestra la similitud en el mecanismo de liberación de taurina en estas células y en la retina de rata.

II. Edema Isosmótico:

La liberación de osmolitos no sólo se observa bajo condiciones de estrés osmótico, sino que, también se puede observar en condiciones en las cuales no se ve afectada la osmolaridad del medio externo. Esta liberación de osmolitos en

condiciones isosmóticas es estimulada por dos situaciones: 1) aumento de la concentración de K^+ extracelular; y 2) bajo condiciones de estrés oxidativo.

a) Condiciones de K^+ extracelular elevado

El hinchamiento producido en las células retinianas en respuesta a los altos niveles de K^+ fue descrito por primera vez por Olney y cols. (1986) en retinas de embriones de pollo. El cambio en el volumen celular producido por una concentración elevada de K^+ extracelular se debe a la acumulación intracelular de este ión en las células de la retina, seguido por la entrada de Cl^- y agua osmóticamente obligada (Schousboe y cols. (1990). Schousboe y cols. (1990) describieron que la liberación de taurina, inducida por altas concentraciones K^+ en el medio externo, es muy parecida a la liberación estimulada por una reducción en la osmolaridad en neuronas granulares de cerebelo. Dicha liberación es dependiente de Cl^- y es inhibida por el DIDS, un bloqueador de los canales de Cl^- (Schousboe y cols., 1990). Esta liberación de taurina también fue reportada por Morán y cols., (1991) en la retina de rata, donde también mostraron un efecto inhibitorio del DIDS.

Existe una diferencia en la liberación de osmolitos producida por hiposmolaridad y la producida por alto K^+ , siendo de mayor proporción en condiciones hiposmóticas, esto, posiblemente a que el hinchamiento celular es más rápido en el primer caso. (Ochoa-de la paz y cols., 2002; 2005).

b) Estrés oxidativo.

Como se mencionó anteriormente, la retina y en particular los fotorreceptores son muy susceptibles a la oxidación de los lípidos en la membrana debido, por una parte, al requerimiento muy alto de oxígeno en el tejido, y, por otra, a la presencia de una alta proporción de ácidos grasos poliinsaturados en las membranas de los fotorreceptores (Fliester y Anderson, 1983).

Existen algunas retinopatías en las que se observa un cuadro de estrés oxidativo; algunas de estas patologías son: la degeneración retiniana, la degeneración macular debido al rompimiento de capilares (Ito y cols., 1995) y los cuadros de isquemia-reperfusión, que son causa de edema y degeneración macular (Finkelstein, 1992; Gehlbach y Purple, 1994a,b; Iversen, 1991). En la retinopatía diabética, la presencia de microaneurismas en la vasculatura ocular puede llevar a cuadros de anoxia en la retina y la consiguiente generación de radicales libres (Cringle y cols., 1992; Zhang y cols., 1991).

Los cuadros de lipoperoxidación, producidos por las ERO, provocan que las membranas se vuelvan permeables a distintos componentes intracelulares y extracelulares. Como consecuencia, iones extracelulares, en particular Na^+ , Cl^- , y Ca^{2+} son capaces de pernear al interior celular. Esta entrada de Ca^{2+} y su acumulación subsecuente en el citosol puede inducir muerte celular (Jefferys y Hass, 1982, Gilgun-Sherki y cols., 2002). La entrada de Na^+ y Cl^- junto con agua osmóticamente obligada, lleva a un incremento de volumen celular, lo cual puede

exacerbar el cuadro peroxidativo (McManus y Churchwell, 1994; Jefferys y Hass, 1982).

Durante la isquemia, la baja en la carga energética permite la acumulación de Na^+ seguida de Cl^- y agua, causando edema celular (Jefferys y Hass, 1982, Taylor y Dudek, 1982). Además, durante la isquemia se generan cuadros de lipoperoxidación de las membranas (Taylor y Dudek, 1982) causando un desbalance iónico con una nueva fase de edema y acumulación intracelular de Ca^{2+} lo que produce muerte celular (Jefferys y Hass, 1982). Durante esta nueva fase de edema, se pueden liberar aminoácidos excitadores, en especial el ácido glutámico, y esto puede contribuir a la fase de muerte neuronal producida por excitotoxicidad (Jefferys y Hass, 1982, Macdonald y Stoodley, 1998). Se sabe que el ácido glutámico también se libera de las neuronas y de los astrocitos en cultivo en respuesta un incremento de volumen celular producido por condiciones hiposmóticas (Butterworth, 2003) y es posible pensar que se de una liberación de ácido glutámico también en el edema que se presenta en condiciones isosmóticas, como en el caso de la lipoperoxidación y la isquemia.

En la retina, los cuadros de isquemia-reperfusión generan cambios bioquímicos y morfológicos, los cuales pueden ser parcial o totalmente prevenidos con antioxidantes (Vériac y cols., 1993). Estos cambios han sido asociados a algunas patologías de la retina como las mencionadas anteriormente, y que se detallan a continuación, haciendo énfasis en los procesos de estrés oxidativo. Además,

algunos estudios señalan la formación de radicales libres de oxígeno durante los cuadros de isquemia-reperfusion (Vériac y cols., 1993; Bonne y cols., 1998).

La degeneración macular esta caracterizada por la atrofia del disco macular. Las células más afectadas son los fotorreceptores y el epitelio pigmentado retinal. Evidencia obtenida a partir de estudios en animales indica que el papel de los radicales libres producidos por una exposición a la luz es un factor potente para producir esta enfermedad (Noell y cols. 1966; Pasantes-Morales y cols., 1986). Noell y cols. (1966) fueron los primeros en sugerir un mecanismo de daño celular producido por la luz. Esto es debido a que, como ya se mencionó, los segmentos externos de los fotorreceptores contienen altas concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados en los discos membranales (Fliester y Anderson, 1983). Además, esta región está expuesta a tensión de oxígeno, cercana a los valores encontrados en la sangre arterial. Estos ácidos grasos poliinsaturados son altamente susceptibles a un ataque oxidativo en la presencia de oxígeno o de ERO (Fliester y Anderson, 1983). Esto se debe a que la reacción de un sólo radical libre de oxígeno con un ácido graso poliinsaturado es capaz de producir una reacción en cadena en la cual pueden involucrarse varios ácidos grasos poliinsaturados, resultando en un proceso denominado autooxidación (Winkler y cols., 1999).

En el caso de la retinopatía diabética, se presenta una glicosilación de proteínas, las cuales generan radicales libres, y la depleción de la glutatión peroxidasa provocando un daño oxidativo en el tejido. Los radicales libres de oxígeno también han sido asociados a esta patología. Como ya se mencionó, debido a la gran

cantidad de ácidos grasos poliinsaturados que contiene la retina y a la elevada disponibilidad de oxígeno, un estímulo de hipoxia/isquemia/reperfusión es suficiente para iniciar la cadena oxidativa de los radicales libres (Kehrer, 1993). La oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados trae como consecuencia la producción de H_2O_2 , que junto con la alta disponibilidad de oxígeno y la presencia de Fe^{2+} , favorecen el daño celular por radicales libres. Diversos estudios (Augustin y cols., 1993; Iborra y cols., 1994; Montoliu y cols., 1996; Verdejo y cols., 1997; Todea, 1994; Ophir y cols., 1993) demuestran la susceptibilidad de la retina y el nervio óptico al ataque oxidativo. Además, muestran que hay mayores niveles de radicales libres en pacientes con retinopatía diabética proliferativa.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Tomando en cuenta los antecedentes acerca de la presencia del edema celular y el estrés oxidativo en condiciones isquémicas (edema citotóxico), así como la liberación de aminoácidos excitadores bajo estas condiciones, en el presente trabajo se estudió la relación que puede existir entre el edema celular y el estrés oxidativo en función de la liberación de aminoácidos.

OBJETIVOS

Objetivo principal:

“Investigar si existe una relación entre el edema celular y el estrés oxidativo, en función de la liberación de aminoácidos en la retina”.

Con tal finalidad, se establecieron los siguientes objetivos específicos:

1. Examinar si hay una liberación de ácido glutámico y taurina bajo condiciones de estrés oxidativo en la retina.
2. Determinar si la liberación de ácido glutámico y taurina se debe a un incremento de volumen celular o a las condiciones de estrés oxidativo.
3. Caracterizar la vía de liberación de ácido glutámico y taurina en condiciones de estrés oxidativo.

METODOLOGÍA

Aislamiento de la retina y medios de incubación

Se utilizaron pollos de 1 a 5 días de nacidos. Éstos se adaptaron a la obscuridad por un periodo de una hora, posteriormente, se sacrificaron por decapitación bajo luz roja y se retiraron los globos oculares (enucleación) para después cortar ecuatorialmente (hemisección) y extraer cuidadosamente la retina, evitando que

saliera unida al epitelio pigmentado. Inmediatamente, las retinas fueron sumergidas en un medio isosmótico Krebs-Hepes normal (MKN) frío, el cual contenía (en mM): NaCl, 135; KH₂PO₄, 1.17; KCl, 4.7; CaCl, 1; Glucosa, 5; MgSO₄, 1.17; HEPES, 10; el pH se ajustó a 7.4 y la osmolaridad a 300 mosm. Los medios hiperosmóticos fueron ajustados a 400 mosm con sorbitol.

Liberación de aminoácidos

Las retinas completas se incubaron en MKN con ³H-aurina o ³H-ácido glutámico (0.5 y 1 µCi, respectivamente) durante 15 minutos, para los experimentos con ácido glutámico, y 25 minutos para los experimentos con taurina, en agitación constante, a 37 °C. Posteriormente, las retinas se lavaron durante 25 minutos con MKN a 37 °C en agitación. Finalmente, las retinas se colocaron en multipozos que contenían 1 ml de MKN cada uno.

Para determinar la liberación de aminoácidos, se hicieron perfusiones estáticas y perfusiones continuas. Las perfusiones continuas se realizaron de la siguiente manera: Durante 35 minutos, las retinas se cambiaron de un pozo a otro con las condiciones experimentales. Este cambio se realizó cada 5 minutos. Los primeros 5 minutos de liberación fueron bajo condiciones control (MKN) y los 30 minutos restantes fueron bajo condiciones experimentales (MKN + H₂O₂). Para las perfusiones estáticas, las retinas se colocaron y mantuvieron en condiciones experimentales durante un periodo de 20 minutos. Terminado el tiempo de perfusión, las retinas se colocaron en viales de centelleo para medir la

radioactividad restante en el tejido. Los datos se reportan como porcentaje de radioactividad en cada fracción colectada con respecto al total de radioactivo capturado (suma de radioactivo de todas las fracciones y el radioactivo restante en el tejido después del experimento).

Se utilizaron los siguientes bloqueadores de canales de Cl⁻: el DIDS (4,4-diisothiocinato-stilbeno-2-ácido disulfónico) 500 μM, el NPPB (5-nitro-2-[3-phenylpropylamino] ácido benzoico) 100 μM y el ácido niflúmico 600 μM. Las concentraciones utilizadas en este trabajo, ya han sido las reportadas previamente en otros estudios (González y cols., 1995; Strange y cols., 1996; Pasantes-Morales, 1996; Kirk, 1997; Morán y cols., 1997; Franco y cols., 2001). En estos experimentos, las retinas fueron preincubadas durante 15 minutos en presencia del fármaco. Además, estos fármacos estuvieron presentes todo el tiempo de la perfusión.

Liberación de lactato deshidrogenasa (LDH)

La integridad membranal de las retinas se determinó mediante la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) al medio extracelular, la cual es un marcador de daño membranal (Saransaari y Oja, 1998). En este ensayo colorimétrico, el dinucleótido β-adenina nicotamida (NAD) es reducido a NADH a través de la conversión de lactato a piruvato producida por la LDH. Esta reacción

puede ser cuantificada mediante espectrofotometría. La liberación de LDH es proporcional al daño membranal.

Los tejidos se expusieron a condiciones control (MKN) y a condiciones de estrés oxidativo (H_2O_2 0.1 y 1 mM) durante distintos tiempos (5 y 25 minutos). Después del tiempo de exposición, el tejido se homogenizó y se tomaron alicuotas de 0.1 ml de cada muestra, las cuales se adicionaron a la mezcla de reacción, la cual contenía: 1) Buffer de fosfatos 0.05 M, pH de 7.5; 2.8 ml para cada muestra; 2) NADH (10 mg en 1.5 ml de buffer), 0.05 ml para cada muestra; y 3) Piruvato de sodio en buffer de fosfatos (2.18 mg / ml), 0.05 ml por muestra. El volumen final de cada muestra fue de 3 ml. El piruvato de sodio fue el último en ser adicionado a la mezcla, ya que es el que da inicio a la reacción enzimática de la LDH. Después de aplicar el piruvato de sodio, se determinó la actividad enzimática en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 340 nm. La integridad membranal se midió como el porcentaje de LDH liberada de la LDH total determinada (de nuevo, el total fue calculado como la suma de la LDH liberada y la restante en el tejido después del experimento).

Conteo de ganancia de agua en el tejido

Los cambios de volumen celular se determinaron cuantificando la ganancia de agua y de 3H 3-O-Methy-D-Gucosa (3-OMG) en la retina (Ochoa-de la Paz, 2002; 2005). Para calcular esto, se cuantificó el peso de las retinas antes del experimento. Para esto se quitó el exceso de MKN del tejido y se peso en una balanza analítica. Posteriormente, las retinas se expusieron a condiciones control

(MKN), o a condiciones experimentales (H_2O_2), durante 20 minutos. Después de este tiempo se volvió a determinar el peso de los tejidos. El 3-OMG se agregó al medio durante los últimos 3 minutos de la incubación. A los 2.5 minutos se agregó floretina 1mM para detener la captura. Las retinas se lavaron, pesaron y el contenido de radioactivo se determinó.

Análisis Estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante una prueba de comparación múltiple (anova unifactorial) mediante el método de Student-Newman-Keuls para los experimentos de perfusión estática. Para el caso de los experimentos de perfusión continua los datos se analizaron mediante una prueba de Anova bifactorial, también mediante el método Student-Newman-Keuls. En ambos casos, los datos se valoraron como significativamente diferentes cuando el valor p fue menor de 0.05.

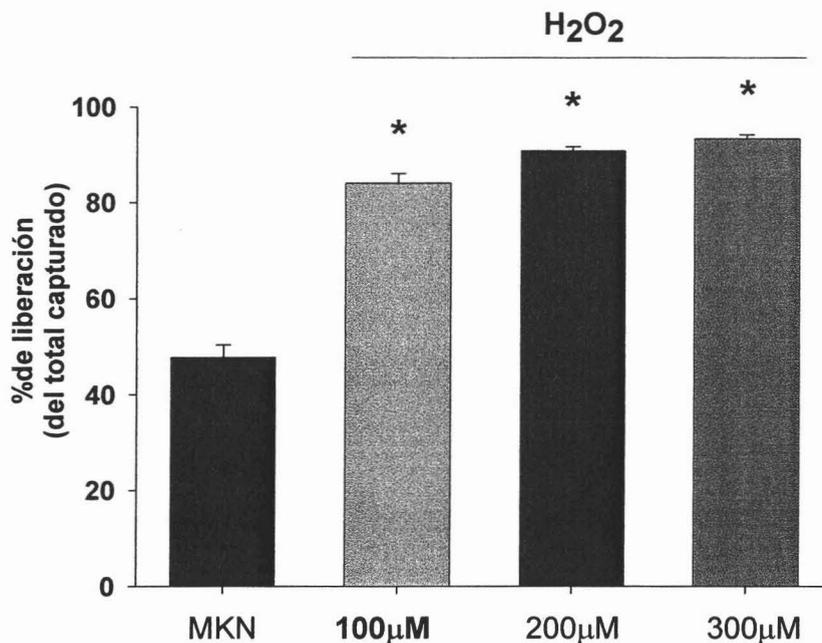
RESULTADOS

Liberación de aminoácidos en condiciones de estrés oxidativo

En la primera parte de este trabajo, se caracterizó la liberación de aminoácidos en respuesta al estrés oxidativo. Dicha condición fue inducida por H₂O₂ a diferentes concentraciones (100, 200 y 300 μM), adicionado al medio extracelular. Los aminoácidos examinados fueron el ácido glutámico y la taurina, utilizando trazadores radioactivos para el seguimiento de la liberación.

El efecto del H₂O₂, durante 30 minutos, sobre la liberación del ácido glutámico y la taurina se presenta en las figuras 1 y 2, respectivamente. El H₂O₂, indujo la liberación de ambos aminoácidos, y este efecto fue dependiente de la concentración. Para el caso del ácido glutámico, la liberación en condiciones control fue de $47.74 \pm 2.61\%$ del total del aminoácido capturado (aminoácido liberado más aminoácido restante en el tejido después de terminar el experimento); $84.11 \pm 2.02\%$, cuando se utilizó H₂O₂ 100 μM; $90.1 \pm 0.95\%$ en presencia de 200 μM de H₂O₂ y $93.4 \pm 0.82\%$ con H₂O₂ 300 μM. Estos valores se obtuvieron después de 30 minutos de exposición de las retinas al H₂O₂ (Figura 1A). Como se puede ver, el H₂O₂ a una concentración de 100 μM fue suficiente para inducir la liberación de ácido glutámico. Con la finalidad de caracterizar la cinética

A) Liberación de ^3H ácido glutámico en condiciones de estrés oxidativo. Perfusión estática.



B) Liberación de ^3H ácido glutámico en condiciones de estrés oxidativo. Perfusión continua.

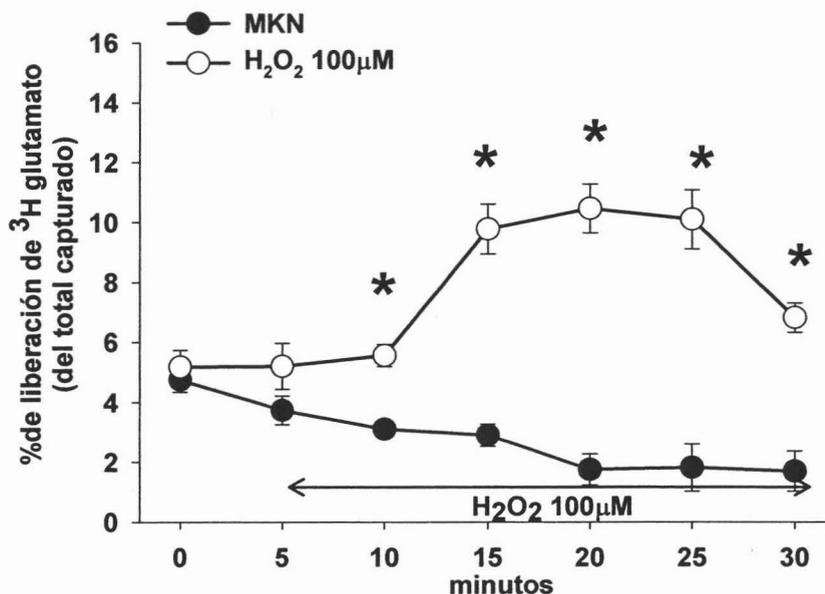


Figura 1. Liberación de ^3H ácido glutámico producida por H_2O_2 . (A) Las retinas se expusieron a diferentes concentraciones de H_2O_2 (100, 200 y $300\mu\text{M}$) durante 30 minutos. (B) Liberación producida en una perfusión continua bajo condiciones control (-●-) y liberación estimulada por H_2O_2 $100\mu\text{M}$ (-○-) durante 30 minutos. Los tejidos se incubaron con $0.5\mu\text{Ci}$ de ^3H -ácido glutámico. Los primeros 5 minutos son de liberación basal. Los datos representan el radioactivo liberado durante 35 minutos expresado como el % del total incorporado al tejido. Las mediciones son el promedio de 6 a 8 experimentos separados \pm SE. A) * $p < 0.05$ vs MKN; # $p < 0.05$ H_2O_2 $200\mu\text{M}$ vs $100\mu\text{M}$. valor F= 144.3. B) * $p < 0.05$ H_2O_2 vs MKN; valor F= 16.29

de liberación de este aminoácido se realizó una perfusión continua en presencia de H_2O_2 100 μM (Figura 1B). Las retinas comenzaron a liberar ^3H -ácido glutámico a partir de los 10 minutos de exposición. La mayor liberación de este aminoácido se observó a los 20 minutos de exponer las retinas al H_2O_2 (11.15 ± 0.64 %).

La diferencia entre la perfusión estática y la continua, en cuanto a la cantidad de aminoácido liberada, se debe posiblemente a los diferentes tiempos de colecta en cada perfusión.

El H_2O_2 también estimuló la liberación de la taurina y su efecto también fue dependiente de la concentración. Los datos obtenidos de la liberación para este aminoácido fueron: 24.6 ± 0.25 %, en condiciones control; 49.78 ± 9.07 % en medios con H_2O_2 100 μM ; 62.06 ± 5.81 % en presencia de H_2O_2 200 μM ; y 70.34 ± 5.06 %, con H_2O_2 300 μM (Figura 2A).

La cinética de liberación del ácido glutámico y de taurina en condiciones control presenta una tendencia a disminuir conforme pasa el tiempo, a diferencia de la liberación inducida por H_2O_2 . Esto se debe a un exceso de marca radioactiva sobre el tejido, la cual es removida mediante el cambio de MKN, alcanzando un nivel estable a los 25 minutos del experimento. Después de que este exceso de radioactivo es eliminado, la liberación de aminoácidos se mantiene estable durante los últimos 10 minutos de los experimentos.

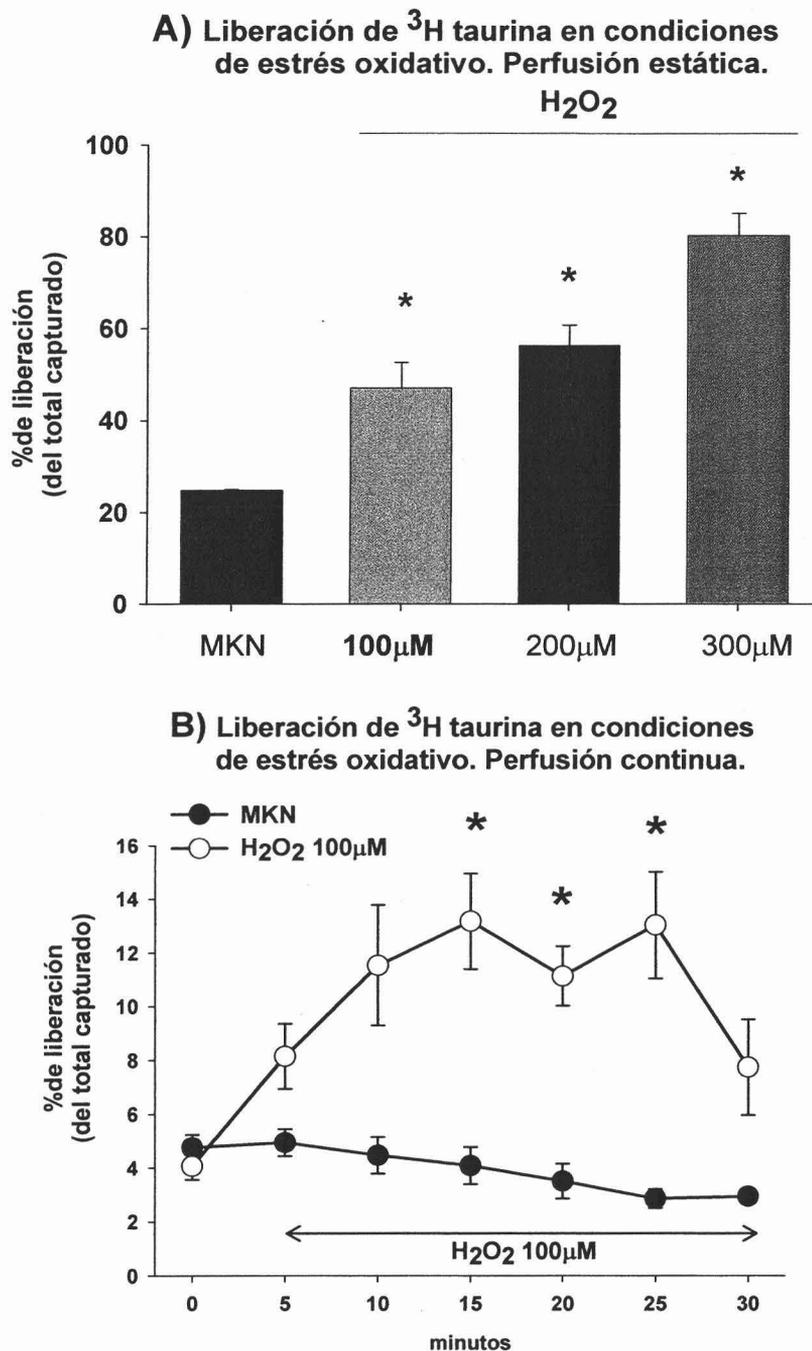


Figura 2. Liberación de ^3H -taurina producida por H_2O_2 . (A) Las retinas se expusieron a diferentes concentraciones de H_2O_2 (100, 200 y 300 μM) durante 30 minutos. (B) Liberación producida en perfusión continua, control (-●-) y liberación estimulada por H_2O_2 100 μM durante 30 (-○-) minutos. Los tejidos se incubaron con 1 μCi de ^3H taurina. Los primeros 5 minutos son de liberación basal. Los datos representan el radioactivo liberado durante 35 minutos expresado como el % del total incorporado al tejido. Las mediciones son el promedio de 6 experimentos separados \pm SE. A) $p < 0.05$ H_2O_2 vs MKN valor $F=21.250$; # $p < 0.05$ H_2O_2 300 μM vs H_2O_2 100 μM y 200 μM . B) Valor $F=16.589$; $p < 0.05$ H_2O_2 100 μM vs MKN a ese tiempo de la perfusión.

La cinética de liberación de taurina inducida por H_2O_2 100 μM , durante 30 minutos de exposición, se muestra en la figura 2B. La liberación de la taurina fue muy similar a la liberación observada para el ácido glutámico. La mayor liberación de taurina se observó de los 15 a los 25 después de haber comenzado la exposición al H_2O_2 , alcanzando una liberación máxima de 13.2 %, a los 25 minutos.

Determinación de la Integridad Membranal

Considerando que los radicales libres atacan los fosfolípidos de las membranas celulares, produciendo daños en la integridad de las mismas; y tomando en cuenta que esto podría producir una liberación de componentes intracelulares, como aminoácidos, a través de las membranas celulares dañadas, la siguiente etapa en este trabajo fue determinar si la liberación de ácido glutámico y de taurina, inducida por el H_2O_2 , se debía a un daño en la integridad membranar de las células de la retina, causado por H_2O_2 .

Para saber si el H_2O_2 estaba afectando la integridad membranar de las células de la retina, se realizó la técnica de liberación de la LDH, (ver métodos), la cual ha sido reportada como una técnica para determinar daño membranar (Pellegrini-Giampietro y cols., 1990; Cherici y cols., 1991; Saransaari y Oja, 1998). En la figura 3 se muestra la liberación de la LDH de las retinas en presencia o ausencia de H_2O_2 100 μM y 1 mM.

Liberación de LDH del tejido; en condiciones de lipoperoxidación

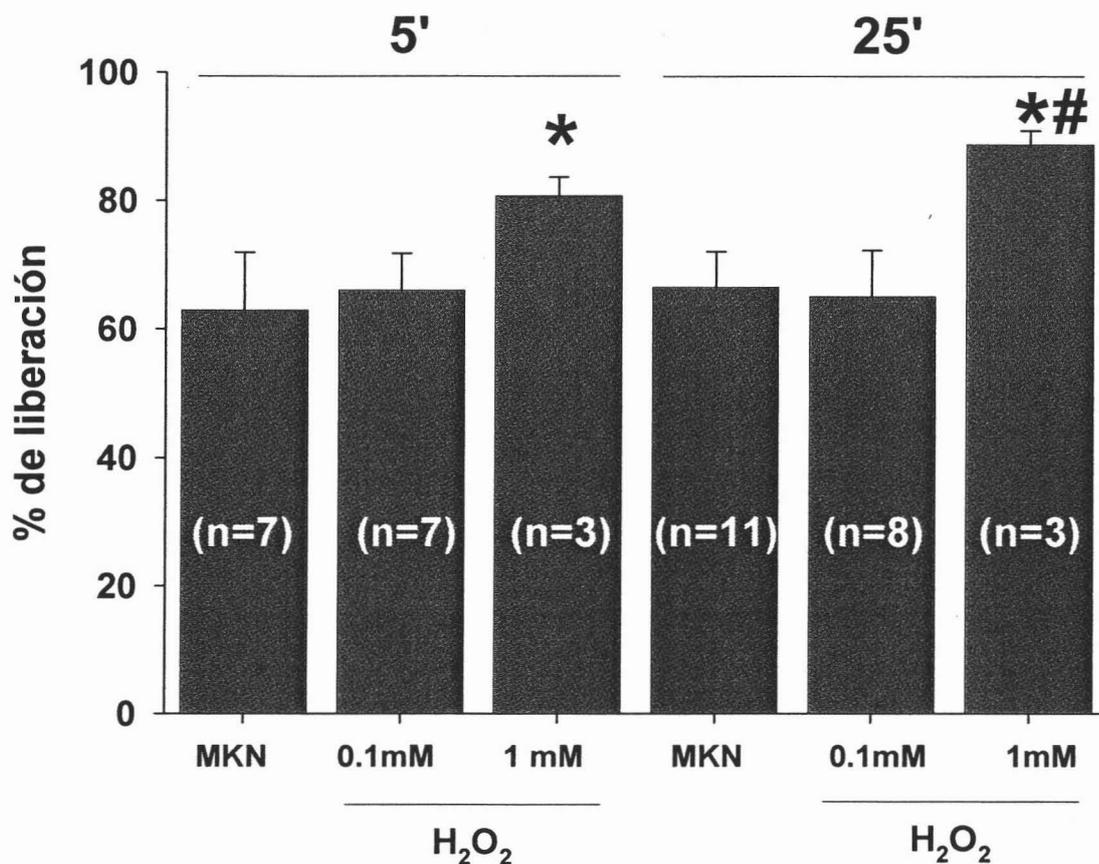


Figura 3. Liberación de la enzima LDH estimulada por H_2O_2 100 μ M y 1 mM. La mayor liberación de LDH se observó cuando las retinas fueron expuestas a H_2O_2 1mM durante 5 y 25 minutos. Los resultados son el promedio de (n) experimentos por separado \pm SE. $F=7.099$; $*=p<0.05$ vs 0.1 mM; $\# = p<0.05$ vs MKN.

La liberación cuantificada de LDH en condiciones control fue de: $48.86 \pm 7.86\%$ y $63.54 \pm 2.96\%$ del total de LDH intracelular; a 5 y 25 minutos respectivamente de permanecer en MKN, mientras que la liberación de LDH en presencia de H_2O_2 (100 μ M) fue de $61.43 \pm 3.99\%$ y $57.62 \pm 6.56\%$, a 5 y 25 minutos de exposición respectivamente. Es importante notar que la liberación de LDH en condiciones control (MKN), y la liberación en presencia de 100 μ M de H_2O_2 , no son significativamente diferentes. Sin embargo, la liberación de LDH aumentó

significativamente ($p < 0.05$) cuando las retinas fueron expuestas a H_2O_2 1mM. Los datos obtenidos para esta condición experimental fueron de $80.67 \pm 2.96 \%$ y $88.67 \pm 2.18 \%$ a 5 y 25 minutos de exposición a H_2O_2 , respectivamente. Estos datos nos sugieren que la liberación de aminoácidos, observada en presencia de H_2O_2 100 μM , no es producto de un daño en las membranas de las células de la retina causado por radicales libres.

¿La liberación inducida por el H_2O_2 está asociada a un mecanismo de hinchamiento celular?

Como ya se mencionó, el ataque de los radicales libres a la membrana celular puede alterar la permeabilidad de la misma, y producir un desbalance iónico. Este desbalance iónico cual puede traer como consecuencia un incremento de volumen celular. Se sabe, además, que la retina en condiciones de edema isosmótico, libera osmolitos, entre los que se encuentran aminoácidos como el ácido glutámico y la taurina. Esta liberación de aminoácidos se da en respuesta a un incremento de volumen celular, con la finalidad de restablecer el volumen inicial de las células (Pasantés-Morales y cols., 1999). Tomando en cuenta estos antecedentes, el siguiente objetivo de este trabajo fue determinar si la liberación de ácido glutámico y taurina estaba asociada a un incremento del volumen celular producido por condiciones de estrés oxidativo.

Para determinar si la presencia de H_2O_2 exógeno producía un hinchamiento celular, se midió la ganancia de agua en el tejido, determinado por el peso del tejido y la captura de 3-OMG durante condiciones control y condiciones experimentales (ver métodos) (Ochoa-de la Paz y cols., 2002, 2005). Los resultados obtenidos en esta fase del trabajo, mostraron que no hubo ganancia de agua en el tejido en condiciones de estrés oxidativo, comparada con la condición control (Figura 4.)

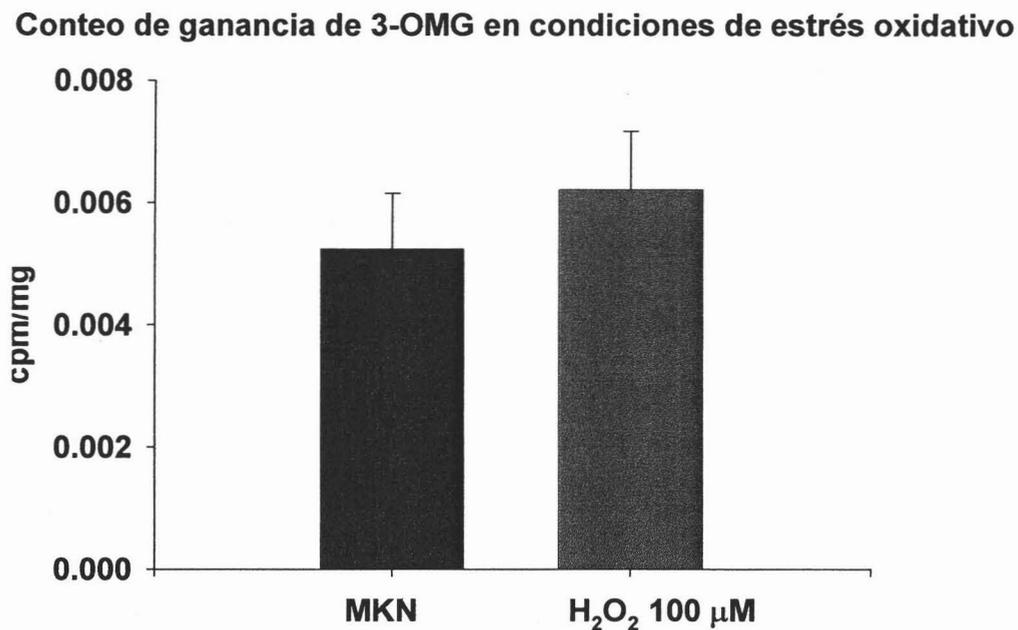


Figura 4. Ganancia de 3-OMG en retinas expuestas a H_2O_2 100 μM , durante 20 minutos. Valor F = 0.944. Las mediciones son el promedio de 2 experimentos separados \pm SE. Valor F=0.944. Note que no se observó diferencia significativa en la captura de 3-OMG por la presencia de H_2O_2 (n=9).

Además del conteo de ganancia de 3-OMG, otra estrategia utilizada para determinar si la liberación de ácido glutámico y de taurina se debía a un incremento de volumen celular fue la cuantificación de la liberación de estos aminoácidos en presencia de un medio extracelular hiperosmótico. Esto, debido a

que se sabe que las condiciones de hiperosmolaridad, no permiten un aumento de volumen celular y, al no haber hinchamiento celular, no hay liberación de aminoácidos (Pasantés-Morales y cols., 1999). Así, si la liberación de aminoácidos inducida por el H₂O₂, observada en este trabajo, era consecuencia de un aumento de volumen celular, entonces dicha liberación hubiese sido inhibida en presencia de un medio hiperosmótico.

El efecto del medio hiperosmótico sobre la liberación del ácido glutámico y de taurina, inducida por el H₂O₂, se presenta en la figura 5. Los valores obtenidos para la liberación del ácido glutámico fueron: $37.93 \pm 2.63\%$, en condiciones control (MKN); $76.6 \pm 4.5 \%$, en presencia de H₂O₂ 100 μ M; y $71.82 \pm 3.31\%$ (del total de aminoácido radioactivo capturado) en medios hiperosmótico con H₂O₂ 100 μ M (Figura 5A). . Estos datos se obtuvieron después de 20 minutos de exposición de las retinas a las diferentes condiciones experimentales. En el caso de la liberación de taurina los valores observados fueron de $24.11 \pm 1.6\%$, en condiciones control; $42.9 \pm 2.6 \%$, en medios con H₂O₂ 100 μ M; y $39.6 \pm 1.54 \%$ en presencia de medios hiperosmóticos junto con H₂O₂ 100 μ M (Figura 5B).

La liberación de ácido glutámico producida por el H₂O₂ en presencia del medio hiperosmótico, con respecto a la liberación inducida por H₂O₂ en condiciones isosmóticas, es menor y significativamente diferente ($p < 0.05$). Sin embargo, esta liberación producida por H₂O₂ también es significativamente distinta a la liberación observada en condiciones control (Figura 5A), observada en condiciones de

hiperosmolaridad, sugiriendo que la liberación de este aminoácido no está asociada a un incremento en el volumen celular.

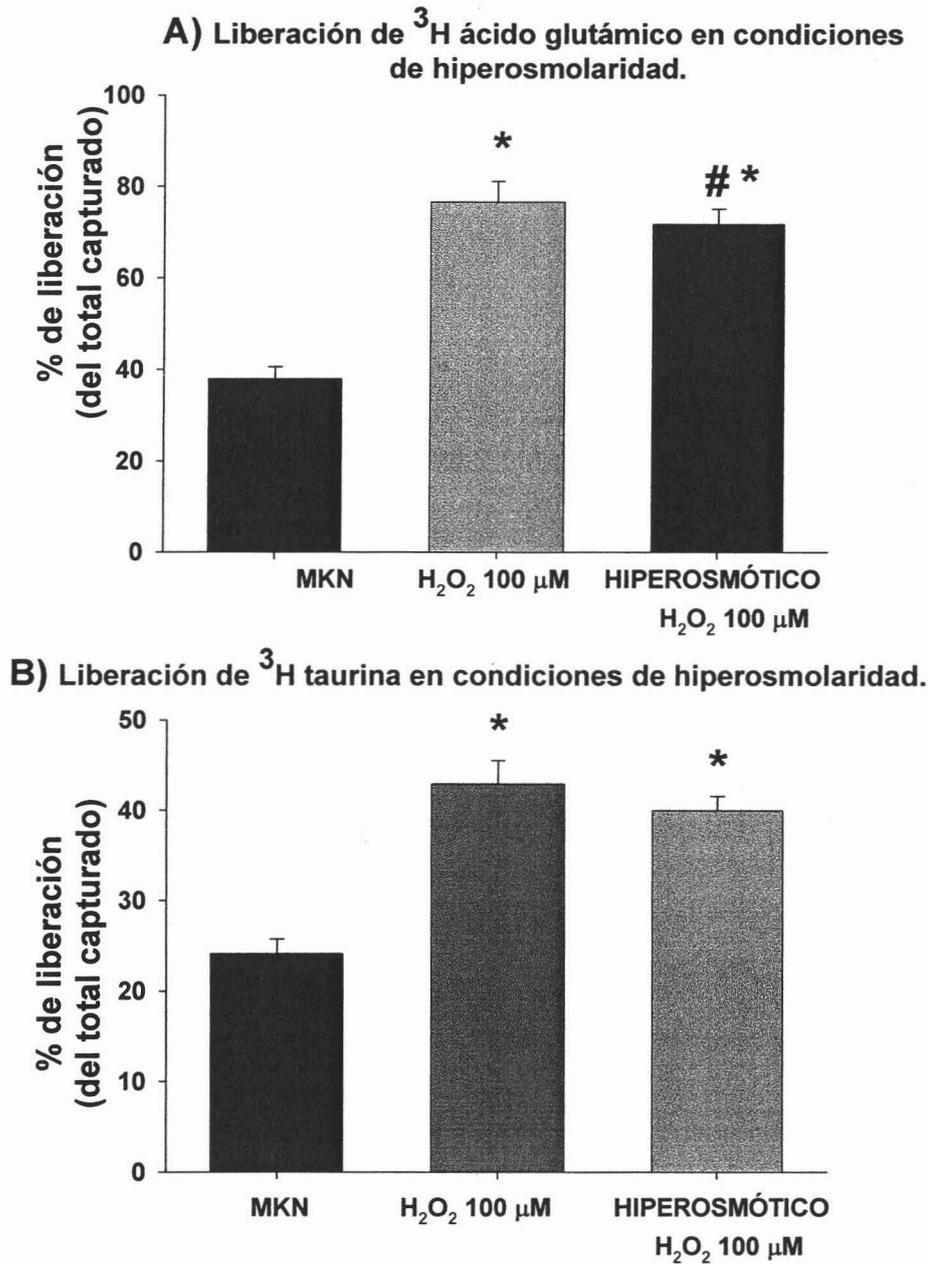
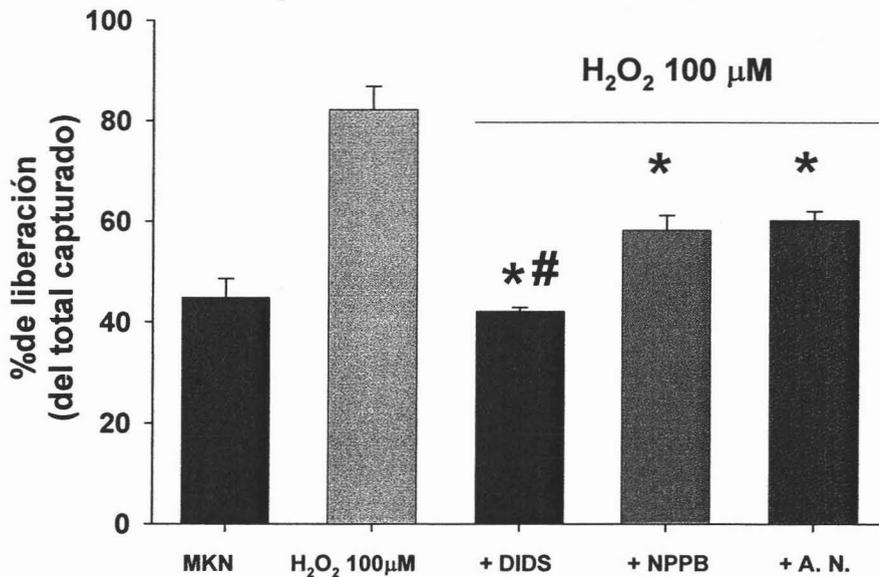


Figura 5. Efecto del medio hiperosmótico (400 mOsm) sobre la liberación inducida, de glutamato (5A) y de taurina (5B), por H₂O₂ 100 μM. Las retinas se incubaron durante 20 minutos. El medio hiperosmótico sólo estuvo presente durante el tiempo de exposición al H₂O₂. Los medios hiperosmóticos fueron ajustados con sorbitol. Los datos representan el radioactivo liberado expresado como el % del total incorporado al tejido. Las mediciones son el promedio de, al menos, 4 experimentos separados ± SE. A)* p<0.05 vs MKN; # p<0.05 Hiperosmótico vs H₂O₂ valor F= 16.268 (n=4); B)* p<0.05 vs MKN valor F=5.049. Note que no hay diferencia en la liberación inducida por el H₂O y en condiciones de hiperosmolaridad (n=9).

Efecto de bloqueadores de canales de Cl⁻ sobre la liberación de aminoácidos. Posible activación por H₂O₂.

En la parte final de este trabajo, tratamos de caracterizar la vía de movilización de taurina y de ácido glutámico bajo condiciones de estrés oxidativo. Para esto, se utilizaron bloqueadores de canales de Cl⁻, DIDS (500 μ M), NPPB (100 μ M) y ácido niflúmico (600 μ M) (González y cols., 1995; Strange y cols., 1996; Pasantes-Morales, 1996; Kirk, 1997; Morán y cols., 1997; Franco y cols., 2001) en presencia de H₂O₂ 100 μ M. La liberación de ambos aminoácidos inducida por el H₂O₂ fue disminuida con los tres bloqueadores de canales de Cl⁻ (Figura 6). La liberación de ácido glutámico fue inhibida en presencia del DIDS, mientras que el NPPB y el ácido niflúmico tuvieron un menor efecto reduciéndola de $82.22 \pm 4.61\%$ en presencia de H₂O₂ a $58.14 \pm 3.02\%$ y $60.17 \pm 1.8\%$ respectivamente (Figura 6A). Por otro lado, la liberación de taurina también fue inhibida completamente por el DIDS, seguida por el NPPB de $47.95 \pm 2.86\%$ en presencia de H₂O₂, a $37.79 \pm 1.088\%$; y el ácido niflúmico $34.36 \pm 2.49\%$ (Figura 6B). El efecto del DIDS sobre la liberación de los aminoácidos, además fue significativamente diferente de la observada en presencia de cualquiera de los otros dos bloqueadores utilizados. La inhibición de la liberación de aminoácidos, en presencia de H₂O₂, en condiciones isosmóticas, producida por los bloqueadores de canales de Cl⁻ ha sido poco estudiada (Haskew-Layton y cols., 2005; Lambert 2003). Haskew-Layton y cols., (2005) también observaron una liberación de aminoácidos (ácido aspártico) bajo condiciones isosmóticas y en presencia de H₂O₂.

A) Liberación de ^3H ácido glutámico en presencia de bloqueadores de canales de Cl^- .



B) Liberación de ^3H taurina en presencia de bloqueadores de canales de Cl^- .

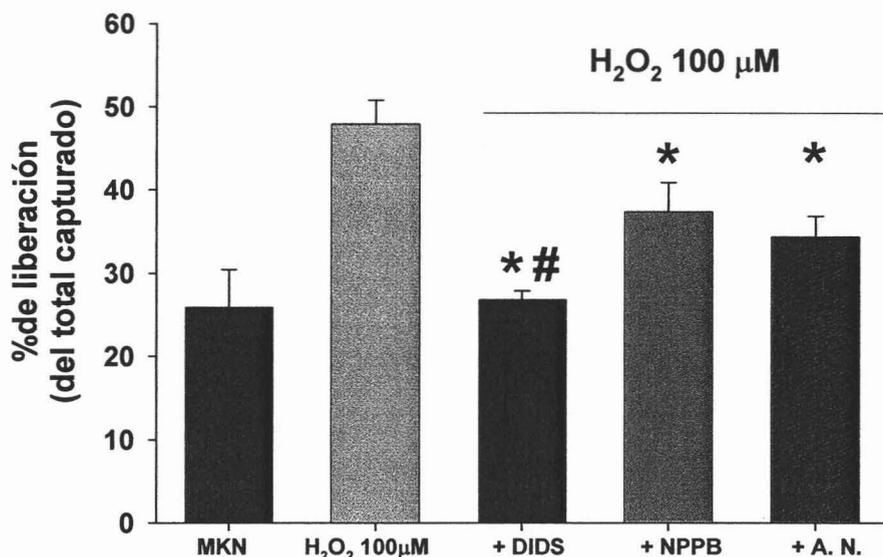


Figura 6. Efecto de bloqueadores de canales de Cl^- sobre la liberación, de ácido glutámico (A) y de taurina (B), inducida por H_2O_2 100 μM . DIDS (500 μM), NPPB (100 μM) y el Ácido Niflúmico (600 μM) estuvieron presentes durante el tiempo de exposición al H_2O_2 . Los datos representan el radioactivo liberado expresado como el % del total incorporado al tejido. Las mediciones son el promedio de 4 experimentos separados \pm SE. * $p < 0.05$ vs H_2O_2 100 μM ; # $p < 0.05$ vs NPPB y A.N.; A) $F=21.692$; B) $F=27.208$

DISCUSIÓN

Las condiciones que se sabe que causan daño neuronal, en general, inducen una gran liberación de aminoácidos, como la taurina y el ácido glutámico (Haddad y Jiang, 1993; Hara y cols., 1993; Saransaari y Oja, 1998). Esta liberación puede deberse a una apertura indiscriminada de canales aniónicos (Pasantes-Morales y cols., 1991, 2000, 2002) o mediante la fuga de componentes intracelulares a través de membranas celulares dañadas por el ataque de radicales libres. Esto debido a que, como ya se dijo, la membrana plasmática de las neuronas es rica en ácidos grasos poliinsaturados los cuales son susceptibles a un ataque por radicales libres. Además, la actividad de componentes de las membranas, incluyendo la ATPasa Na^+/K^+ y la ATPasa de Ca^{2+} , puede ser alterada por los radicales libres (Rohn y cols., 1993). Como consecuencia, la lipoperoxidación podría llevar a un incremento generalizado en la permeabilidad de la membrana celular. Los radicales libres también han sido implicados en la generación de muerte neuronal en el sistema nervioso central (Gilgun-Sherki, y cols., 2002).

Este trabajo se realizó con la finalidad de establecer si había una relación entre el edema celular y el estrés oxidativo, en función de la liberación de aminoácidos, en condiciones de isosmolaridad. Ante la presencia de H_2O_2 las retinas respondieron con una liberación de ácido glutámico y de taurina, estimulada con H_2O_2 (Figuras 1 y 2). Esta liberación de aminoácidos, como respuesta a condiciones de estrés oxidativo, también ha sido observada en neuronas corticales en cultivo (Mailly y cols., 1998), en células del músculo esquelético (Ortenblad y cols., 2003), en

rebanadas de hipocampo de rata (Pellegrini-Giampietro y cols., 1988; Saransaari y Oja, 1997; Saransaari y Oja, 2000), y en sinaptosomas de corteza cerebral (Gilman y cols., 1992). Esta liberación de ácido glutámico es de gran importancia ya que es el mayor neurotransmisor excitador del cerebro. Se sabe, además, que en condiciones patológicas, como la isquemia, este aminoácido se encuentra en concentraciones muy altas en el espacio extracelular, y como consecuencia puede generar muerte celular por excitotoxicidad (Aarts y Tymianski, 2004).

La liberación de ácido glutámico, en respuesta a H_2O_2 , observada en este estudio, también fue reportada por Mailly y cols., (1998). Estos autores demostraron que el H_2O_2 a una concentración de 200 μM , con un periodo de exposición de 20 minutos, fue capaz de inducir la liberación de ácido glutámico en cultivos de neuronas corticales. Sin embargo en este trabajo, no reportaron si la liberación de ácido glutámico era mediada directamente por el estrés oxidativo o si se debía a algún otro factor.

Por otro lado, también se sabe que aminoácidos como la taurina y el GABA también son liberados bajo condiciones de estrés oxidativo, inducido por H_2O_2 , en rebanadas de hipocampo (Saransaari y Oja, 1997; 2000) y en corteza cerebral de ratas (O'Regan y cols., 1997). Sin embargo, se ha sugerido que la liberación de aminoácidos inhibidores, como la taurina y el GABA, simultánea con la liberación de ácido glutámico, podrían tener un papel importante, como mecanismo protector contra los aminoácidos excitadores en exceso, contrarrestando el daño excitotóxico. Uno de los posibles mecanismos es a través de receptores a $GABA_A$

ya que en algunos estudios se ha visto que la activación de estos receptores incrementa la conductancia de Cl^- lo que trae como consecuencia una hiperpolarización de las células y así reduciendo la excitabilidad neuronal (Oja y cols., 1990; Sivilotti y Nistri, 1991). Por otra parte, la taurina también tiene presente el mismo, aunque menos potente, efecto sobre las conductancias membranales de Cl^- (Oja y cols., 1990).

Como ya se ha mencionado, la liberación de aminoácidos observada en este trabajo, podría ser consecuencia de un daño en las membranas celulares como producido por H_2O_2 , o por sus derivados. Sin embargo, esta posibilidad quedó descartada al cuantificar la liberación de la enzima LDH en condiciones control y en condiciones de estrés oxidativo (Figura 3). Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la liberación de LDH en presencia de H_2O_2 100 μM no es mayor a la observada en condiciones control, por lo que las neuronas de las retinas, expuestas a H_2O_2 100 μM no presentan un proceso de lisis membranal. Resultados similares han sido reportados en rebanadas de hipocampo de rata adulta (Pellegrini-Giampietro y cols., 1990), y en desarrollo (Saransaari y Oja 1998), y en células de la corteza cerebral de ratones (Mailly y cols., 1998), en los que no se ha visto aumentada la liberación de la LDH por la presencia de estrés oxidativo.

Recientemente, Haskew-Layton y cols., (2005) observaron una liberación de ácido aspártico en cultivos primarios de astrocitos expuestos a H_2O_2 (0.1–1 mM) durante 20 minutos, y demostraron que esta liberación no era producto de una lisis de la membrana celular mediante la determinación de la liberación de ^{51}Cr .

Una vez demostrado que la liberación de aminoácidos en respuesta a las condiciones de estrés oxidativo no era un producto de daño membranal, y tomando en cuenta que los radicales libres pueden alterar la permeabilidad de las membranas celulares y producir un desbalance iónico, nuestro objetivo paso fue determinar si se presentaba hinchamiento celular bajo nuestras condiciones de estrés oxidativo. Para esto se determinó la liberación de aminoácidos en presencia de medios hiperosmóticos (Figura 4), puesto que ha sido reportado que, bajo estas condiciones, la liberación de aminoácidos, inducida por el hinchamiento celular, es inhibida (Pasantés-Morales y cols., 1999). Además, se cuantificó la ganancia de agua de las retinas bajo condiciones control y retinas expuestas a condiciones de estrés oxidativo (Figura 5).

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que las condiciones de estrés oxidativo, inducidas por H_2O_2 , no producen un incremento de volumen celular en las retinas y, a pesar de esto, se continua observando la liberación de ácido glutámico y de taurina. Por lo que, la liberación de ácido glutámico y de taurina estimulada por H_2O_2 , no es el reflejo de un mecanismo regulador de volumen celular, como sucede en condiciones de hiposmolaridad (Pasantés-Morales y cols., 1990; 1991, 1994; 1999). Esto lo podemos concluir debido a que 1: la liberación de ambos aminoácidos, inducida por H_2O_2 , no fue inhibida por la presencia de medios hiperosmóticos (Figura 4), como se ha observado en la liberación estimulada por condiciones hiposmóticas (Pasantés-Morales y cols., 1999); y 2: la ganancia de agua, la cual es un reflejo del hinchamiento celular

(Ochoa de la Paz y cols., 2002; 2005), de las retinas expuestas a H_2O_2 , no fue mayor comparada con las retinas tratadas con condiciones control.

Finalmente, sabiendo que la liberación de aminoácidos observada en este trabajo no era producto de un hinchamiento celular producido por H_2O_2 , tratamos de caracterizar la vía de movilización de estos aminoácidos. Se sugiere que la liberación de osmolitos intracelulares como K^+ , Cl^- y moléculas orgánicas a través de vías difusionales es un fenómeno común a estímulos hiposmóticos en la mayoría de los tipos celulares (Lang, 1998). Aunque aún no se ha identificado la naturaleza molecular de la vía de movilización de osmolitos, se ha propuesto que es una vía aniónica inespecífica activada por un cambio en la osmolaridad del medio externo (Strange y cols., 1996; Pasantes-Morales, 1996). Sin embargo, en condiciones isosmóticas, se sabe que la presencia de H_2O_2 exógeno o un aumento en la producción de H_2O_2 endógeno afecta la función de diferentes proteínas, incluyendo fosfatasas de tirosina, proteínas cinasas, y factores de transcripción, sugiriendo que el H_2O_2 podría actuar como un mensajero intracelular (Finkel T, 1998; Suzuki y Ford, 1999; Rhee, 1999). Además, se ha propuesto que el H_2O_2 podría cambiar el balance fosforilación/desfosforilación de los componentes intracelulares (Varela y cols., 2004). Varela y cols. (2004) también proponen que el H_2O_2 exógeno (20-200 μM), en condiciones isosmóticas, es capaz de activar una corriente de Cl^- prácticamente igual a la corriente inducida por condiciones hiposmóticas, demostrando así que el H_2O_2 puede actuar directamente sobre la activación de canales aniónicos en células HTC (línea celular derivada del hígado)

y en células HeLa. Estos autores, además, encontraron que la activación de canales de Cl⁻ está acoplada a la actividad de la NADP(H) oxidasa y que ésta es capaz de producir, al menos parcialmente, H₂O₂ el cual podría activar canales de Cl⁻.

Por otra parte, Lambert (2003) demostró que fibroblastos NIH3T3 de ratón son capaces de incrementar la producción de radicales libres ante una condición de hiposmolaridad y que este aumento en los radicales libres es de gran importancia para inducir la liberación de taurina. Esto, debido a que la especies reactivas de oxígeno, probablemente, incrementan la probabilidad de apertura de la vía de liberación –sensible a volumen- de taurina en células NIH3T3. Además, en el mismo trabajo, Lambert (2003), demostró que el H₂O₂ inhibe una fosfatasa de tirosina (sin identificarse todavía), lo que potencia la liberación de taurina estimulada por el hinchamiento celular.

Además, Ortenblad y cols., (2003) demostraron que la liberación de taurina, en células de músculo esquelético, está mediada por 2 vías diferentes, las cuales se diferencian por su sensibilidad al bloqueo con colesterol y a bloqueadores de canales de Cl⁻, específicamente el DIDS. Estos autores también demostraron que los radicales libres son factores claves para inducir la liberación de este aminoácido, debido a que vieron un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno, que precede a la liberación de taurina.

En conjunto, estos resultados nos permiten sugerir que la vía de movilización de aminoácidos, activada por el H₂O₂, es una vía aniónica, ya que la liberación, tanto

de ácido glutámico como de taurina, fue disminuida cuando se utilizaron bloqueadores de canales de Cl^- , como el NPPB y el ácido niflúmico, y completamente inhibida cuando las retinas se expusieron a DIDS (Figura 6). Este efecto diferencial, de los bloqueadores de canales de Cl^- probablemente se debe a que todos estos son bloqueadores generales de canales de Cl^- .

La idea de que el H_2O_2 esté modulando la actividad de estos canales directa o indirectamente, ya ha sido reportado en algunos estudios en los que se ha visto que las especies reactivas de oxígeno, en condiciones isosmóticas, son capaces de modular directamente la actividad de canales iónicos (Weng y cols., 2002; Haskew-Layton y cols., 2005; Varela y cols., 2004). Weng y cols., (2002) demostraron que la amplitud de una corriente rectificadora saliente de Cl^- , en cultivos primarios de células del epitelio pigmentado retinal de humano adulto, fue disminuida con la aplicación de H_2O_2 exógeno, sugiriendo un sitio de regulación redox para este tipo de canales iónicos.

Esta idea de la liberación de aminoácidos, a través de canales aniónicos, bajo condiciones de estrés oxidativo, en las que no se involucra un incremento de volumen celular, es apoyada por el trabajo de Haskew-Layton y cols., (2005). En este trabajo los autores demostraron que la liberación del ácido aspártico, de astrocitos en cultivo, estaba mediada por canales aniónicos, esto debido a que el NPPB inhibió dicha liberación, ante un estímulo con H_2O_2 .

La liberación del ácido glutámico y de la taurina observada en este trabajo podría ser de gran importancia para la sobrevivencia neuronal. Por un lado, la liberación de ácido glutámico al espacio extracelular es una condición patológica de gran riesgo para las células, ya que se sabe que altas concentraciones de glutamato en el espacio extracelular pueden contribuir a la muerte neuronal (excitotoxicidad) por diferentes mecanismos. Uno de los más importantes es la entrada de Ca^{2+} al medio intracelular producida por la activación de receptores de glutamato lo cual puede desencadenar una serie de procesos que son dependientes de Ca^{2+} y finalmente culminar en la muerte celular (Aarts y Tymianski, 2004). Por otro lado la presencia de H_2O_2 en el medio extracelular es responsable de producir una liberación de ácido glutámico y este ácido glutámico liberado, posteriormente podría provocar una sobreproducción de radicales libres (Bonne y cols. 1998) y como consecuencia exacerbar el daño celular. Esto debido a que se cree que los procesos de liberación de ácido glutámico y la producción de ácido glutámico están interrelacionados (Bonne y cols. 1998; Mailly y cols., 1998).

Por otra parte, la liberación de taurina puede estar asociada a un mecanismo de protección ante las condiciones de estrés oxidativo para los diferentes tipos celulares de la retina. En algunos trabajos se ha visto que la taurina tiene diferentes funciones como osmorregulador y neuromodulador y que también es capaz de tener efectos neuroprotectores en tejidos neuronales bajo condiciones oxidantes (Saransaari y Oja 2000). Además, se sabe que la taurina y sus derivados, como la hipotaurina, son capaces de proteger a las células contra el daño oxidativo (Pokhrel y Lau-Cam 2000). Sin embargo, no se conoce bien cuál es

el mecanismo por el que realizan esta(s) función(es) (Pokhrel y Lau-Cam 2000). Tomando como referencia las propiedades neuroprotectoras asociadas a la taurina es posible pensar que su liberación observada en este estudio, es un mecanismo para tratar de disminuir los efectos de los aminoácidos excitotóxicos ayudando a preservar la viabilidad celular.

CONCLUSIONES

En este trabajo se determinó que el H_2O_2 es capaz de inducir, por sí mismo, la liberación de ácido glutámico y de taurina a diferentes concentraciones en condiciones isosmóticas. La liberación de ácido glutámico y de taurina no se vió afectada en presencia de condiciones hiperosmóticas, sugiriendo que la liberación de ambos aminoácidos no está asociada a un mecanismo de regulación de volumen celular. Además, se observó que el estrés oxidativo producido por el H_2O_2 no produce un rompimiento de la membrana celular lo cual se demostró midiendo la liberación de la enzima LDH. Esto podría sugerir que el H_2O_2 , está modulando directamente alguna(s) vía(s) de liberación de aminoácidos. Cuando se utilizaron bloqueadores de canales de Cl^- , el efecto sobre la liberación de aminoácidos fue mayor en el caso del DIDS, y menor para el NPPB y el ácido niflúmico. Esto indica que en condiciones isosmóticas, se activa una vía aniónica que no está asociada a un mecanismo de regulación de volumen celular, y posiblemente está modulada directamente por el H_2O_2 o por sus derivados. Finalmente, es posible que la liberación de ácido la taurina pudiera ser un mecanismo neuroprotector contra el daño celular producido por la excitotoxicidad.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

REFERENCIAS

- ∫ **Aarts MM & Tymianski M. 2004.** Molecular mechanisms underlying specificity of excitotoxic signaling in neurons. *Curr Mol Med.* 4: 137-147.
- ∫ **Ames IIIA, Li YY, Heher EC & Kimble R. 1992.** Energy metabolism of rabbit retina as related to function: high cost of Na⁺ transport. *J Neurosci.* 12: 840-853.
- ∫ **Andrew RD. 1991.** Seizure and acute osmotic change: clinical and neurophysiological aspects. *J Neurol Sci.* 101: 7-18.
- ∫ **Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM & Butler J. 1988.** The antioxidant action of taurine, hypotaurine and their metabolic precursors. *Biochem J.* 256: 251-255.
- ∫ **Augustin AJ, Breipohl W, Böker T, Lutz J & Spitznas M. 1993.** Increased lipid peroxidase levels and myeloperoxidase activity in the vitreous of patients suffering from proliferative diabetic retinopathy. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol.* 231: 647-650.
- ∫ **Balaban RS & Burg MB. 1987.** Osmotically active organic solutes in the renal inner medulla. *Kidney Int.* 31: 562-564.
- ∫ **Banderali U, & Roy G. 1992.** Anion channels for amino acids in MDCK cells. *Am J Physiol.* 263: C1200-C1207.
- ∫ **Barabán SC, Bellingham MC, Berger AJ & Schwartzkroin PA. 1997.** Osmolarity modulates K⁺ channel function on rat hippocampal interneurons but not CA1 pyramidal neurons. *J Physiol.* 498: 679-689.
- ∫ **Bonne C, Muller A & Villain M. 1998.** Free radicals in retinal ischemia. *Gen Pharmacol.* 30: 275-280.
- ∫ **Boveris A & Chance B. 1973.** The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J.* 134: 707-716.
- ∫ **Butterworth RF. 2003.** Brain edema in acute liver failure. *Indian J Gastroenterol.* 22 (2): S59-61.
- ∫ **Cala PM. 1980.** Volume regulation by *Amphiuma* red blood cells. The membrane potential and its implications regarding the nature of the ion-flux pathways. *J Gen. Physiol.* 76: 683-708.
- ∫ **Cohen LH & Noell WK. 1960.** Glucose catabolism of rabbit retina before and after development of visual function. *J Neurochem.* 5: 253-276.
- ∫ **Cringle S, Yu DY, Alder V & Su EN. 1992.** Oxygen tension and blood flow in the retina of normal and diabetic rats. *Adv Exp Med Biol.* 317: 787-791.

- ƒ **Chamberlin ME & Strange K. 1989.** Anisosmotic cell volume regulation: a comparative view. *Am J Physiol.* 257 (Cell Physiol. 26): C159-C173.
- ƒ **Cherici G, Alesiani M, Pellegrini-Giampietro DE & Moroni F. 1991.** Ischemia does not induce the release of excitotoxic amino acids from the hippocampus of newborn rats. *Dev Brain Res.* 60: 235-240.
- ƒ **Choi DW. 1985.** Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture is calcium dependent. *Neurosci Lett.* 58: 293-297.
- ƒ **Choi, DH. 1996.** Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke.* 27: 1124-1129.
- ƒ **Deutsch C & Chen LQ. 1993.** Heterologous expression of specific K⁺ channels in T lymphocytes: functional consequences for volume regulation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90: 10036-10040.
- ƒ **Falke LC & Misler S. 1989.** Activity of ion channels during volume regulation by clonal N1E115 neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 86: 3919-3923.
- ƒ **Fernández-Fernández JM, Nobles M, Currid A, Vazquez E & Valverde MA. 2002.** Maxi K⁺ channel mediates regulatory volume decrease response in a human bronchial epithelial cell line. *Am J Physiol Cell Physiol.* 283: C1705-C1714.
- ƒ **Finkel T. 1998.** Oxygen radicals and signaling. *Curr Opin Cell Biol.* 10: 248-253.
- ƒ **Finkelstein D. 1992.** Ischemic macular edema. Recognition and favorable natural history in branch vein occlusion. *Arch Ophthalmol.* 110: 1427-1434.
- ƒ **Fliester SJ & Anderson RE. 1983.** Chemistry and metabolism of lipids in the vertebrate retina. *Prog Lipid Res.* 22: 79-83.
- ƒ **Franco R, Torres-Marquez ME & Pasantes-Morales H. 2001.** Evidence for two mechanisms of amino acid osmolyte release from hippocampal slices. *Pflugers Arch.* 442: 791-800.
- ƒ **García JJ, Sánchez-Olea R & Pasantes-Morales H. 1991.** Taurine release associated to volume regulation in rabbit lymphocytes. *J Cell Biochem* 45: 207-212.
- ƒ **Geck P & Pfeiffer B. 1985.** Na⁺ K⁺ 2Cl⁻ cotransport in animal cells: its role in volume regulation. *Ann NY Acad Sci.* 456: 166-182.
- ƒ **Gehlbach PL, & Purple RL. 1994a.** A paired comparison of two models of experimental retinal ischemia. *Curr Eye Res.* 13: 597-602.
- ƒ **Gehlbach PL, & Purple RL. 1994b.** Enhancement of retinal recovery by conjugated deferoxamine after ischemia-reperfusion. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 35: 669-76.
- ƒ **Gilgun-Sherki Y, Rosenbaum Z, Melamed E & Offen D. 2002.** Antioxidant therapy in acute central nervous system injury: current state. *Pharmacol Rev.* 54:271-84.

- f **Gilman SC**, Bonner MJ & Pellmar TC. **1992**. Peroxide effects on $^{3\text{H}}$ L-glutamate release by synaptosomes isolated from the cerebral cortex. *Neurosci Lett*; 140: 157-160.
- f **Gill DR**, Hyde SC, Higgins CF, Valverde MA, Mintenig GM & Sepulveda FV **1992**. Separation of drug transport and chloride channel functions of the human multidrug resistance P-glycoprotein. *Cell*: 71: 23-32.
- f **Gilles R**. **1987**. Volume regulation in cells of euryhaline invertebrates. En: *Cell Volume Control: Fundamental and comparative aspects in animal cells*. Edited by Kleinzeller A. New York: Academic. pp: 205-247.
- f **González E**, Sánchez-Olea R & Pasantes-Morales H. **1995**. Inhibition by Cl⁻ channel blockers of the volume-activated, diffusional mechanism of inositol transport in primary astrocytes in culture. *Neurochem Res*. 20: 895-900.
- f **Gordon WC** & Bazan NG. **1997**. Retina. En: *Biochemistry of the eye*. Edited by Harding JJ. London. Chapman & Hall. pp: 144-275.
- f **Grinstein S**, Clarke CA & Rothstein A. **1983**. Activation of Na⁺/H⁺ exchange in lymphocytes by osmotically induced volume changes and by cytoplasmic acidification. *J. Gen Physiol*. 82: 619-683.
- f **Grinstein S**, Clarke CA, Dupre A & Rothstein A. **1982**. Volume-induced increase of anion permeability in human lymphocytes. *J Gen Physiol*. 80: 801-823.
- f **Grunder S**, Thiemann A, Pusch M & Jentsch TJ. **1992**. Regions involved in the opening of the ClC-2 chloride channel by voltage and cell volume. *Nature*. 360: 759-762.
- f **Gutknecht J**, Hastings DF & Bisson MA. **1978**. Ion transport and turgor pressure regulation in giant algal cells. En: *Membrane transport in biology*. Edited by Giebisch G, Tosteson DC, & Using HH. New York. Springer-Verlag. pp: 125-174.
- f **Gutteridge JM** & Halliwell. B. **1989**. Iron toxicity and oxygen radicals. *Baillieres Clin Haematol*. 2(2):195-256.
- f **Haddad GG**, Jiang C. **1993**. O₂ deprivation in the central nervous system: on mechanisms of neuronal response, differential sensitivity and injury. *Prog Neurobiol*; 40(3): 277-318.
- f **Hallows KR** & Knauf PA. **1994**. Regulatory volume decrease in HL-60 cells: importance of rapid changes in permeability of Cl⁻ and organic solutes. *Am J Physiol*. 267: C1045-C1056.
- f **Hara H**, Sukamoto T & Kogure K. **1993**. Mechanism and pathogenesis of ischemia-induced neuronal damage. *Prog Neurobiol*. 40(6): 645-70.
- f **Haskew-Layton RE**, Mongin AA & Kimelberg HK. **2005**. Hydrogen peroxide potentiates volume-sensitive excitatory amino acid release via a mechanism involving Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem*. 280: 3548-3554.

- † **Hoffmann EK & Simonsen LO. 1989.** Membrane mechanisms in volume and pH regulation in vertebrate cells. *Physiol Rev.* 69: 315-382.
- † **Huxtable RJ. 1989.** Taurine in the central nervous system and the mammalian actions of taurine. *Prog Neurobiol.* 32: 471-533.
- † **Iborra FJ, Cano-Parra J, Renau-Piqueras J, Guerri C & Pinazo-Durán MD. 1994.** Lipid peroxidation in the retina catalyzed by cytochrome P450. *Invest Ophthalmol Vis Sci;* 35: 135.
- † **Ito T, Nakano M, Yamamoto Y, Hiramitsu T & Mizuno Y. 1995.** Hemoglobin-induced lipid peroxidation in the retina: a possible mechanism for macular degeneration. *Arch Biochem Biophys.* 316: 864-872.
- † **Iversen LL. 1991.** Pharmacological approaches to the treatment of ischaemic neuronal damage. *Eye.* 5: 193-197.
- † **Jacobsen JG & Smith LH. 1968.** Biochemistry and physiology of taurine and taurine derivatives. *Physiol Rev.* 48: 424-511.
- † **Jefferys JG & Haas HL. 1982.** Synchronized bursting of CA1 hippocampal pyramidal cells in the absence of synaptic transmission. *Nature.* 300: 448-450.
- † **Kalloniatis M & Tomisich G. 1999.** Amino acid neurochemistry of the vertebrate retina. *Prog Retin Eye Res.* 18: 811-866.
- † **Kato H & Kogure K. 1999.** Biochemical and molecular characteristics of the brain with developing cerebral infarction. *Cell Mol Neurobiol.* 19: 93-108.
- † **Kehrer JP. 1993.** Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Critical Rev Toxicol;* 23:21-48.
- † **Kimelberg HK & Kettenmann H. 1990.** Swelling-induced changes in electrophysiological properties of cultured astrocytes and oligodendrocytes. I. Effects on membrane potentials, input impedance and cell-cell coupling. *Brain Res.* 529(1-2): 255-261.
- † **Kimelberg HK & Ramson BR. 1986.** Physiological and pathological aspects of astrocytic swelling. En: *Astrocytes.* Edited by Fedoroff S, Vernakakis. Orlando. Fla. Academic Press. Pp: 129-166.
- † **Kimelberg HK. 1995.** Current concepts of brain edema. *J Neurosug.* 83: 1051-1059.
- † **Kirk K. 1997.** Swelling-activated organic osmolyte channels. *J Membr Biol.* 158: 1-16.
- † **Kocak-Toker N, Giris M, Tulubas F, Uysal M & Aykac-Toker G. 2005.** Peroxyntirite induced decrease in Na⁺, K⁺-ATPase activity is restored by taurine. *World J Gastroenterol.* 11: 3554-3557.

- † **Krebs H A. 1935.** Metabolism of amino-acids. III. Deamination of amino-acids. *Biochem J.* 29: 1620-1644.
- † **Lambert IH. 2003.** Reactive oxygen species regulate swelling-induced taurine efflux in NIH3T3 mouse fibroblasts. *J Membr Biol.* 192: 19-32.
- † **Lambert IH. 2004.** Regulation of the cellular content of the organic osmolyte taurine in mammalian cells. *Neurochemical Research.* 29: 27-63.
- † **Lang F, Busch GL & Volkl H. 1998.** The diversity of volume regulatory mechanisms. *Cell Physiol Biochem.* 8: 1-45.
- † **Lang F. 1998.** The tyrosine kinase p56lck mediates activation of swelling-induced chloride channels in lymphocytes. *J Cell Biol.* 141: 281-286.
- † **Lee JM, Grabb MC, Zipfel GJ & Choi DW. 2000.** Brain tissue responses to ischemia. *J Clin Invest.* 106: 723-731.
- † **Lerouet D, Beray-Berthet V, Palmier B, Plotkine M & Margail I. 2002.** Changes in oxidative stress, iNOS activity and neuropil infiltration in severe transient focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res.* 958: 166-175.
- † **Lima L. 1999.** Taurine and its trophic effects in the retina. *Neurochem Res.* 24: 1333-1338.
- † **Macdonald RL & Stoodley M. 1998.** Pathophysiology of cerebral ischemia. *Neurol Med Chir.* 38: 1-11.
- † **Mailly F, Marin P, Israël M, Glowinski J & Prémont J. 1998.** Increase in external glutamate and NMDA receptor activation contribute to H₂O₂-induced neuronal apoptosis. *J Neurochem* 73: 1181-1188.
- † **Mariani AP. 1984.** The neuronal organization of the outer plexiform layer of the primate retina. *Int Rev Cytol.* 86: 285-320.
- † **McManus ML & Churchwell KB. 1994.** Clinical significance of cellular osmoregulation. En: *Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation.* Edited by Strange K. CRC. Boca Raton. FL. USA. pp: 63-74.
- † **Militante JD & Lombardini JB. 2002.** Taurine: evidence of physiological function in the retina. *Nutr Neurosci.* 2: 75-90.
- † **Montoliu C, Pinazo-Durán MD & Guerri C. 1996.** Mecanismos de protección frente a los radicales libres en las estructuras del globo ocular de la rata. *Arch Soc Esp Oftalmol.* 70: 139-148.
- † **Moorman RJ, Ackerman SJ, Kowdley GC, Griffin PM, Mounsey PJ, Chen Z, Cala SE, O'Brian JJ, Szabo G & Jones LR. 1995.** Unitary anion currents through phospholemman channels molecules. *Nature.* 377: 737-740.

- † **Morales-Mulia M**, Pasantes-Morales H & Morán J. **2000**. Volume sensitive efflux of taurine in HEK293 cells overexpressing phospholemman. *Biochim Biophys Acta* 1496: 252-260.
- † **Morán J**, Hurtado S, Pasantes-Morales H. **1991**. Similar properties of taurine release induced by potassium and hyposmolarity in the rat retina. *Exp Eye Res.* 53: 347-352.
- † **Morán J**, Miranda D, Peña-Segura C & Pasantes-Morales H. **1997**. Volume regulation in NIH/3T3 cells not expressing P-glycoprotein. II. Chloride and amino acid fluxes. *Am J Physiol.* 272: C1804-1809.
- † **Morán J**, Sabanero M, Meza I & Pasantes-Morales H. **1996**. Changes of actin cytoskeleton during swelling and regulatory volume decrease in cultured astrocytes. *Am J Physiol.* 271: C1901-C1907.
- † **Moran WM** & Pierce SK. **1984**. The mechanism of crustacean salinity tolerance: cell volume regulation by K⁺ and glycine effluxes. *Mar Biol NY.* 81: 41-46.
- † **Nakanishi T**, Balaban RS, & Burg MB. **1988**. Survey of osmolytes in renal cell lines. *Am. J. Physiol.* 255 (Cell Physiol. 24): C181–C191.
- † **Noell WK**, Walker VS, Kang BS & Berman S. **1966**. Retinal damage by light in rats. *Invest Ophthalmol.* 5: 450-473.
- † **Ochoa-de la Paz LD**, Lezama R, Torres-Marquez ME & Pasantes-Morales H. **2002**. Tyrosine kinases and amino acid efflux under hyposmotic and ischaemic conditions in the chicken retina. *Pflugers Arch.* 445: 87-96.
- † **Ochoa-de la Paz LD**, Lezama R, Toscano B, & Pasantes-Morales H. **2005**. Mechanisms of chloride influx during KCl-induced swelling in the chicken retina. *Pflugers Arch.* 449(6): 526-536.
- † **Oja SS**, Korpi ER & Saransaari P. **1990**. Modification of chloride flux across brain membranes by inhibitory amino acids in developing and adult mice. *Neurochem Res.* 15: 797-804.
- † **Okada Y**, Maeno E, Shimizu T, Dezaki K, Wang J, Morishima S. **2001**. Receptor-mediated control of regulatory volume decrease (RVD) and apoptotic volume decrease (AVD). *J Physiol.* 532: 3-16.
- † **Olney JW**, Price MT, Samson L & Labruyere J. **1986**. The role of specific ions in glutamate neurotoxicity. *Neurosci Lett.* 65: 65-71.
- † **Ophir A**, Berenshtein E, Kitrossky N, Berman ER, Photiou S, Rothman Z & Chevion M. **1993**. Hydroxyl radical generation in the cat retina during reperfusion following ischemia. *Exp Eye Res.* 57: 351-357.
- † **Ordaz B**, Tuz K, Ochoa LD, Lezama R, Peña-Segura C & Franco R. **2004**. Osmolytes and mechanisms involved in regulatory volume decrease under conditions of sudden or gradual osmolarity decrease. *Neurochem Res.* 29: 65-72.

- † **O'Regan MH**, Song D, VanderHeide SJ & Phillis JW. **1997**. Free radicals and the ischemia-evoked extracellular accumulation of amino acids in rat cerebral cortex. *Neurochem Res.* 22: 273-280.
- † **Ortenblad N**, Young JF, Oksbjerg N, Nielsen JH & Lambert IH. **2003**. Reactive oxygen species are important mediators of taurine release from skeletal muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 284: C1362-1373.
- † **Pasantes-Morales H** & Morales Mulia S. **2000**. Influence of calcium on regulatory volume decrease: role of potassium channels. *Nephron.* 86: 414-427.
- † **Pasantes-Morales H** & Schousboe A. **1988**. Volume regulation in astrocytes: a role for taurine as an osmoeffector. *J Neurosci Res.* 20: 503-9.
- † **Pasantes-Morales H**, Alavez S, Sánchez-Olea R & Morán J. **1993**. Contribution Of organic and inorganic osmolytes to volume regulation in rat brain cells in culture. *Neurochem Res.* 18: 445-52.
- † **Pasantes-Morales H**, Cardin V & Tuz K. **2000**. Signaling events during swelling and Regulatory Volume Decrease. *Neurochem Res.* 25: 1301–1314.
- † **Pasantes-Morales H**, Dominguez L, Campomanes MA & Pacheco P. **1986**. Retinal degeneration induced by taurine deficiency in light-deprived cats. *Exp Eye Res.* 43:55-60.
- † **Pasantes-Morales H**, Franco R, Ochoa-de la Paz LD & Ordaz B. **2002**. Osmosensitive release of neurotransmitter amino acids: relevance and mechanisms. *Neurochem Res.* 27: 59-65.
- † **Pasantes-Morales H**, García JJ & Sánchez Olea R. **1991**. Hyposmolarity-sensitive release of taurine and free amino acids from human lymphocytes. *Biochem Pharmacol.* 41: 303-307.
- † **Pasantes-Morales H**, Morán J & Schousboe A. **1990**. Taurine release associated to cell swelling in the nervous system. *Prog Clin Biol Res.* 351: 369-376.
- † **Pasantes-Morales H**, Murray RA, Sánchez-Olea R & Morán J. **1994**. Regulatory volume decrease in cultured astrocytes. II. Permeability pathway to amino acids and polyols. *Am J Physiol.* 266: C172-C178.
- † **Pasantes-Morales H**, Ochoa-de la Paz LD, Sepulveda J & Quesada O. **1999**. Amino acids as osmolytes in the retina. *Neurochem Res.* 24: 1339-1346.
- † **Pasantes-Morales H**. **1996**. Volume regulation in brain cells: cellular and molecular mechanisms. *Metab Brain Dis.* 1996 Sep;11(3):187-204.
- † **Paulmichl M**, Li Y, Wickman K, Ackerman M, Peralta E & Clapham D. **1992**. New mammalian chloride channel identified by expression cloning. *Nature* 356: 238-241.

- † **Pellegrini-Giampietro DE**, Cherici G, Alesiani M, Carla V & Moroni F. **1988.** Excitatory amino acid release from rat hippocampal slices as a consequence of free-radical formation. *J Neurochem.* 51: 1960-1963.
- † **Pellegrini-Giampietro DE**, Cherici G, Alesiani M, Carlá V & Moroni F. **1990.** Excitatory amino acid release and free radical formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced neuronal damage. *J Neurosci.* 10: 1035-1041.
- † **Pokhrel PK** & Lau-Cam CA. **2000.** Protection by taurine and structurally related sulfur-containing compounds against erythrocyte membrane damage by hydrogen peroxide. *Adv Exp Med Biol.* 483: 411-429.
- † **Rhee SG.** **1999.** Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. *Exp Mol Med.* 31: 53-9.
- † **Rodrigo J**, Fernandez AP, Serrano J, Peinado MA, Martinez A. **2005.** The role of free radicals in cerebral hypoxia and ischemia. *Free Radic Biol Med.* 39: 26-50.
- † **Rohn TT**, Hinds TR, & Vincenzi FF. **1993.** Ion transport ATPases as targets for free radical damage. *Biochem Pharmacol.* 46: 525-534.
- † **Rosen AS** & Andrew RD. **1990.** Osmotic effects upon excitability in rat neocortical slices. *Neurosci.* 38: 579-590.
- † **Roy G** & Malo C. **1992.** Activation of amino acid diffusion by a volume increase in cultured kidney (MDCK) cells. *J Membr Biol.* 130: 83-90.
- † **Roy G** & Sauvé R. **1987.** Effect of anisotonic media on volume, ion and amino-acid content and membrane potential of kidney cells (MDCK) in culture. *J Memb Biol.* 106: 83-96.
- † **Sánchez-Olea R** & Pasantes-Morales H. **1993.** El control del volumen: una propiedad fundamental para la supervivencia de las células animales. *Ciencia* 44: 473-485.
- † **Sánchez-Olea R**, Morales M, Garcia O & Pasantes-Morales H. **1996.** Cl⁻ channel blockers inhibit the volume-activated efflux of Cl⁻ and taurine in cultured neurons. *Am J Physiol.* 270: C1703-1708.
- † **Sánchez-Olea R**, Morán J & Pasantes-Morales H. **1992.** Changes in taurine transport evoked by hyperosmolarity in cultured astrocytes. *J Neurosci Res.* 32: 86-92.
- † **Sánchez-Olea R**, Moran J, Schousboe A & Pasantes-Morales H. **1991.** Hyposmolarity-activated fluxes of taurine in astrocytes are mediated by diffusion. *Neurosci Lett.* 13: 233-236.
- † **Saransaari P** & Oja SS. **1997.** Enhanced taurine release in cell-damaging conditions in the developing and ageing mouse hippocampus. *Neuroscience.* 79: 847-854.

- † **Saransaari P & Oja SS. 2000.** Involvement of metabotropic glutamate receptors in ischemia-induced taurine release in the developing and adult hippocampus. *Neurochem Res.* 25(8): 1067-1072.
- † **Saransaari P. & Oja SS. 1998.** Release of endogenous glutamate, aspartate, GABA, and taurine from hippocampal slices from adult and developing mice under cell-damaging conditions. *Neuroche Res.* 23: 563-570.
- † **Sarkadi B & Parker JC. 1991.** Activation of ion transport pathways by changes in cell volume. *Biochem Biophys Acta.* 1071: 407-427.
- † **Schmidt SY, Berson EL & Hayes KC. 1976.** Retinal degeneration in cats fed casein. I. Taurine deficiency. *Invest Ophthalmol.* 15: 47-52.
- † **Schousboe A & Pasantes-Morales H. 1992.** Role of taurine in neural cell volume regulation. *Can J Physiol Pharmacol.* 70: S356-S361.
- † **Schousboe A, Morán J, Pasantes-Morales H. 1990.** Potassium-stimulated release of taurine from cultured cerebellar granule neurons is associated with cell swelling. *J Neurosci Res.* 27: 71-77.
- † **Schousboe A, Sánchez-Olea R, Morán J & Pasantes-Morales H. 1991.** Hyposmolarity-induced taurine release in cerebellar granule cells is associated with diffusion and not with high-affinity transport. *J Neurosci Res.* 30: 661-665.
- † **Schuller-Levis GB & Park E. 2003.** Taurine: new implications for an old amino acid. *FEMS Microbiol Lett.* 226: 195-202.
- † **Sener G, Ozer Sehirlı A, İpci Y, Cetinel S, Cikler E, Gedik N & Alican I. 2005.** Taurine treatment protects against chronic nicotine-induced oxidative changes. *Fundam Clin Pharmacol.* 19: 155-164.
- † **Siebens AW & Kregenow FM. 1985.** Volume-regulatory responses of *Amphiuma* red cells in anisotonic media. The effect of amiloride. *J Gen Physiol.* 86: 527-564.
- † **Sinning R, Schliess F, Kubitz R & Haussinger D. 1997.** Osmosignalling in C6 glioma cells. *FEBS Lett.* 400: 163-167.
- † **Sivilotti L & Nistri A. 1991.** GABA receptor mechanisms in the central nervous system. *Prog Neurobiol;* 36: 35-92.
- † **Small DL, P. Morley P & Buchan AM. 1999.** Biology of ischemic cerebral cell death. *Prog Cardiovasc Dis.* 42: 185-207.
- † **Smith LH & Pierce SK. 1987.** Cell volume regulation by molluscan erythrocytes during hypoosmotic stress: Ca²⁺ effects on ionic and organic osmolyte effluxes. *Biol Bull.* 173: 407-418.
- † **Sterns RH, Baer J, Ebersol S, Thomas D, Lohr JW & Kamm DE. 1993.** Organic osmolytes in acute hyponatremia. *Am J Physiol.* 264: F833-F836.

- † **Strange K, Emma F & Jackson PS. 1996.** Cellular and molecular physiology of volume-sensitive anion channels. *Am J Physiol.* 270: C711-C730.
- † **Suzuki YJ & Ford GD. 1999.** Redox regulation of signal transduction in cardiac and smooth muscle. *J Mol Cell Cardiol.* 31: 345-353.
- † **Taylor CP & Dudek FE. 1982.** Synchronous neural afterdischarges in rat hippocampal slices without active chemical synapses. *Science.* 218: 810-812.
- † **Thinnes FP, Hellmann KP, Hellman T, Merker R, Brockhaus-Pruchniewicz U, Schwarzer C, Walter G, Gotz H, & Hilschmann N. 2000a.** Studies on human porin XXII: cell membrane integrated human porin channels are involved in regulatory volume decrease (RVD) of HeLa cells. *Mol Genet Metab.* 69: 331-337.
- † **Thinnes FP, Hellmann KP, Hellman T, Merker R, Schwarzer C, Walter G, Gotz H, y Hilschmann N. 2000b.** Studies on human porin XXII: gadolinium opens up cell membrane standign porin channels making way for the osmolytes chloride or taurine. A putative approach to activate the alternate chloride channel in cystic fibrosis. *Mol Genet Metab.* 69: 240-251.
- † **Todea V. 1994.** The mechanisms and mediators of ocular inflammation. *Oftalmologia.* 38: 196-200.
- † **Tsacopoulos M, Poitry-Yamate CL, MacLeish PR. & Poitry S. 1998.** Traficking of molecules and metabolic signals in the retina. En: *Progress in Retinal and Eye Research.* Vol 17. Edited by Osborne NN & Chader GJ. Elsevier Science Ltd.
- † **Valverde MA, Diaz M, Sepulveda FV, Gill DR, Hyde SC & Higgins CF. 1992.** Volume - regulated chloride channels associated with the human multidrug-resistance P-glycoprotein. *Nature* 355: 380-383.
- † **Varela D, Simon F, Riveros A, Jorgensen F & Stutzin A. 2004.** NAD(P)H oxigenase-deriver H₂O₂ signals chloride channel activation in cell volume regulation and cell proliferation. *J Biol Chem.* 279: 13301-13304.
- † **Verbalis JG & Gullans SR. 1991.** Hyponatremia causes large sustained reductions in brain content of multiple organic osmolytes in rats. *Brain Res.* 567: 274-282.
- † **Verdejo C, Marco P, Pinazo-Durán MD, Portoles M & González Tomás J. 1997.** Determinación de la actividad lipoperoxidativa en la vitreorretinopatía proliferante y en las retinopatías vasculares. *Arch Soc Esp Oftalmol.* 72: 545-552.
- † **Vériac S, Tissie G & Bonne C. 1993.** Oxygen free radicals adversely affect the regulation of vascular tone by nitric oxide in the rabbit retina under high intraocular pressure. *Exp Eye Res.* 56: 85-88.
- † **Wegmann K. 1986.** Osmoregulation in eukariotic algae. *FEMS Microbiol Rev.* 39: 37-43.

- † **Weng TX**, Godley BF, Jin GF, Mangini NJ, Kennedy BG, Yu ASL & Wills NK. **2002.** Oxidant and antioxidant modulation of chloride channels expressed in human retinal pigment epithelium. *Am J Physiol Cell Physiol.* 283: C839-C849.
- † **Winkler BS**, Boulton ME, Gottsch JD & Sternberg P. **1999.** Oxidative damage and age-related macular degeneration. *Molecular Vision.* 5: 32.
- † **Wirthensihn G**, Beck FX & Guder WG. **1987.** Role and regulation of glycerophosphorylcholine in rat renal papilla. *Pflugers Arch.* 1987. 409: 411-415.
- † **Wright CE**, Talan HH, Lin YY & Gaull GE. **1986.** Taurine: biological update. *Annu Rev Biochem.* 55: 427-453.
- † **Yan CC** & Huxtable RJ. **1998.** Effect of taurine and guanidinoethane sulfonate on glutathione metabolism in the rat. *Adv Exp Med Biol.* 442: 33-39.
- † **Zhang H**, Agardh E & Agardh CD. **1991.** Hydrogen peroxide production in ischaemic retina: influence of hyperglycaemia and postischaemic oxygen tension. *Diabetes Res.* 16: 29-35.
- † **Zuckerman R** & Welter JJ. **1982.** Oxygen transport in the bullfrog retina. *Exp Eyes Res.* 30: 117-123.