



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN  
TROMBINA-GLUTAMATO EN EL EDEMA NEURONAL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :

B I Ó L O G A

P R E S E N T A :

MARTHA PÉREZ DOMÍNGUEZ

DIRECTORA DE TESIS:

BIÓL. ERIKA VÁZQUEZ JUÁREZ



2011



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

1. Datos de la Alumna

Pérez  
Domínguez  
Martha  
5622 5608  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
3-0309183-7

2. Datos del Tutor

Biól.  
Erika  
Vázquez  
Juárez

3. Datos del Sinodal 1

Dra.  
Herminia  
Pasantés  
Ordoñez

4. Datos del Sinodal 2

Dr.  
René de Jesús  
Cárdenas  
Vázquez

5. Datos del Sinodal 3

M. en IBB.  
Alette  
Ortega  
Gómez

6. Datos del Sinodal 4

M. en C.  
Bertha  
Molina  
Álvarez

7. Datos del trabajo escrito

Estudio de la interacción  
trombina-glutamato en el edema neuronal  
50 p  
2011

## **AGRADECIMIENTOS**

*A la Dra. Herminia Pasantes por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por todo su apoyo y por otorgarme una beca como Ayudante de Investigador Nacional Emérito SNI-CONACyT.*

*A la Biól. Erika Vázquez, quien dirigió mi tesis con una enorme paciencia e incomparable apoyo, no sé como agradecerle... ¡te debo un riñón!*

*A mis sinodales el Dr. René de Jesús Cárdenas, a la ahora Dra. Alette Ortega y a la M. en C. Bertha Molina por su tiempo y valiosas sugerencias para mejorar mi trabajo.*

*A mis papás, Irma y Carlos, a mi hermana Lilia por el mejor acompañamiento de todos estos años, por su incondicional apoyo, porque lo que soy ahora no lo hubiera logrado sin ustedes ¡no saben cuanto los quiero!*

*A mis tíos Sergio, Lulú, Héctor y Rosa; a los primos piratas Gisela, Iván, Daniel, Jessica y Areli; a mis abuelitos Martha y Agustín; y a mi cuñis Aldo por mostrarme todo su cariño (desde donde quiera que estén).*

*A Mary Carmen y Anita porque estar con ustedes estos seis años ha sido una experiencia sin igual.*

*A mis compañeros del laboratorio BL-301, el Dr. Gerardo Ramos, Reyna, Adriana, Aáron, Alejandro, Alejandra, Silvia y Erika, por su agradable compañía, desde la taza de café matutina hasta las caminatas nocturnas hacia Copilco y por darme ánimos para terminar la palabra prohibida con T; a la técnico de laboratorio Claudia Peña porque, entre tantas otras cosas, me enseñó a hacer cultivos primarios y a Rosita por su invaluable ayuda. No encontré mejores palabras que las de Alejandra: gracias a todos ustedes por enseñarme tanto sin darse cuenta.*

*A mis amigos: Itzi además de la amistad de estos años debo agradecerle el que me hubieras acercado a la biología ¿qué hubiera hecho sin ti?, a Claudia y Vero por estar ahí y escuchar mis conflictos existenciales, a Víctor, Alejandro, Gerardo, Nallely, José, Rubén, Areli, Luis, Pablo, Jesús, Eréndira, Pavel, Ramiro, Diana y Alejandra (H. cuadro de la Facultad de Ciencias) por innumerables experiencias (aun guardo la esperanza de irme de viaje con ustedes): las cenas en la cafe, las prácticas de campo, los trabajos en equipo, desvelos, borracheras, reuniones, cumpleaños, risas y lágrimas, ¡lo logré! ustedes lo hicieron todo más fácil.*

## ÍNDICE

	Pág.
<b>RESUMEN</b> .....	5
<b>ABREVIATURAS</b> .....	6
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	
1.1. Volumen celular.....	7
1.2. Variaciones en el volumen celular.....	7
1.3. Decremento Regulador de Volumen.....	8
1.3.1. Sensor de volumen.....	9
1.3.2. Osmotransducción.....	10
1.3.3. Vías de movilización de osmolitos.....	11
1.4. GPCRs y DRV.....	14
1.4.1. Trombina.....	16
1.5. Hiponatremia e isquemia como condiciones de hinchamiento celular	
1.5.1. Hiponatremia.....	19
1.5.2. Isquemia.....	20
<b>2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	24
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	25
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	26
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	27
<b>6. MÉTODOS</b>	
6.1. Modelo de estudio.....	28
6.2. Cultivo celular.....	28
6.3. Soluciones y fármacos.....	29
6.4. Experimentos de liberación de aminoácidos.....	31
6.5. Análisis estadístico.....	31
<b>7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	
7.1. Edema hiposmótico.....	33
7.2. Edema isosmótico.....	40
<b>8. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS</b> .....	47
<b>REFERENCIAS</b> .....	48

## RESUMEN

En respuesta al edema celular se liberan osmolitos y agua osmóticamente obligada con la consecuente recuperación del volumen celular; sin embargo, la liberación de osmolitos como  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$  y aminoácidos neuroactivos altera la excitabilidad neuronal. Evidencia reciente indica que la liberación de osmolitos dependiente de volumen puede ser incrementada significativamente por la activación de ciertos receptores acoplados a proteínas G, mediante eventos dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ . La trombina genera una gran variedad de respuestas a través de la señalización de los receptores activados por proteasas que pertenecen a la superfamilia de GPCRs. La trombina, en patologías en las que coincidan edema celular cerebral y la pérdida de la selectividad de la barrera hematoencefálica, podría activar de manera anormal a los receptores PAR y promover una mayor liberación de aminoácidos excitadores en respuesta al edema neuronal.

Esto se investigó en el presente trabajo en cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo de rata bajo dos condiciones de edema, el hiposmótico 30% (H30) por reducción de NaCl y el de isquemia química por inhibición glicolítica y respiratoria. La condición H30 induce una liberación neta de  $^3\text{H-D-Aspartato}$  (trazador de glutamato) dependiente de volumen de 2.1% y la condición de isquemia química de 13.1%. La adición de trombina al estímulo tiene un efecto potenciador sobre la liberación de 3.7 veces en H30 y de 1.4 veces en isquemia química. El efecto potenciador de trombina sobre la liberación de  $^3\text{H-D-Aspartato}$ , en ambas condiciones, depende de la previa activación de la vía sensible a volumen, inhibida con DCPIB; de su actividad proteolítica, prevenida por PPACK y de un aumento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Bajo la condición H30 el péptido sintético agonista específico de PAR-1, TFLLR-NH<sub>2</sub>, mimetizó la acción de la trombina, respuesta que no se reprodujo en la condición de isquemia química. Además en esta última condición la liberación ocurrió principalmente por la actividad reversa del transportador de glutamato, sensible a DL-TBOA.

## ABREVIATURAS

- ANOVA** - Análisis de Varianza  
**ATP** – Trifosfato de Adenosina  
**BAPTA** – Ácido 1,2-bis (2-aminofenoxi) etano-N, N, N', N'-tetra-acético.  
**BAPTA-AM** – Ácido 1,2 - Bis (2-aminofenoxi) etano - N, N, N', N' – tetra-acético tetrakis (acetoximetil éster)  
**DAG** - Diacilglicerol  
**DCPIB** - Ácido 4-[(2-butyl-6,7-dicloro-2-ciclopentil-1-oxo-3H-inden-5-yl) oxi] butanoico  
**DL-TBOA** - DL-Treo-Beta-Benziloxiaspartato  
**DRV** - Decremento Regulador de Volumen  
**GPCR**- Receptor Acoplado a Proteínas G  
**GTP** – Trifosfato de Guanosina  
**HEPES** – Ácido 4-(2-Hidroxietil) piperazina-1-etanosulfónico  
**H30** - Solución Hiposmótica 30%  
**HT** - Solución Hiposmótica 30% con 5U/ml de trombina  
**IoA** - Iodoacetato  
**IP<sub>3</sub>** - Inositol 1, 4, 5 trifosfato  
**Isq** - Isquemia química  
**IT** – Isquemia química con 5U/ml de trombina  
**NaN<sub>3</sub>** - Azida de sodio  
**NGC** - Neuronas Granulares de Cerebelo  
**NMDA** - N-Metil-D-Aspartato  
**PAR** - Receptor Activado por Proteasas  
**PIP<sub>2</sub>** - Fosfatidilinositol 4, 5-bifosfato  
**PKC** – Proteína Cinasa C  
**PLC<sub>β</sub>** - Isoforma β de la Fosfolipasa C  
**PPACK** - Fenilalanil-Prolil-Arginina-Clorometil Cetona  
**RTK** – Receptor con actividad de Cinasa de Tirosinas  
**TFLLR-NH<sub>2</sub>** H-Thr-Phe-Leu-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>  
**TRP** – Receptor a Potenciales Transitorios  
**[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>** - Concentración de calcio intracelular  
**VRAC** – Canal Aniónico Regulado por Volumen

## 1. INTRODUCCIÓN

---

### **1.1 Volumen Celular**

Las células animales han conservado, como rasgo fundamental a través de la evolución, la capacidad de responder a los cambios en volumen mediante mecanismos adaptativos que le permiten recuperar su volumen original. La preservación de un volumen constante es parte de la homeostasis celular, ya que mantiene la citoarquitectura y la correcta concentración de moléculas de señalización en el citosol, ambas características son de importancia clave para el funcionamiento y comunicación celular. Pequeños cambios en el contenido de agua en la célula y la variación en la cantidad de moléculas solubles que participan como señales, modifican la interacción espacial de enzimas, sustratos, iones y cofactores perturbando la compleja red de señalización bajo la que opera el metabolismo (Pasantés-Morales *et al.*, 2006).

Debido a que las células animales tienen una proporción muy alta de agua, su volumen está directamente relacionado con su movilización a través de la membrana celular. Los movimientos de agua ocurren de acuerdo a su potencial químico que está en función de la concentración de solutos a ambos lados de la membrana. De esta manera, en ausencia de un cambio significativo en la presión hidrostática, el agua se movilizará en respuesta a la generación de un gradiente osmótico, es decir, por cambios en la concentración de osmolitos en los compartimientos intra y extracelular (Pasantés-Morales *et al.*, 2010).

### **1.2 Variaciones en el volumen celular**

El volumen total de una célula se mantiene constante en condiciones fisiológicas principalmente por el equilibrio de los distintos sistemas de transporte de iones y solutos orgánicos a través de la membrana celular. No obstante, dicha condición se encuentra continuamente comprometida por la generación de microgradientes osmóticos locales y transitorios asociados a funciones celulares

como la entrada de nutrientes, la exocitosis de productos celulares, la remodelación del citoesqueleto y matriz extracelular, la síntesis o degradación de macromoléculas, la transmisión sináptica, entre otros (Pasantes-Morales *et al.*, 2006; Hoffmann *et al.*, 2009).

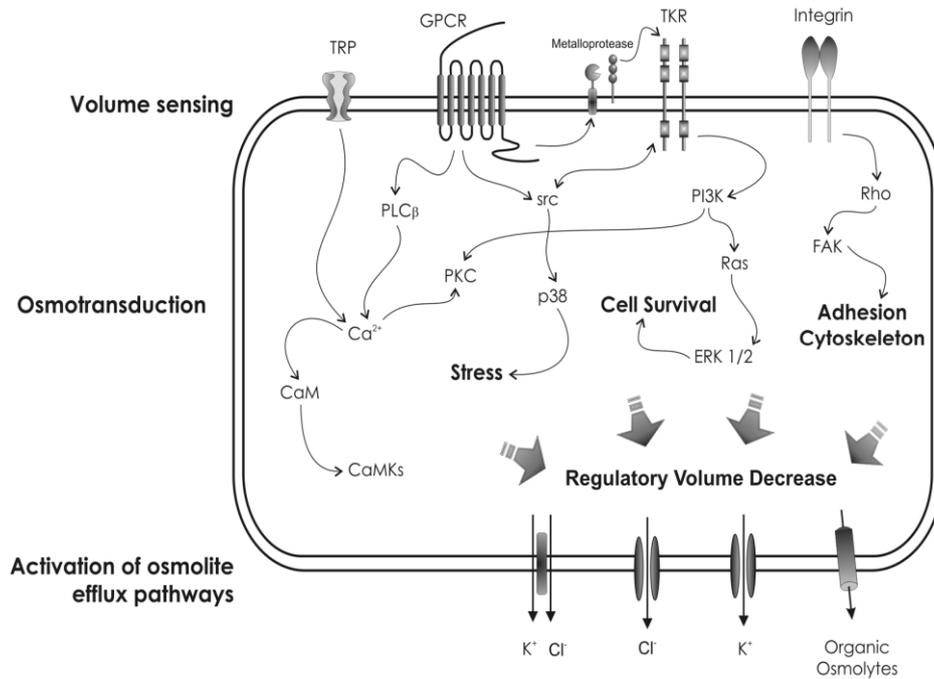
Los cambios significativos en el volumen celular son observados bajo condiciones patológicas (Fisher *et al.*, 2008). La palabra edema significa hinchazón, el término edema celular hace referencia al hinchamiento por acumulación de agua en la célula. El edema cerebral ha sido clasificado como vasogénico, cuando es causado por la disrupción de la barrera hematoencefálica, o citotóxico cuando resulta de una condición patológica sin la disrupción de la barrera hematoencefálica. En la mayoría de las patologías un tipo de edema gradualmente resulta en el desarrollo del otro tipo (Pasantes-Morales *et al.*, 2010).

El incremento en el volumen celular es particularmente grave en el cerebro, en donde la restricción que impone el cráneo a la expansión tisular trae como consecuencia la ruptura de vasos, anoxia e isquemia. En condiciones extremas, cuando el incremento en volumen es rápido y muy severo, ocurre el herniamiento del cerebro, que al hacer presión sobre los circuitos neuronales de control respiratorio y cardíaco del tallo cerebral, genera el riesgo inminente de muerte (Pasantes-Morales *et al.*, 2006).

### **1.3 Decremento Regulador de Volumen**

La normalización del volumen celular ocurre a través de la pérdida de osmolitos acompañados de agua osmóticamente obligada que restablece el equilibrio osmótico (Pasantes-Morales *et al.*, 2006; Fisher *et al.*, 2008). El Decremento Regulador de Volumen (DRV) es la suma de las múltiples respuestas concomitantes a la recuperación del volumen original de una célula que fue expuesta a condiciones de aumento en volumen. Dicha respuesta requiere un mecanismo sensor que detecte el cambio en volumen, una cascada de

transducción, que organice y active la salida de solutos intracelulares que ajusten el contenido de agua con la consecuente corrección del volumen celular y una “memoria” del volumen celular original que inactive el proceso de regulación de volumen (Pasantes-Morales *et al.*, 2006) (Fig. 1.1).



**Fig. 1.1.** Esquema representativo del DRV (Vázquez-Juárez *et al.*, 2008a).

*Sensor de volumen.* La célula percibe el incremento en volumen mediante un mecanismo sensor que a su vez debe guardar memoria del volumen original de la célula, lo que le permite desactivar los mecanismos de regulación. El mecanismo sensor no ha sido identificado, ni se ha determinado si participa un tipo o una variedad de moléculas. Entre los candidatos propuestos se incluyen moléculas transmembranales que podrían percibir cambios en el ambiente extracelular y a su vez transducir la señal al medio intracelular. Los receptores con actividad de cinasa de tirosinas (RTKs) son sitios de convergencia de una gran variedad de vías de señalización que al final regulan la expresión y actividad de numerosas funciones celulares. Los canales receptores a potenciales transitorios (TRP) como el TRPV4, son canales catiónicos no selectivos sensibles a osmolaridad y a estiramiento de la membrana. Las

integrinas son moléculas de adhesión célula-matriz extracelular que interactúan a nivel intracelular con elementos del citoesqueleto, activan señales de alerta que participan en el control del transporte de iones, en la regulación del volumen, así como en el transporte vesicular. También se han considerado como posibles sensores de volumen señales como cambios en la concentración intracelular de calcio  $[Ca^{2+}]_i$ , variaciones en el agrupamiento macromolecular por dilución del citoplasma, cambios en el citoesqueleto o la disminución en la fuerza iónica (Pasantes-Morales *et al.*, 2006).

*Osmotransducción.* Es la fase del DRV en la que se activan una variedad de vías de señalización tendientes a permitir la adaptación de la célula a la nueva condición. El cambio en volumen es un fenómeno complejo que implica modificaciones en un gran número de funciones celulares y no sólo las que están directamente relacionadas con la recuperación del volumen. Entre otras respuestas celulares que se activan durante el DRV, se encuentran las que están encaminadas a la remodelación de la membrana, reorganización del citoesqueleto y reacciones de adhesión vinculadas al cambio físico que experimenta la célula, el cambio en volumen y su recuperación; éstas permiten a la célula adaptarse rápidamente sin rupturas o deformaciones mayores que interfieran con la integridad de la membrana. Además, durante el hinchamiento y la subsecuente recuperación del volumen, se presenta la activación de proteínas de estrés y elementos de vías de supervivencia de la célula, entre otras (Vázquez-Juárez *et al.*, 2008a).

Después de que la célula ha percibido el cambio en volumen se amplifica dicha señal mediante una cascada de transducción que conecta la señal con los efectores. Entre los segundos mensajeros que se han postulado como participantes de esta etapa se encuentran el  $Ca^{2+}$  y proteínas con actividad cinasa. El aumento en la  $[Ca^{2+}]_i$  es una respuesta celular consistente a hiposmolaridad; sin embargo, su contribución al DRV parece depender del tipo

celular. También se ha reportado que varias cinasas como proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), ERK1/2 y p38; la cinasa de adhesión focal (FAK), miembros de la familia de Src y receptores a factores de crecimiento son activadas en respuesta a hiposmolaridad (Pasantés-Morales *et al.*, 2006).

*Vías de movilización de osmolitos.* El desplazamiento de agua y la restauración del equilibrio osmótico con la condición a la que quedó expuesta la célula se logra mediante la movilización de osmolitos del interior de la célula al espacio extracelular. En principio todos los solutos libres en el citosol participan, pero los que adquieren una contribución sustancial son los que están en altas concentraciones. Los osmolitos en células animales son los electrolitos presentes en altos niveles en los fluidos intracelulares, por ejemplo  $K^+$ ,  $Cl^-$  y pequeñas moléculas orgánicas de estructura heterogénea: aminoácidos, polialcoholes y aminas.

Los iones  $K^+$  y  $Cl^-$  permean principalmente por canales separados pero interdependientes. El canal de  $Cl^-$  sensible a volumen ( $Cl^-_{vol}$ ), a través del cuál sale este anión en respuesta al hinchamiento celular, ha sido caracterizado en numerosos tipos celulares y muestra características electrofisiológicas, biofísicas y farmacológicas similares. Se trata de un canal con rectificación saliente, con una conductancia unitaria intermedia de 40-78 pS y muestra una inactivación dependiente de voltaje  $\geq +60$  mV. Exhibe una alta selectividad por los aniones sobre los cationes, específicamente aniones monovalentes. Su secuencia de permeabilidad  $SNC^- > I^- > NO_3^- > Br^- > Cl^- > F^- > gluconato^1$ ; corresponde a una secuencia Eisenman I. El  $Cl^-_{vol}$  es independiente de  $Ca^{2+}$ , su activación requiere de ATP más no de su hidrólisis y de su concentración intracelular. Es sensible a los bloqueadores generales de canales de  $Cl^-$  tales como DIDS, SITS, 9-AC, NPPB,

---

<sup>1</sup> Tiocianato > yoduro > nitrato > bromuro > cloruro > fluoruro > gluconato

DDF<sup>2</sup>, ácido niflúmico y ácido flufenámico. El ácido araquidónico y otros ácidos grasos poli-insaturados también bloquean la función del Cl<sup>-</sup><sub>vol</sub>. Actualmente se utiliza al DCPIB como inhibidor específico del Cl<sup>-</sup><sub>vol</sub> porque no afecta a otros canales de Cl<sup>-</sup> (Decher *et al.*, 2001). A pesar de su distribución ubicua, la identidad molecular de Cl<sup>-</sup><sub>vol</sub> se desconoce, aunque se han clonado y caracterizado numerosos tipos de canales de Cl<sup>-</sup> y que algunos muestran activación por hinchamiento, ninguno de ellos reúne las propiedades típicas del Cl<sup>-</sup><sub>vol</sub> (Pasantés-Morales *et al.*, 2006).

En contraste con el Cl<sup>-</sup><sub>vol</sub>, que presenta características similares en los diferentes tipos celulares sugiriendo que participa un solo tipo de canal en el DRV, las observaciones indican que el K<sup>+</sup> que se moviliza en respuesta al incremento en volumen celular lo hace a través de diversos tipos de canales involucrados en otras funciones celulares, pero que se activan en respuesta a señales consecuentes al hinchamiento como pueden ser un aumento en [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. El incremento en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> es una respuesta consistente a hiposmolaridad y principalmente en células de tipo epitelial, esta elevación en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> activa a los canales de K<sup>+</sup> dependientes de Ca<sup>2+</sup> (KB), estos canales muestran conductancia unitaria grande (100-200 pS), sensibilidad al TEA<sup>3</sup>, caribdotoxina e iberotoxina. Muchas células como neuronas, astrocitos y otros tipos celulares regulan su volumen independientemente al incremento en [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> como señal acopladora; en estas células, el K<sup>+</sup> se moviliza por la apertura de canales activados por voltaje (Kv), estos canales son rectificadores salientes, se bloquean por TEA, moxiustoxina, argiotoxina y dendrotoxinas. Los canales de K<sup>+</sup> activados por hiposmolaridad o aumento en volumen (K<sup>+</sup><sub>vol</sub>) presentan una conductancia unitaria intermedia, son independientes a Ca<sup>2+</sup> y voltaje,

---

<sup>2</sup> **DIDS**=Ácido 4'4diisotiocianatostilbeno-2,2' disulfónico; **SITS**=Ácido 4-acetamido-4'isotiocianatostilbeno-2,2' disulfónico; **9-AC**= Ácido 9-antraceno-carboxílico; **NPPB**=Ácido 5-nitro-2-(3-fenilprolilamino) benzoico; **DDF**= 1,9-dideoxi-forskolin

<sup>3</sup> **TEA** Tetraetilamonio

insensible a los inhibidores clásicos de canales de  $K^+$  pero que pueden ser inhibido por clofilio. Los canales de  $K^+$  activados por estiramiento son insensibles a bloqueadores típicos pero son inhibidos por gadolinio y quinidina (Pasantes-Morales *et al.*, 2006).

Los osmolitos orgánicos que participan en la regulación de volumen celular forman parte de un grupo heterogéneo de moléculas pequeñas que incluye a los aminoácidos de mayor concentración intracelular (taurina, glutamato, glutamina, glicina y alanina), polialcoholes (sorbitol y mio-inositol), metilaminas (glicerofosforilcolina y betaína) y otros compuestos como fosfoetanolamina, creatinina, fosfocreatinina y N-acetil-aspartato. En la mayoría de las especies los osmolitos orgánicos que están presentes en mayor concentración en el cerebro son glutamato, mio-inositol, creatina, taurina y N-acetil-aspartato, agrupando cerca del 80% del total de la poza de osmolitos orgánicos (Pasantes-Morales *et al.*, 2010). Aunque la pérdida de  $Cl^-$  y  $K^+$  contribuye de manera significativa al DRV, la reducción en la concentración intracelular de estos iones puede alterar la excitabilidad neuronal (Fisher *et al.*, 2008). Los osmolitos orgánicos contribuyen a una recuperación del volumen celular de aproximadamente 30-35%. En el sistema nervioso central los aminoácidos como glutamato, GABA y glicina tienen un doble papel, como osmolitos y como neurotransmisores, por lo cual su traslocación puede alterar la excitabilidad neuronal y la transmisión sináptica (Pasantes-Morales *et al.*, 2010).

La vía de permeabilidad de los osmolitos orgánicos sensible a volumen se desconoce molecularmente y se le ha denominado Canal Aniónico Regulado por Volumen (VRAC). Con base en la sensibilidad farmacológica se ha propuesto una vía común para el  $Cl^-$  y los osmolitos orgánicos, ya que la liberación de estos osmoefectores se inhibe en presencia de bloqueadores de canales de  $Cl^-$  tales como el DIDS, NPPB y DCPIB (Pasantes-Morales *et al.*, 2006); sin embargo, esta propuesta permanece en discusión.

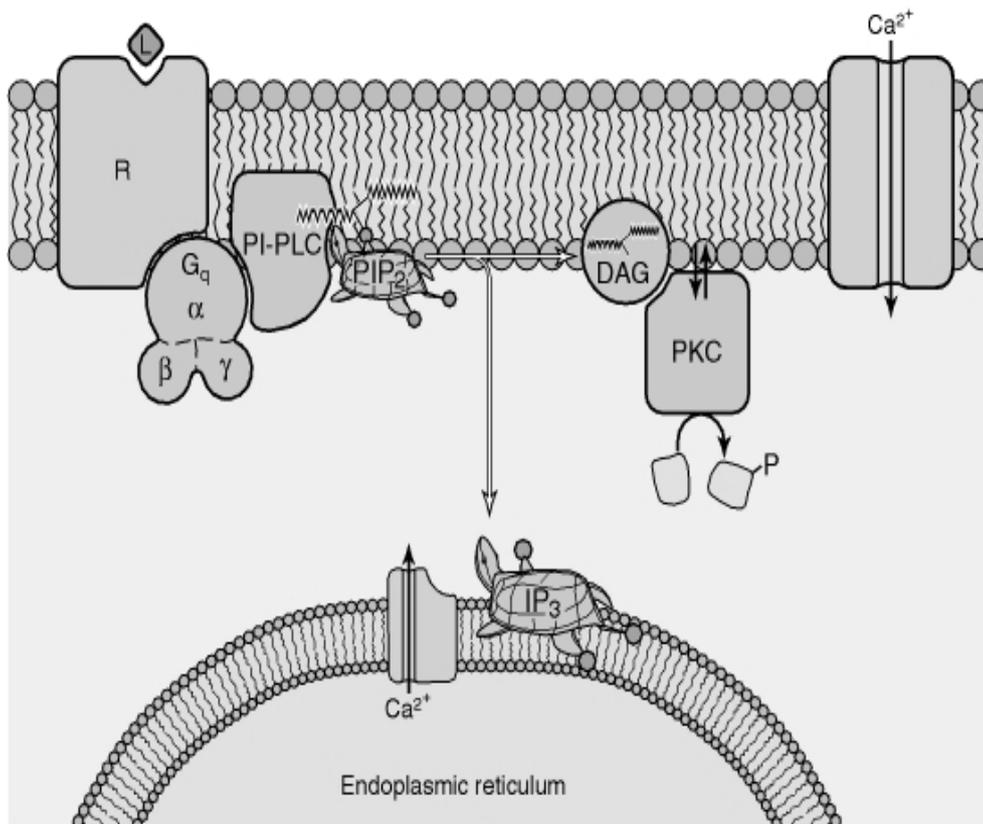
La taurina es un aminoácido azufrado que se encuentra en concentraciones muy elevadas en un gran número de tipos celulares, se halla esencialmente soluble en el citosol, a pH fisiológico se encuentra como zwitterión o ión dipolar, no forma parte estructural de las proteínas, participa en pocas reacciones metabólicas como la conjugación de ácidos biliares (ácido taurocólico), es un elemento terminal en el catabolismo de la cisteína y metionina, lo que le confiere un costo de producción notablemente bajo. Estas propiedades le confieren a la taurina ventajas únicas como osmolito que permiten considerarla como representante de los osmolitos orgánicos u osmolito ideal al desplazarse dentro y fuera de la célula sin alterar el metabolismo celular. La activación de la salida de taurina se observa frente a cambios muy pequeños en osmolaridad, la liberación de taurina se incrementa proporcionalmente con la reducción de la osmolaridad del medio extracelular que a su vez esta en relación con el incremento en volumen de la célula (Tuz *et al.*, 2001); resultando en una alta eficiencia en comparación con otros aminoácidos que participan en otras funciones como la neurotransmisión.

#### **1.4 GPCRs y DRV**

La activación de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) inicia una gran variedad de vías de señalización intracelular que influyen en diversas respuestas celulares, dentro de dichas respuestas hay evidencia que indica que la liberación de osmolitos dependiente de volumen puede ser incrementada significativamente por la activación de GPCRs (Fisher *et al.*, 2008; Vázquez-Juárez *et al.*, 2008a).

De manera clásica la activación de los GPCRs, receptores de siete dominios transmembranales, resulta de la unión de un ligando específico que induce un cambio conformacional en la estructura del receptor que le permite activar a las proteínas G heterotriméricas, compuestas por las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . Al activarse las proteínas G por la unión de GTP, las unidades se disocian en

$\alpha$  y el dímero  $\beta\gamma$ ; la subunidad  $\alpha$  tiene cuatro subtipos, de los cuales  $G\alpha_q$  activa la enzima Fosfolipasa C ( $PLC_\beta$ ) que cataliza la producción de los segundos mensajeros inositol 1, 4, 5 trifosfato ( $IP_3$ ) y diacilglicerol (DAG), mediante la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-bifosfato ( $PIP_2$ ) en la membrana plasmática. El  $IP_3$  se une a un canal específico ubicado en el retículo endoplásmico que interviene en la liberación de  $Ca^{2+}$  hacia el citoplasma celular. El DAG y  $Ca^{2+}$  por su parte activan a la proteína cinasa C (PKC) (Fig. 1.2).



**Fig. 1.2.** Relación entre la activación de un GPCR, la hidrólisis de fosfoinosítidos, la señalización de  $Ca^{2+}$  y la activación de la PKC (Basic Neurochemistry, 6ª edición).

El aumento en la  $[Ca^{2+}]_i$  es una de las respuestas más consistentes inducida por hiposmolaridad; esta respuesta se presenta en la mayoría de los tipos celulares aún cuando el proceso de regulación de volumen en algunos casos ocurre de manera independiente a este incremento, como sucede en neuronas y astrocitos. Sin embargo, se ha observado que cuando se aumenta la  $[Ca^{2+}]_i$  por encima del nivel inducido por la hiposmolaridad se magnifica la

respuesta de liberación de osmolitos del DRV, así como su eficiencia. Este efecto se ha visto empleando un inductor no fisiológico como el ionóforo ionomicina o A23187 (Cardin *et al.*, 2003) o por una condición fisiológica como la estimulación de un GPCR (Ramos-Mandujano *et al.*, 2007; Vázquez-Juárez *et al.*, 2008b).

La potenciación en la liberación de osmolitos dependiente de volumen ha sido observada en respuesta a distintas clases de neuropéptidos (vasopresina, endotelina u oxitocina), agonistas colinérgicos o adrenérgicos, adenosina, ATP, trombina o lisofosfolípidos. La mayoría de los receptores identificados incrementan la liberación de osmolitos, orgánicos e inorgánicos, dependiente de volumen acoplado a la homeostasis de  $Ca^{2+}$  y la activación de la PKC. La movilización estimulada por la activación del receptor puede ser prevenida por inhibidores de VRAC; la activación del receptor no provoca un incremento en la liberación de osmolitos bajo condiciones isotónicas y la liberación estimulada es abolida bajo condiciones de hiperosmolaridad. Los GPCRs modulan la actividad de los canales que han sido activados previamente por el cambio en volumen y disminuyen la osmolaridad umbral en la que se produce la movilización de osmolitos (Fisher *et al.*, 2008; Vázquez-Juárez *et al.*, 2008a)

*Trombina.* Entre la extensa variedad de GPCRs, los receptores activados por trombina se han descrito con un papel modulador de las respuestas celulares consecuentes al aumento en volumen por hiposmolaridad en fibroblastos 3T3 (Vázquez-Juárez *et al.*, 2008b) y en cultivos primarios de astrocitos (Ramos-Mandujano *et al.*, 2007). Recientemente se describió que la trombina también modula la liberación de osmolitos, en un modelo de aumento en volumen isosmótico, inducido mediante una alta concentración de  $K^+$  extracelular, en cultivos primarios de astrocitos de corteza de rata (Vázquez-Juárez *et al.*, 2009).

La trombina es una serina proteasa que se genera en respuesta al daño en el tejido vascular y desempeña un papel fundamental en el proceso de

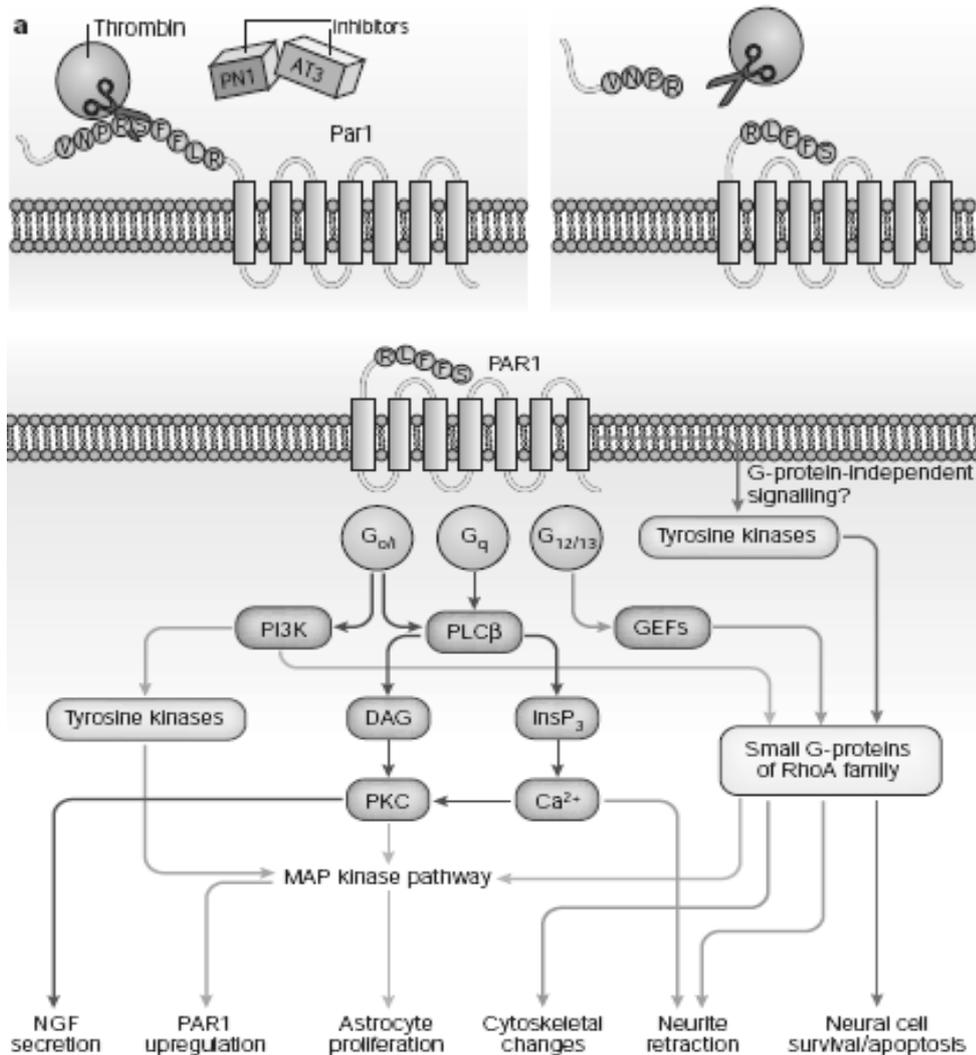
coagulación sanguínea (Coughlin, 2000). Además de su participación en la hemostasis, la trombina induce una gran diversidad de respuestas celulares mediante la señalización a través de la familia de receptores activados por proteasas (PARs) que consta de 4 miembros, PAR-1 al 4. (Grand *et al.*, 1996; Coughlin, 2005).

La trombina activa al PAR-1, PAR-3 y PAR-4. La activación de esta familia de receptores difiere de la tradicional unión de un ligando exógeno, el ligando de los receptores PAR es una secuencia peptídica del propio receptor que queda expuesta por el corte proteolítico de la trombina en un sitio específico de la región amino-terminal extracelular del receptor; ésta secuencia interacciona con el receptor e induce el cambio conformacional que promueve su interacción con las proteínas G iniciando la cascada de señalización intracelular. Los PARs pueden estar acoplados a miembros de  $G_{12/13}$ ,  $G_q$  y  $G_i$  y por lo tanto puede regular cinasas de tirosina, producción de  $IP_3$ ,  $Ca^{2+}$ , DAG, la Adenilato Ciclasa, entre otras (Coughlin, 2000) (Fig.1 3).

Diversas herramientas han sido desarrolladas para el estudio de los efectos de la trombina sobre los receptores PAR. Experimentalmente se puede activar específicamente a los distintos miembros de la familia PAR, en ausencia de trombina, mediante el uso de péptidos sintéticos que modelan la secuencia ligando específica para cada receptor (Vu *et al.*, 1991); de las secuencias diseñadas la TFLLR-NH<sub>2</sub> muestra gran selectividad para PAR-1. (Hollenberg, 2003). Para caracterizar el efecto catalítico de la trombina se han desarrollado diversos inhibidores, uno de ellos es el PPACK, que actúa formando un enlace covalente con la serina del sitio catalítico, actuando como un inhibidor irreversible (Kovach *et al.*, 2009).

Dependiendo de sus niveles en el cerebro, la trombina puede tener efectos notablemente diferentes, a concentraciones subnanomolares se ha descrito como un factor neuroprotector y altos niveles de trombina son reconocidos como una condición que contribuye a la muerte neuronal por

isquemia, hemorragia intracerebral y trauma (De Castro Ribeiro *et al.*, 2006; Xi *et al.*, 2003). La trombina se genera en respuesta a daño en el tejido vascular, a partir de la protrombina en presencia de los factores Xa, Va, Ca<sup>2+</sup> y fosfolípidos



**Fig. 1.3.** Estructura, función y señalización de PAR-1 (Noorbakhsh *et al.*, 2003).

de membrana; esta trombina vascular entra al parénquima cerebral por trauma craneano, isquemia u otra patología en la que se presenten cambios en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica. La barrera hematoencefálica esta formada por las uniones estrechas entre las células endoteliales y los pies de los astrocitos perivascuales que envuelven a los capilares cerebrales, esta barrera puede dañarse por fuerzas mecánicas y hemostáticas o cualquier situación que comprometa la funcionalidad de algunos de sus elementos. El

aumento en la cantidad de trombina en el cerebro bajo condiciones patológicas puede generar la activación anormal de los receptores PAR con consecuencias lesivas (Xi *et al.*, 2003; De Castro Ribeiro *et al.*, 2006).

### **1.5 Hiponatremia e isquemia como condiciones de hinchamiento celular.**

*Hiponatremia.* La causa más común de hinchamiento hiposmótico es una condición conocida como hiponatremia, que es definida como una reducción en la concentración de  $\text{Na}^+$  en el suero de un valor normal de 145 a 136mEq/litro. Así, cuando la concentración de  $\text{Na}^+$  en el plasma está entre 125 y 135 mEq/L, los síntomas incluyen náusea leve, vómito y dolores de cabeza; mientras que por debajo 120 mEq /L (una reducción en la osmolaridad del plasma de aproximadamente 20%), paro respiratorio, estado de coma y puede ocurrir daño cerebral permanente. Una concentración de  $\text{Na}^+$  de 110 mEq/L o menor es asociado con una alta incidencia de mortalidad. La hiponatremia puede ser resultado de una gran variedad de condiciones patológicas como falla cardíaca, síndrome nefrótico o cirrosis hepática. Un exceso de agua, como ocurre durante una inapropiada secreción de la hormona antidiurética (vasopresina) o en algunos desórdenes psiquiátricos como la polidipsia psicótica. Cuando la osmolaridad del plasma disminuye, como ocurre durante la hiponatremia, el agua se moviliza siguiendo su gradiente de concentración y entra al cerebro a través de la barrera hematoencefálica (Fisher *et al.*, 2008).

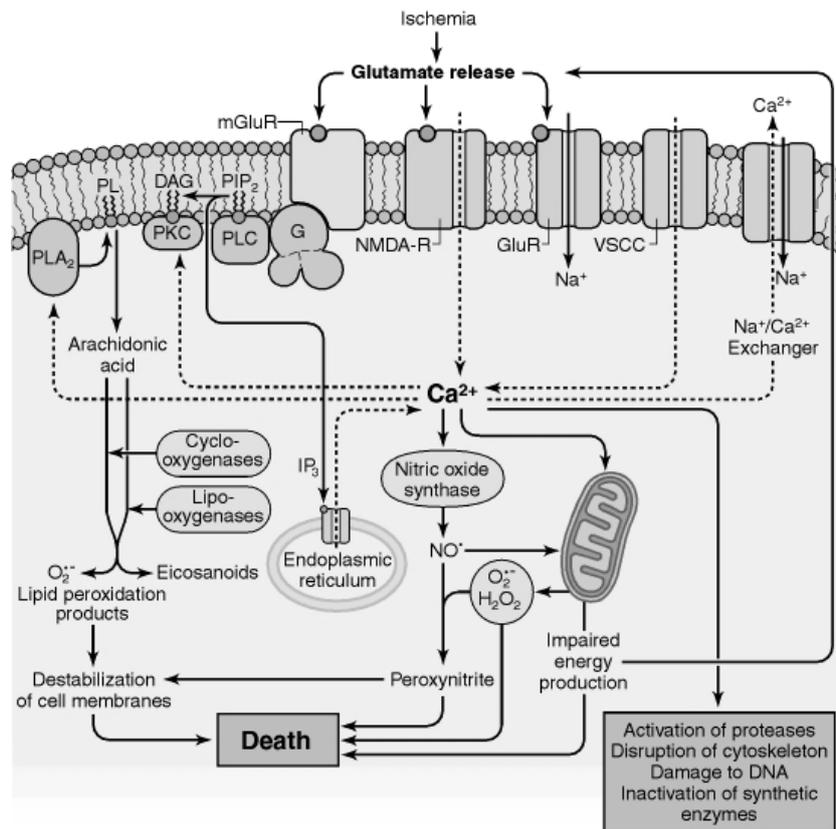
Aunque el cerebro no se comporta como un osmómetro perfecto una reducción significativa en la osmolaridad del plasma (10-20%), como puede ocurrir durante la hiponatremia, incrementa el volumen cerebral de un 5 a 7%, generando compresión de vasos sanguíneos y episodios de anoxia e isquemia (Fisher *et al.*, 2008).

El edema isosmótico ocurre en ausencia de una variación en la osmolaridad del medio externo, este tipo de edema puede presentarse en

patologías como epilepsia, isquemia, traumatismo craneoencefálico y encefalopatía hepática; en estas patologías, los fluidos extracelulares dejan de ser isotónicos por redistribución de solutos intracelulares, como  $K^+$  y  $Cl^-$ , ya sea por falla en sus mecanismos de transporte o por la apertura de vías difusionales, canales iónicos o por acumulación de moléculas orgánicas como urea, lactato o amonio, que son permeables en la membrana celular. Esto hace al medio intracelular hipertónico con respecto al extracelular teniendo como consecuencia un desplazamiento de agua al interior de la célula y por lo tanto un aumento en su volumen. La respuesta celular al incremento en volumen en condiciones isosmóticas se ha estudiado en menor detalle que la que tiene lugar en condiciones anisosmóticas, los modelos más estudiados de hinchamiento isosmótico son los que simulan condiciones isquémicas (Tuz *et al.*, 2004).

*Isquemia.* El metabolismo cerebral depende de la oxidación de la glucosa, la reducción del flujo sanguíneo cerebral causa una rápida disminución en el metabolismo originando un severo daño. Cuando la demanda energética del cerebro no puede ser cubierta por una disminución del flujo sanguíneo, ya sea por trauma, hemorragia, paro cardíaco u oclusión arterial, surge una condición patológica conocida como isquemia cerebral. En la isquemia focal el tejido isquémico es dividido en la zona del foco isquémico y en la zona de penumbra. En el foco isquémico el flujo sanguíneo es disminuido a menos del 15-20% y las células nerviosas mueren por una rápida despolarización anóxica que causa una pérdida inmediata del potencial de membrana. En la zona de penumbra las células son potencialmente rescatables de la muerte por la irrigación colateral. La muerte celular inducida bajo estas condiciones está relacionada con la pérdida de la homeostasis del  $Ca^{2+}$  y un incremento en los niveles extracelulares de aminoácidos excitadores, aspartato y glutamato (Camacho *et al.*, 2006; Mongin, 2007).

La excitotoxicidad es un tipo de muerte neuronal inducida por la sobreestimulación de los receptores a glutamato, en particular los de tipo NMDA. Este tipo de receptor muestra una alta permeabilidad a  $\text{Ca}^{2+}$  originando un influjo masivo de este catión a la célula. La pérdida de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  activa diversas rutas enzimáticas que participan en la muerte neuronal como proteasas, que originan daño celular al degradar proteínas estructurales; lipasas, que contribuyen al rompimiento de la membrana celular; las endonucleasas generan alteraciones en el DNA así como un incremento en la formación de especies reactivas de oxígeno por la activación de la óxido nítrico sintasa y la disfunción mitocondrial (Camacho *et al.*, 2006; Mongin, 2007; Rossi *et al.*, 2007) (Fig.1.4).



**Fig. 1.4.** Mecanismos que contribuyen al daño neuronal por isquemia (Basic Neurochemistry, 6ª edición).

Estudios recientes indican que la liberación de glutamato durante la isquemia muestra un componente calcio-dependiente, relacionado con la exocitosis sináptica, un segundo componente relacionado con la activación de

canales de  $\text{Cl}^-$  sensibles a volumen y un tercer componente asociado a la actividad en reversa de los transportadores de aminoácidos excitadores. La liberación de glutamato a través de estas vías puede ocurrir en diferentes etapas del episodio isquémico (Camacho *et al.*, 2006; Mongin, 2007).

La liberación sináptica es un proceso dependiente de energía y por lo tanto disminuye durante la falla de energía (Camacho *et al.*, 2006). La falta de oxígeno y glucosa, afecta la actividad de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  con un colapso progresivo de los gradientes iónicos transmembranales, lo que provoca despolarización que origina la acumulación intracelular de  $\text{Na}^+$  que es seguido por un influjo pasivo de  $\text{Cl}^-$  y agua, lo cual resulta en un aumento en el volumen celular. Como consecuencia de la despolarización, se genera una liberación excesiva de  $\text{K}^+$  y de aminoácidos excitadores con lo que el daño entra a una cadena autopropagada de despolarización y excitotoxicidad que causa nuevos episodios de muerte neuronal (Pasantés-Morales *et al.*, 2000; Tuz *et al.*, 2004).

Los transportadores de glutamato regulan la concentración extracelular de este neurotransmisor previniendo neurotoxicidad. La recaptura de glutamato requiere de  $\text{Na}^+$ , por lo que dependen de su gradiente y del suplemento de energía. Cuando los requerimientos de energía cerebrales, glucosa y oxígeno, no son satisfechos por un apropiado riego sanguíneo, el gradiente de  $\text{Na}^+$  se colapsa originando una discapacidad para remover el glutamato y aspartato e incluso contribuye a la liberación de estos aminoácidos a través de la operación en reversa de los transportadores (Camacho *et al.*, 2006; Mongin, 2007; Rossi *et al.*, 2007) (Fig. 1.5). En la zona de penumbra isquémica, donde la reducción del aporte sanguíneo depende de la cantidad de irrigación colateral, la depleción de energía y la disrupción iónica son menores, la supervivencia depende del control de los niveles de aminoácidos excitadores y por tanto las células localizadas ahí son potencialmente rescatables (Camacho *et al.*, 2006). En estas condiciones cualquier factor adicional que incremente la salida de glutamato exacerbará el daño excitotóxico.

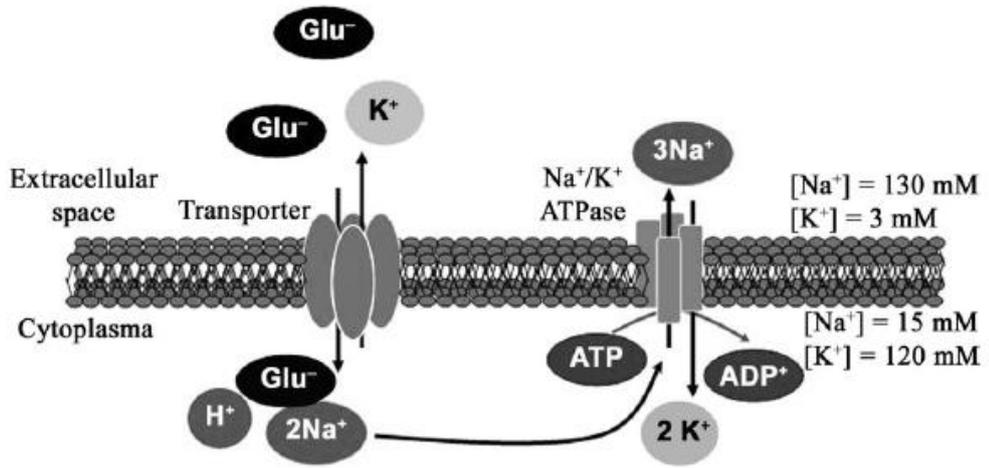


Fig. 1.5. Transportador de glutamato (Camacho *et al.*, 2006).

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

---

Los cambios significativos en el volumen celular son observados bajo condiciones patológicas. En respuesta al edema celular se pone en marcha el DRV que mediante la movilización activa de osmolitos intracelulares desplaza agua osmóticamente obligada con la consecuente recuperación del volumen celular. Dentro de los osmolitos que las células movilizan se encuentran iones como  $K^+$ ,  $Cl^-$  y compuestos de tipo orgánico entre los que destacan aminoácidos libres. En el caso particular de las neuronas se movilizan aminoácidos que además funcionan como neurotransmisores.

Actualmente se ha reportado que los GPCRs juegan un papel activo dentro del proceso de regulación de volumen, debido a que su señalización tiene un efecto potenciador sobre la liberación de osmolitos dependiente de volumen. Entre la variedad de GPCRs moduladores del DRV se han descrito a los receptores activados por trombina (PAR) en fibroblastos, astrocitos corticales y de cerebelo.

Existen patologías que generan edema neuronal y conllevan cambios en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica; esto se traduce en un aumento en la concentración de trombina en el cerebro. Bajo estas condiciones nos cuestionamos si la trombina, mediante la activación y señalización de receptores PAR, puede promover una mayor liberación de los aminoácidos excitadores, que funcionan como osmolitos y se encuentran presentes en altas concentraciones en las neuronas.

### 3. JUSTIFICACIÓN

---

Aunque el DRV ya se ha descrito en cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo bajo condiciones de hiposmolaridad no se había estudiado el potencial efecto que puede adquirir la trombina al promover la liberación de aminoácidos excitadores que actúan como osmolitos, que se ha observado en otros tipos celulares y que se encuentran presentes en altas concentraciones en las neuronas.

La respuesta celular al incremento en volumen en condiciones isosmóticas se ha estudiado en menor detalle que la que tiene lugar en condiciones hiposmóticas; sin embargo, existen patologías de relevancia clínica que presentan hinchamiento de tipo isosmótico como el caso de la isquemia.

La importancia del estudio de lo que ocurre con los aminoácidos excitadores en respuesta al aumento en volumen y a la influencia que pudiera ejercer un receptor GPCR sobre esta, radica en que una alta concentración de aminoácidos excitadores en el medio extracelular induce excitotoxicidad, un fenómeno desencadenado por la sobreactivación de receptores NMDA, que finalmente lleva a la muerte neuronal. Se ha descrito que la excitotoxicidad consecuente a la isquemia tiene un componente relacionado con la activación de la vía sensible a volumen, vía sobre la cual la trombina podría ejercer un efecto. De confirmarse este efecto, la trombina podría ser postulada como un elemento de exacerbación de la muerte neuronal por excitotoxicidad dentro de patologías en las que coexistan edema neuronal y cambios en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica.

#### **4. HIPÓTESIS**

---

La trombina como agonista de un receptor acoplado a proteínas G potenciará la liberación celular de aminoácidos excitadores, que ocurre en respuesta al aumento en volumen, en neuronas granulares de cerebelo de rata.

## 5. OBJETIVOS

---

### Objetivo general

Estudiar el efecto de la trombina sobre la liberación celular de glutamato en condiciones de edema hiposmótico e isosmótico en neuronas granulares de cerebelo en cultivo.

### Objetivos específicos

1. Estudiar si la trombina ejerce un efecto sobre la liberación osmosensible de glutamato en respuesta a hiponatremia e isquemia química.
  - a. Establecer si el efecto de trombina depende de su actividad proteolítica.
  - b. Identificar si el efecto de la trombina está mediado por la activación de un receptor de la familia PAR.
  - c. Determinar si el efecto de trombina depende de un incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$ .
2. Estudiar las vías de movilización de glutamato en respuesta a las condiciones de edema empleadas y determinar la vía sobre la cual la trombina ejerce efecto.
  - a. Determinar si el efecto de trombina ocurre sobre la liberación a través de la vía activada por aumento en volumen.
  - b. Establecer la liberación de glutamato mediada por la actividad reversa de su transportador.

## 6. MÉTODOS

---

### 6.1 Modelo de estudio

Se utilizó como modelo experimental cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo de rata Wistar de 8 días postnatales (NGC). El empleo de éste cultivo primario tiene como ventaja que las neuronas derivan de tejido normal, son de fácil acceso, tienen una fisiología neuronal normal *in vitro*, asumen las características morfológicas, bioquímicas y electrofisiológicas de las neuronas maduras y el cultivo consiste casi exclusivamente de NGC.

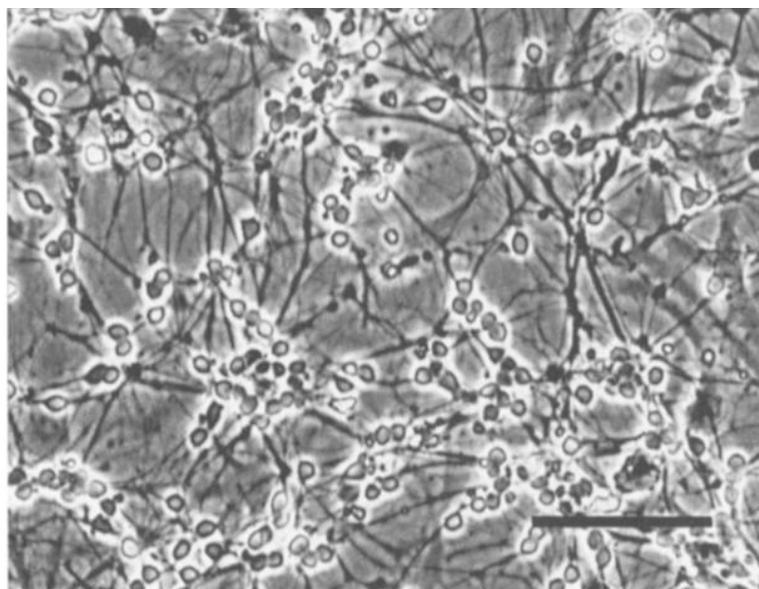
Las NGC son neuronas glutamatérgicas que se localizan en la capa granular de la corteza de cerebelo y comprenden la población neuronal más abundante de dicho órgano. Los cultivos primarios de NGC consisten en neuronas post-mitóticas, pre-migratorias y pre-maduras; que requieren condiciones despolarizantes, como agonistas de receptores a glutamato (NMDA) o altas concentraciones de K<sup>+</sup> (25mM de KCl); para promover su sobrevivencia en el cultivo, al simular los requerimientos tróficos de inervaciones glutamatérgicas durante ese periodo de desarrollo (Álavez *et al.*, 2006).

El reporte de Niclou y colaboradores (1998) indica que en el cerebelo de rata de 7 días postnatales se expresa el receptor activado por proteasas 1, PAR-1.

### 6.2 Cultivo celular

Los animales se obtuvieron del bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Los cultivos primarios de NGC (Fig. 6.1) fueron preparados como describen Morán y Patel (1989). Brevemente, de 4 a 6 ratas fueron decapitadas para la disección, se quitaron la piel y el cráneo; el cerebro se removió, se quitaron las meninges y se extrajo el cerebelo. El cerebelo fue dissociado mecánicamente y el tejido fue digerido con tripsina y desoxirribonucleasa I (DNAsa); las suspensiones de células dissociadas se mantuvieron en Medio Basal

Eagle suplementado con 10% de suero fetal bovino, 2 mM de glutamina, 50U/ml de penicilina, 50  $\mu$ M de estreptomina y 4 mM de glucosa. Las células fueron sembradas a una densidad de  $2 \times 10^6$  células en cajas Petri de plástico de 35 mm de diámetro tratadas con poli-L-Lisina (10 $\mu$ g/ml) 24 horas antes. La viabilidad celular se determinó por tinción con azul tripano y un hemocitómetro; el cultivo se incubó a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% CO<sub>2</sub> y 95% de aire; 24 horas después a los cultivos se les agregó: 25 mM de KCl, para promover la sobrevivencia de las NGC y 10  $\mu$ M citosina arabinosa, como agente antimitótico para evitar la proliferación de astrocitos.



**Fig. 6.1.** Fotomicrografía del cultivo primario de NGC (Morán *et al.*, 1989)

### **6.3 Soluciones y fármacos**

Todas las soluciones experimentales se ajustaron a un pH de 7.4 y la osmolaridad se midió en un osmómetro de punto de congelación marca Precision System. La solución isosmótica contuvo en mM 135 de NaCl, 4.7 de KCl, 1.17 de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.7 de MgSO<sub>4</sub>, 1 de CaCl<sub>2</sub>, 5 de glucosa y 10 de HEPES (300mOsm). La osmolaridad de las soluciones isosmóticas se ajustó a la osmolaridad del medio de cultivo de las NGC (325-335 mOsm), en el momento del experimento mediante la adición de NaCl. La solución hiposmótica consistió en una solución a la que se le redujo la osmolaridad 30%, respecto a la

isosc mica, mediante la disminución de la concentración de NaCl. Para la condición de isquemia química por inhibición glicolítica y respiratoria se utilizó una solución isosc mica sin glucosa a la que se le agregó 20 mM de iodoacetato y 5 mM de azida de sodio. Para las condiciones libres de  $\text{Ca}^{2+}$  se sustituyó en las soluciones experimentales el  $\text{CaCl}_2$  por 1 mM de  $\text{MgCl}_2$  y se utilizaron agentes quelantes de  $\text{Ca}^{2+}$ , se agregó 0.5 mM de BAPTA y se preincubó 50  $\mu\text{M}$  BAPTA-AM.

La trombina (5U/ml) fue adicionada a la solución estímulo sin incubación o periodo de pre-estimulación. El PPACK (1  $\mu\text{M}$ ) inhibidor irreversible de la actividad catalítica de la trombina (Kovach *et al.*, 2009), se preincubó 30 minutos en la solución estímulo en presencia de trombina antes de comenzar los experimentos de liberación de aminoácidos. Para reconocer el subtipo de receptor PAR involucrado en la vía de señalización de la trombina se utilizó el TFLLR-NH<sub>2</sub> (10  $\mu\text{M}$ ), péptido sintético agonista específico para PAR-1, que se agregó a la solución en sustitución de la trombina.

El aporte de la vía de liberación de osmolitos orgánicos activada por aumento en volumen se estableció mediante el uso de DCPIB (10  $\mu\text{M}$ ), inhibidor selectivo de esta vía. El aporte de liberación de glutamato por la actividad reversa de su transportador se determinó mediante el uso del inhibidor DL-TBOA (10  $\mu\text{M}$ ), ambos inhibidores se agregaron al cultivo con un periodo de incubación de 30 minutos y se mantuvieron durante todo el experimento de liberación en las soluciones experimentales.

El Medio Basal Eagle, el suero fetal bovino fueron adquiridos de Invitrogen, L-glutamina de Sigma-Aldrich Chemical (St Louis, MO, USA), TFLLR-NH<sub>2</sub> de Bachem Americas (Torrance, CA, USA), la penicilina y estreptomycin de GIBCO, Invitrogen's brand, Invitrogen (Carlsbad, CA, USA), el DCPIB y DL-TBOA de TOCRIS Bioscience (Ellisville, MO, USA), el PPACK de Calbiochem (San Diego, CA, USA), la trombina fue de Vital Products (de origen de plasma bovino, actividad específica > 2000 U/mg proteína), las moléculas radioactivas [2,3-<sup>3</sup>H]-

Taurina y D-[2,3-<sup>3</sup>H]-Aspartato fueron de American Radiolabeled Chemicals Inc. (St Louis, MO, USA) y Amersham Biosciences (Buckinghamshire, UK) respectivamente, las sales para preparar las soluciones experimentales de J.T. Baker (NaCl, KCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub> y CaCl<sub>2</sub>), de Sigma Chemicals (D-(+)-Glucosa) y de Roche (Indianapolis, IN, USA) (HEPES).

#### **6.4 Experimentos de liberación de aminoácidos**

Para determinar la liberación de taurina y glutamato se emplearon los trazadores radioactivos [2,3-<sup>3</sup>H]-Taurina y D-[2,3-<sup>3</sup>H]-Aspartato, un análogo no metabolizable del glutamato, ya que el empleo directo de glutamato tritiado podría representar un sesgo al ser un aminoácido que participa en una gran variedad de rutas metabólicas. A los cultivos primarios de NGC se les cambió el medio de cultivo por una solución isosmótica y se preincubaron con 0.3 µCi de cada trazador radioactivo durante una hora; posteriormente se perfundi6 1ml/min con medio isosm6tico, se realizaron 9 lavados para eliminar el exceso de marca extracelular y estabilizar la liberaci6n basal, despu6s se tomaron 3 colectas para establecer la liberaci6n en condiciones control y 8 colectas en las que la soluci6n se remplaz6 por el est6mulo. En los experimentos bajo condiciones hiposm6ticas las colectas se realizaron a una tasa de 1mL/min y en isquemia a 1 ml/5min. Al concluir el experimento se lisaron las c6lulas de las cajas con un raspador. La radioactividad se determin6 en un contador de centelleo l6quido marca Beckman Coulter.

#### **6.5 An6lisis estad6stico**

Los resultados se expresaron como el porcentaje de radioactividad liberada en cada colecta respecto al total incorporada, suma de las colectas y lisado. Con los porcentajes de radioactividad se construy6 un curso temporal de liberaci6n para cada condici6n, en donde los primeros 3 puntos indican la liberaci6n basal y los subsecuentes la liberaci6n en respuesta al est6mulo que fue agregado al tiempo

t=3 o t=15. Para comparar la liberación de cada condición se sumó la radioactividad acumulada en las 3 fracciones máximas del pico de liberación. Los datos mostrados son la media  $\pm$  el error estándar. La significancia estadística se determinó para comparaciones pareadas con una prueba de t y para comparaciones múltiples con un ANOVA seguido de una prueba *post hoc* de Tukey utilizando el software GraphPad Prism.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

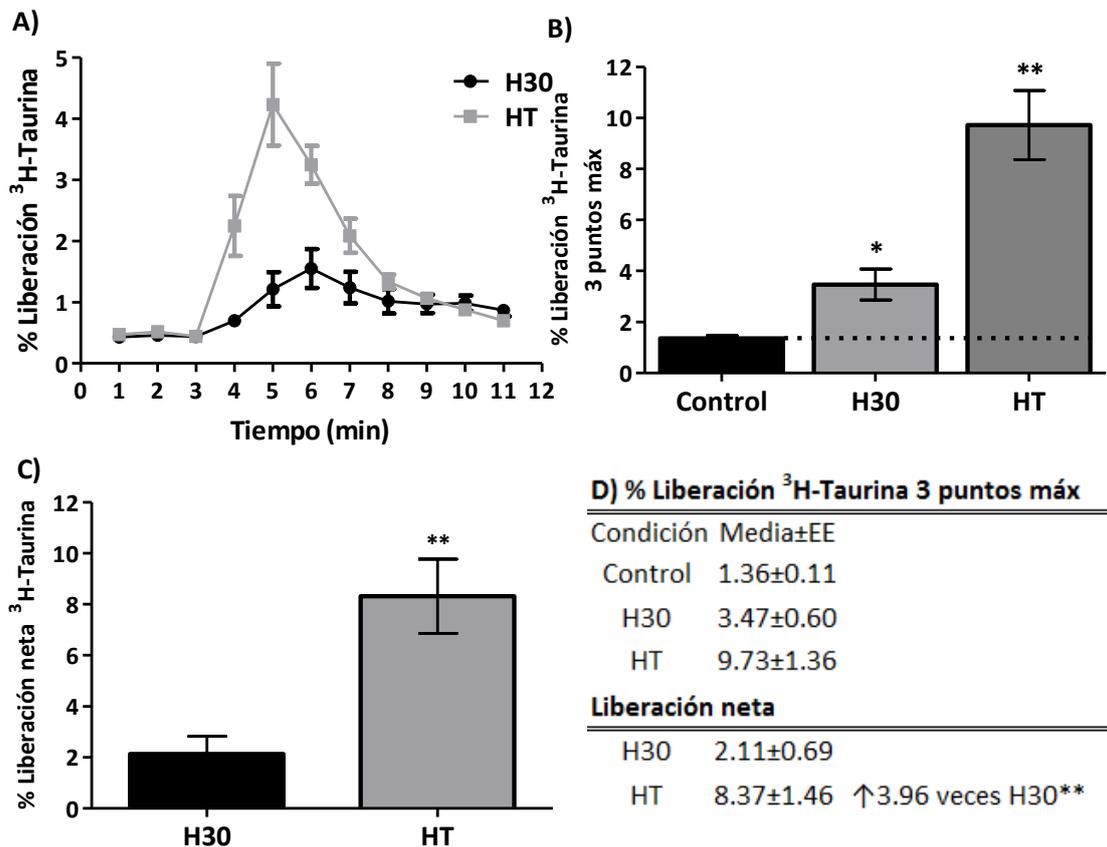
### 7.1 Edema hiposmótico

El presente trabajo se centró en el estudio del efecto de la trombina sobre la liberación de glutamato que ocurre en respuesta al hinchamiento celular. Se utilizó como aproximación experimental el seguimiento radioisotópico de aminoácidos tritiados y se aplicó la técnica de perfusión descrita en Vázquez-Juárez *et al.*, (2008b), detallada en métodos, para establecer la liberación curso-temporal de glutamato y taurina en condiciones basales y tras el estímulo de aumento en volumen, en presencia o ausencia de trombina.

Las NGC exhiben DRV subsecuente al hinchamiento originado por su exposición a una solución hiposmótica (Pasantes-Morales *et al.*, 1993). Como en la mayoría de los tipos celulares, el DRV en neuronas es un proceso activo acompañado por la extrusión de osmolitos como  $K^+$ ,  $Cl^-$  y osmolitos orgánicos (Pasantes-Morales *et al.*, 1994) preferentemente aminoácidos. En un trabajo previo de nuestro laboratorio se describió que las NGC en cultivo aumentan su volumen celular cuando son expuestas a una reducción del 30% en la osmolaridad externa, así como que la taurina se moviliza ante cambios mínimos en la concentración extracelular de osmolitos, lo que permite correlacionar su liberación con hinchamiento celular (Tuz *et al.*, 2001).

Para corroborar que una solución hiposmótica 30% es una condición de hinchamiento celular en NGC se estableció la liberación curso temporal de  $^3H$ -Taurina como una estimación indirecta de aumento en volumen. Al comparar el porcentaje de radioactividad acumulada en el pico de liberación se observó que la liberación de  $^3H$ -Taurina en condiciones control es de 1.4%. Al agregar el estímulo, solución hiposmótica 30% (H30), la liberación incrementó a un promedio de 3.5%. La adición de 5U/ml de trombina a la solución hiposmótica 30% (HT) potenció la liberación de  $^3H$ -Taurina a 9.7% (Fig.7.1 A, B y D). Al considerar sólo la liberación neta, liberación en cada condición sin considerar la

liberación basal (Control), la trombina potenció 4 veces la liberación hiposmótica (Fig. 7.1 C y D). La activación de GPCRs no induce un incremento en la liberación de osmolitos bajo condiciones isotónicas (Fisher *et al.*, 2008), por lo cual el efecto de trombina se describió como potenciador al actuar sólo sobre la liberación osmosensible evocada por una condición de aumento en volumen.

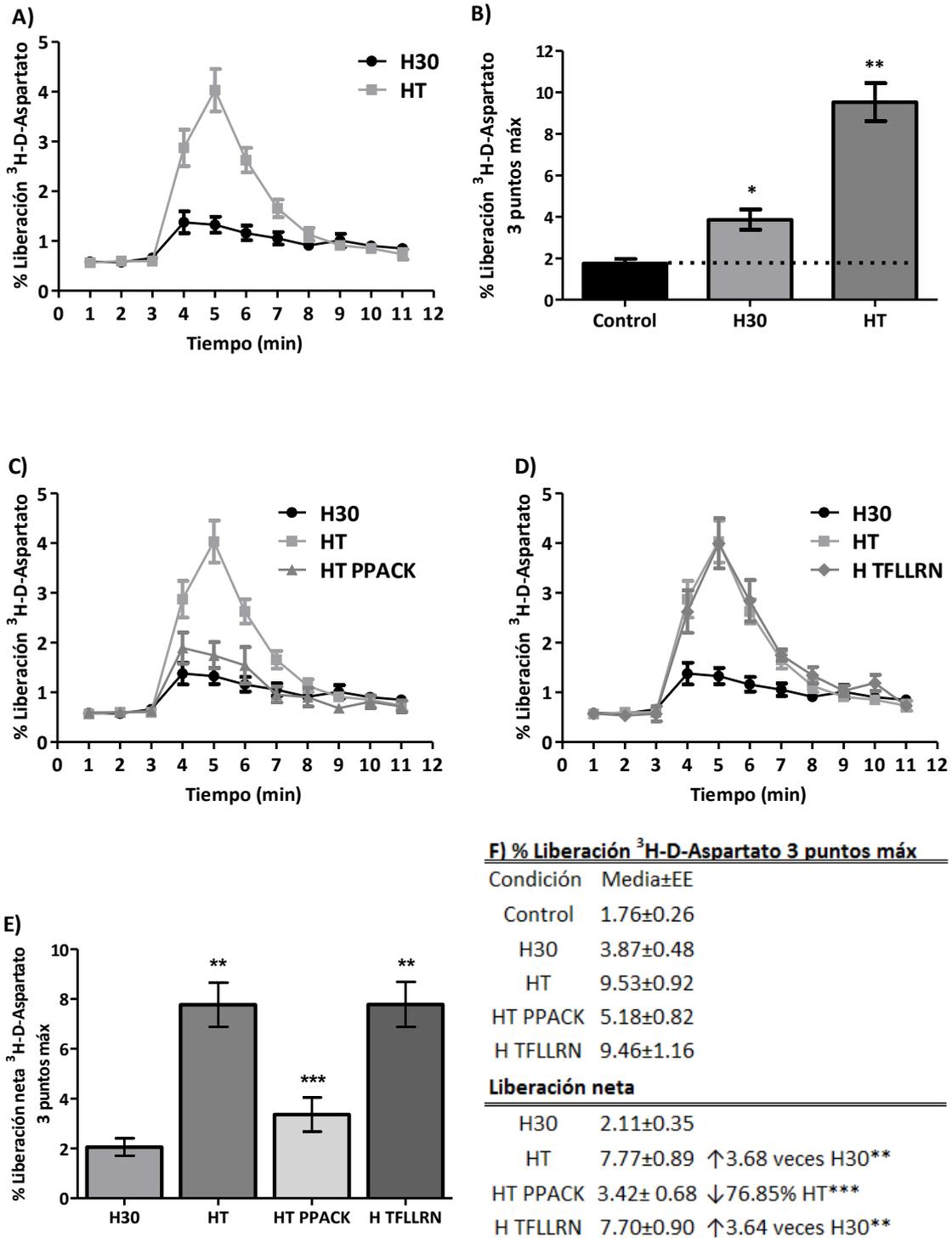


**Fig. 7.1.** La exposición a una solución hiposmótica 30% es una condición de aumento en volumen en NGC, la adición de 5U/ml de trombina potencia la liberación osmosensible de <sup>3</sup>H-Taurina. **A.** Liberación curso temporal de <sup>3</sup>H-Taurina: los primeros 3 puntos indican la liberación basal (Control), el estímulo H30 o HT fue agregado al tiempo t=3. **B.** Las barras representan el porcentaje de radioactividad acumulada en el pico de liberación (4-6 min.). **C.** Las barras representan la liberación neta, liberación en cada condición sin considerar la liberación basal. **D.** La tabla indica los porcentajes de estimulación de la liberación en cada condición. Los datos mostrados son la media ± error estándar. La significancia estadística se determinó para comparaciones pareadas con una prueba de *t* y para comparaciones múltiples con un ANOVA seguido de una prueba de Tukey. Significativamente diferente del Control\**P*<0.05, significativamente diferente de H30\*\**P*<0.05; *n*≥4.

El estudio de la participación del glutamato como osmolito en la regulación de volumen celular es de particular interés en neuronas por ser el neurotransmisor excitador del sistema nervioso central de mamíferos.

La exposición de NGC a un estímulo H30 provocó un aumento en la liberación curso-temporal de  $^3\text{H-D-Aspartato}$ , un análogo del glutamato no metabolizable, de un 1.8% en condiciones isosmóticas (control) a un 3.9 % de radioactividad acumulada en el pico de liberación de H30. Tras la adición de 5U/ml de trombina hubo un pico de 9.5% y al considerar sólo la liberación neta la trombina potenció 3.7 veces la liberación hiposmótica (Fig. 7.2 A, B, E y F).

La trombina es una serina proteasa y para determinar si el efecto potenciador de trombina sobre la liberación de  $^3\text{H-D-Aspartato}$  depende de su actividad catalítica, se utilizó  $1\mu\text{M}$  de PPACK, inhibidor irreversible de su actividad proteolítica (Kovach *et al.*, 2009). El tratamiento previene en un 77% la liberación osmosensible de  $^3\text{H-D-Aspartato}$  potenciada por trombina (Fig.7.2 C, E y F). La trombina puede activar a tres de los cuatro subtipos identificados de PARs, Receptores Activados por Proteasas (Coughlin, 2005). El PAR-1 es el subtipo que ha sido descrito como protagonista del efecto potenciador de trombina sobre la salida de glutamato y taurina en cultivos primarios de astrocitos (Ramos-Mandujano *et al.*, 2007; Fisher *et al.*, 2008). Para determinar si es a través de PAR-1 que la trombina ejerce su efecto se utilizó  $10\mu\text{M}$  de TFLLR-NH<sub>2</sub>, péptido sintético agonista específico para dicho receptor (Hollenberg, 2003). La activación del receptor PAR-1 independiente de su corte proteolítico por trombina mediante la unión del péptido TFLLR-NH<sub>2</sub>, mimetizó el efecto potenciador sobre la liberación osmosensible de  $^3\text{H-D-Aspartato}$  que alcanzó un 9.5% de radioactividad acumulada en el pico de liberación (Fig. 7.2 D, E y F). Con los resultados anteriores se concluyó que el efecto potenciador de trombina sobre la liberación de  $^3\text{H-D-Aspartato}$  consecuente a una reducción en la osmolaridad extracelular del 30% está mediado por la activación proteolítica del receptor PAR-1.

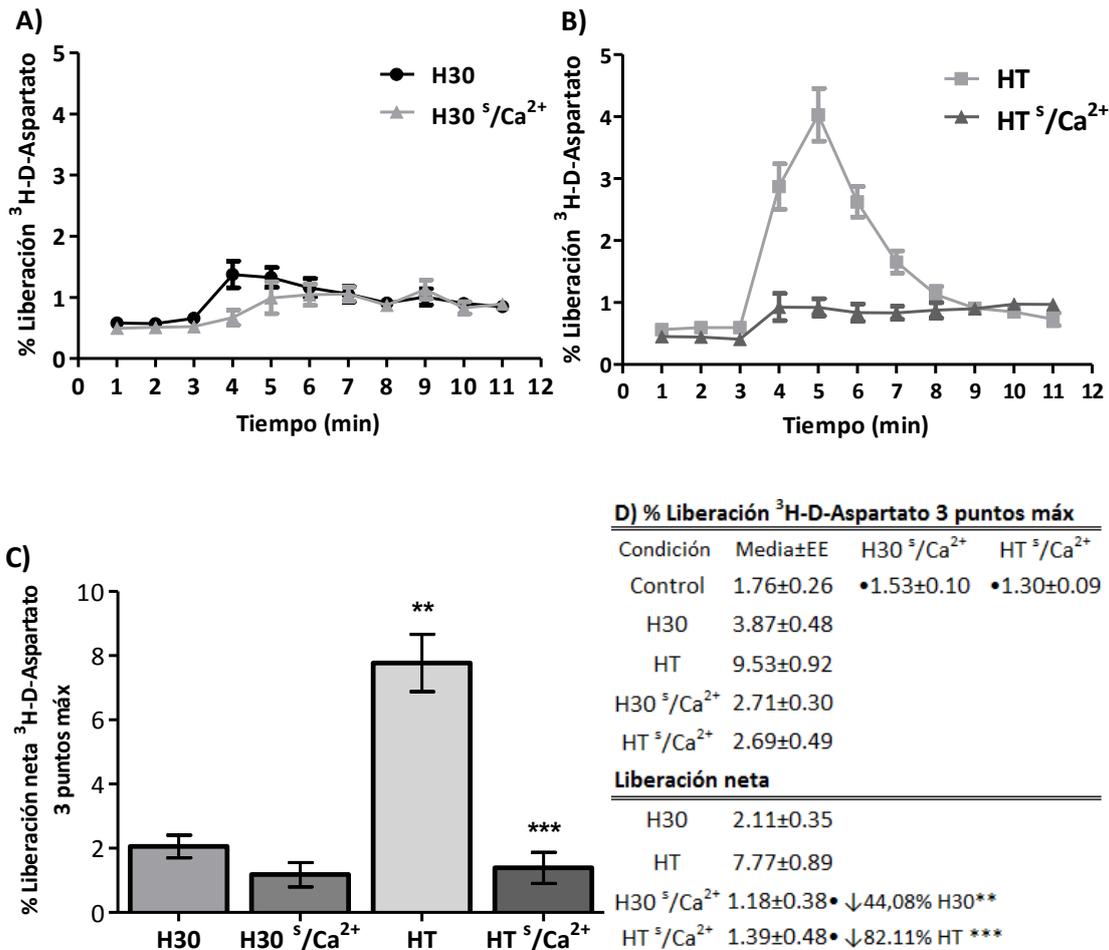


**Fig. 7.2.** La trombina potencia la liberación osmosensible de <sup>3</sup>H-D-Aspartato evocada por una solución hiposmótica 30% a través del corte proteolítico de PAR-1. **A, C y D.** Liberación curso temporal de <sup>3</sup>H-D-Aspartato: los primeros 3 puntos indican la liberación basal (Control), el estímulo H3O o HT fue agregado al tiempo t=3, en presencia o ausencia de inhibidores o agonistas. **B.** Las barras representan el porcentaje de radioactividad acumulada en el pico de liberación (4-6 min.). **E.** Las barras representan la liberación neta, liberación en cada condición sin considerar la liberación basal. **F.** La tabla indica los porcentajes de estimulación/inhibición de la liberación en cada condición. Los datos mostrados son la media ± error estándar. La significancia estadística se determinó para comparaciones pareadas con una prueba de *t* y para comparaciones múltiples con un ANOVA seguido de una prueba de Tukey. Significativamente diferente del Control \**P*<0.05, significativamente diferente de H3O \*\**P*<0.05, significativamente diferente de HT \*\*\**P*<0.05; *n*≤4.

Como parte de las señales activadas durante la osmotransducción de la regulación de volumen celular hay un aumento consistente en la  $[Ca^{2+}]_i$ ; se ha reportado que al promover un aumento mayor, mediante el uso de ionóforos (Cardin *et al.*, 2003) o por la activación de GPCRs (Vázquez-Juárez *et al.*, 2008b), se potencia la liberación de osmolitos. La activación del receptor PAR-1 por trombina aumenta la  $[Ca^{2+}]_i$  cuando esta acoplado a  $G\alpha_q$ , que al activar a la  $PLC\beta$  produce, a partir de  $PIP_2$ , DAG e  $IP_3$ , este último al ser agonista de canales de  $Ca^{2+}$  del retículo endoplásmico induce su apertura.

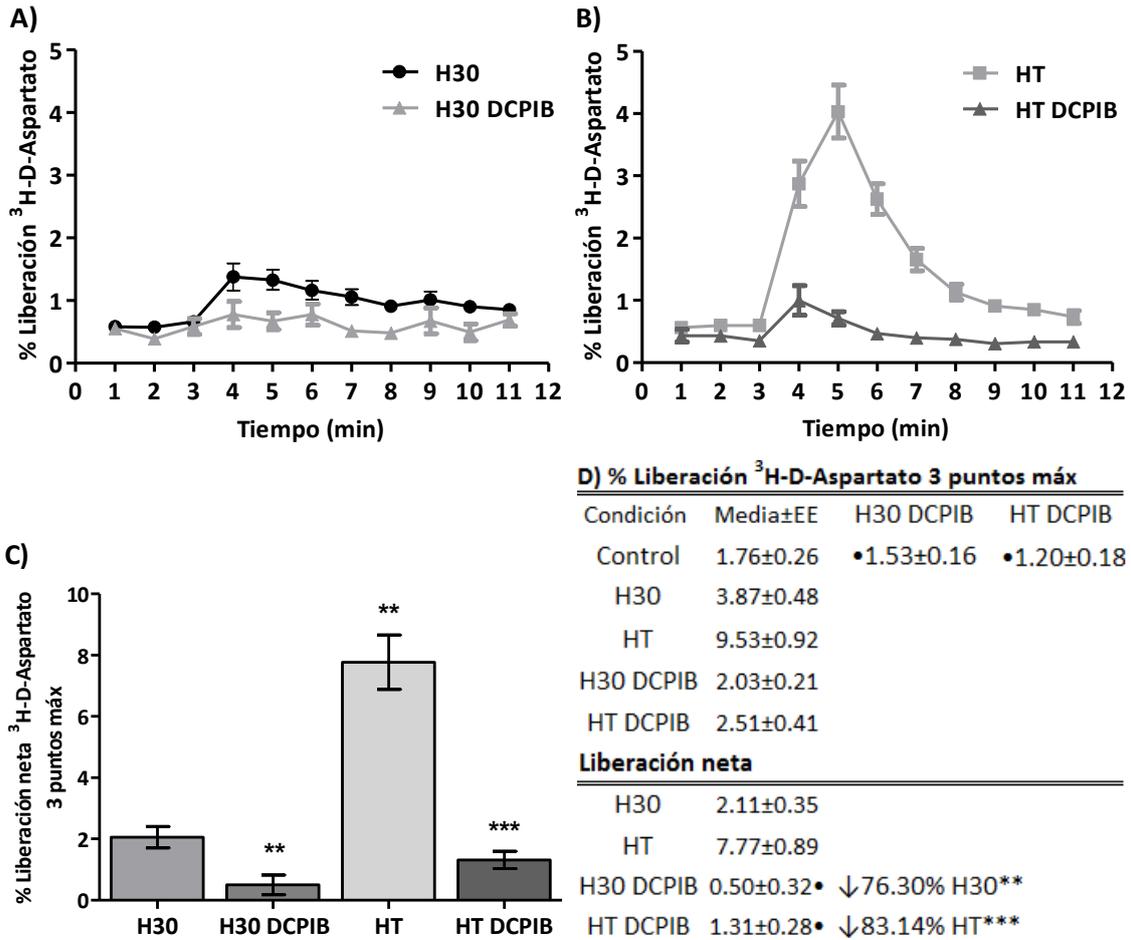
Para determinar si el efecto potenciador de trombina sobre la liberación hiposmótica de osmolitos depende de un aumento en la  $[Ca^{2+}]_i$  se estableció la liberación curso-temporal de  $^3H$ -D-Aspartato en condiciones libres de este catión por su omisión de las soluciones experimentales junto con el empleo de agentes quelantes. Este tratamiento no disminuyó significativamente la liberación hiposmótica de  $^3H$ -D-Aspartato (Fig.7.3 A y C), lo que indica que en las NGC la movilización de osmolitos y el DRV son  $Ca^{2+}$  independientes; lo que coincide con el reporte de Morán *et al.* (1997); así como que la liberación vesicular calcio-dependiente no es una vía que contribuye en la liberación de  $^3H$ -D-Aspartato tras el estímulo hiposmótico. La liberación neta evocada por HT en las condiciones libres de calcio disminuyó en un 82%, que corresponde a una completa inhibición de la liberación potenciada por trombina (Fig. 7.3 B y C); con lo cual se concluyó que la liberación de osmolitos consecuente a la activación de PAR-1 por trombina depende de eventos mediados por un incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$ .

Se ha reportado que la activación de GPCRs ejerce efecto sólo sobre la vía activada por volumen; para corroborar que la vía a través de la cual se está movilizando el  $^3H$ -D-Aspartato es la activada en respuesta al aumento en volumen por condiciones hiposmóticas y que la potenciación en la liberación ocurre a través de esa vía se utilizó 10 $\mu$ M de DCPIB, inhibidor selectivo de dicha



**Fig. 7.3.** El efecto potenciador de trombina sobre la liberación hiposmótica de <sup>3</sup>H-D-Aspartato depende de un incremento en [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. **A y B.** Liberación curso temporal de <sup>3</sup>H-D-Aspartato, los primeros 3 puntos indican la liberación basal (Control) y el estímulo, H3O o HT, en condiciones libres de Ca<sup>2+</sup> fue agregado al tiempo t=3. **C.** Las barras representan la liberación neta, liberación en cada condición sin considerar la liberación basal. **D.** La tabla indica los porcentajes de inhibición de la liberación en cada condición. Los datos mostrados son la media ± error estándar. La significancia estadística se determinó para comparaciones pareadas con una prueba de *t* y para comparaciones múltiples con un ANOVA seguido de una prueba de Tukey. Significativamente diferente de H3O\*\**P*<0.05, significativamente diferente HT\*\*\**P*<0.05, *n*=4.

vía (Decher *et al.*, 2001). El tratamiento con DCPIB previno en un 76% la liberación hiposmótica de <sup>3</sup>H-D-Aspartato (Fig. 7.4 A y C) y disminuyó en un 83% la liberación consecuente a la activación del receptor PAR-1 (Fig. 7.4 B y C), que corresponde a una completa inhibición en la potenciación de liberación osmosensible por HT. Los resultados indican que la principal vía por la que se libera el <sup>3</sup>H-D-Aspartato en condiciones hiposmóticas es la vía activada por aumento en volumen, vía sobre la cual la trombina ejerce su efecto al potenciar la liberación de osmolitos.



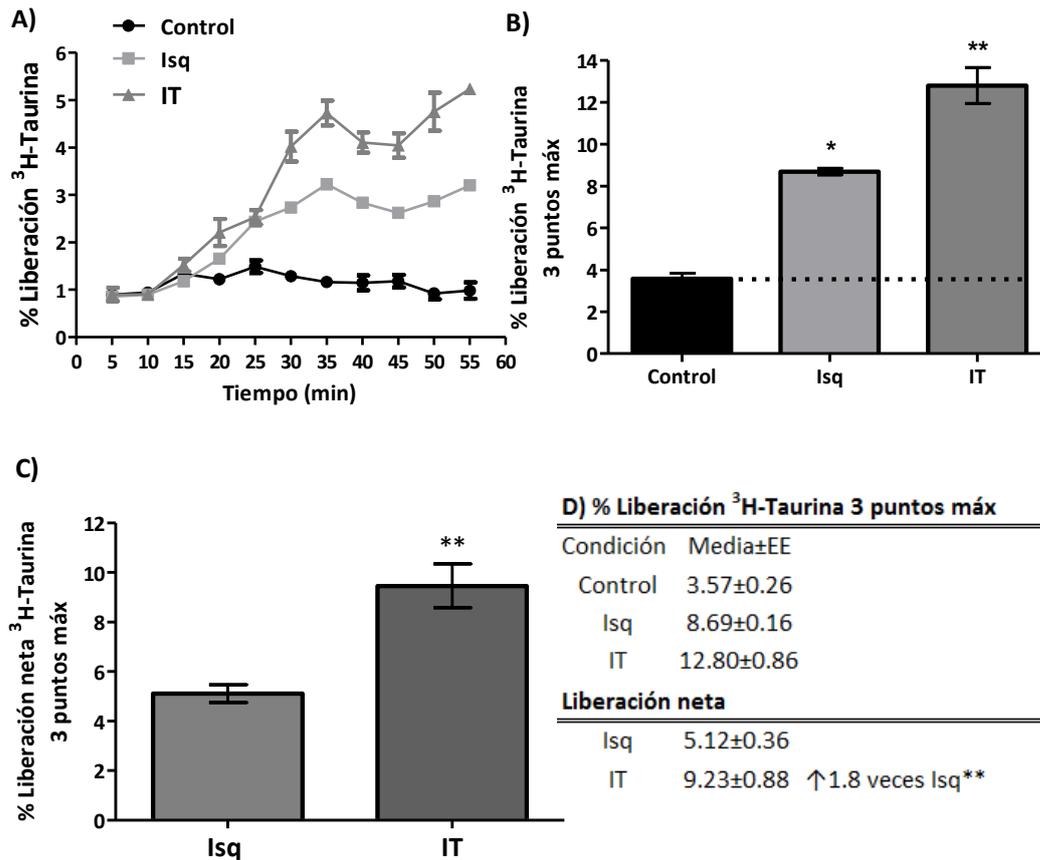
**Fig. 7.4.** La liberación de <sup>3</sup>H-D-Aspartato potenciada por trombina ocurre a través de la vía activada por volumen. **A y B.** Liberación curso temporal de <sup>3</sup>H-D-Aspartato, los primeros 3 puntos indican la liberación basal (Control) y el estímulo, H30 o HT, en presencia o ausencia de DCPIB, fue agregado al tiempo t=3. **C.** Las barras representan la liberación neta, liberación en cada condición sin considerar la liberación basal. **D.** La tabla indica los porcentajes de inhibición de la liberación en cada condición. Los datos mostrados son la media ± error estándar. La significancia estadística se determinó para comparaciones pareadas con una prueba de *t* y para comparaciones múltiples con un ANOVA seguido de una prueba de Tukey. Significativamente diferente de H30\*\**P*<0.05, significativamente diferente HT\*\*\**P*<0.05, *n*≤4.

## 7.2 Edema isosmótico

Poco se sabe sobre la movilización de osmolitos por hinchamiento celular en condiciones isosmóticas como las que ocurren durante la isquemia. Se ha reportado que el funcionamiento en reversa de los transportadores de glutamato es el principal mecanismo que conlleva un aumento en los niveles extracelulares de aminoácidos excitadores durante un proceso isquémico; sin embargo, otras rutas como la exocitosis y la liberación inducida por hinchamiento celular también podrían estar participando (Camacho *et al.*, 2006) y sobre la vía activada por aumento en volumen la trombina podría ejercer efecto. Con base en esto se caracterizaron farmacológicamente en un modelo *in vitro*, las posibles rutas de liberación de aminoácidos excitadores asociadas a la isquemia por inhibición glicolítica y respiratoria por el uso de 20 mM de azida de sodio, un inhibidor de la citocromo C oxidasa y 5 mM de iodoacetato, un inhibidor irreversible de la enzima glicolítica GADPH.

Para determinar si el modelo de isquemia química utilizado en el presente trabajo es una condición de hinchamiento celular en NGC se estableció la liberación curso temporal de <sup>3</sup>H-Taurina, representante de los osmolitos orgánicos cuya liberación se correlaciona estrechamente con hinchamiento celular (Tuz *et al.*, 2001).

La liberación basal de <sup>3</sup>H-Taurina (Control) en NGC corresponde a un 3.6%; al agregar el estímulo de isquemia química por inhibición glicolítica y respiratoria (Isq) la liberación de <sup>3</sup>H-Taurina aumentó a un 8.7% de radioactividad acumulada en el pico de liberación y al adicionar 5U/ml de trombina (IT) al estímulo, se potenció la liberación que alcanzó un 12.8% (Fig. 7.5 A, B y D). Al considerar sólo la liberación neta, liberación en cada condición sin considerar la liberación basal la trombina potenció 1.8 veces la salida osmosensible de <sup>3</sup>H-Taurina (Fig. 7.5 C y D); este efecto indicó que el estímulo de isquemia química es una condición de aumento en volumen en NGC.



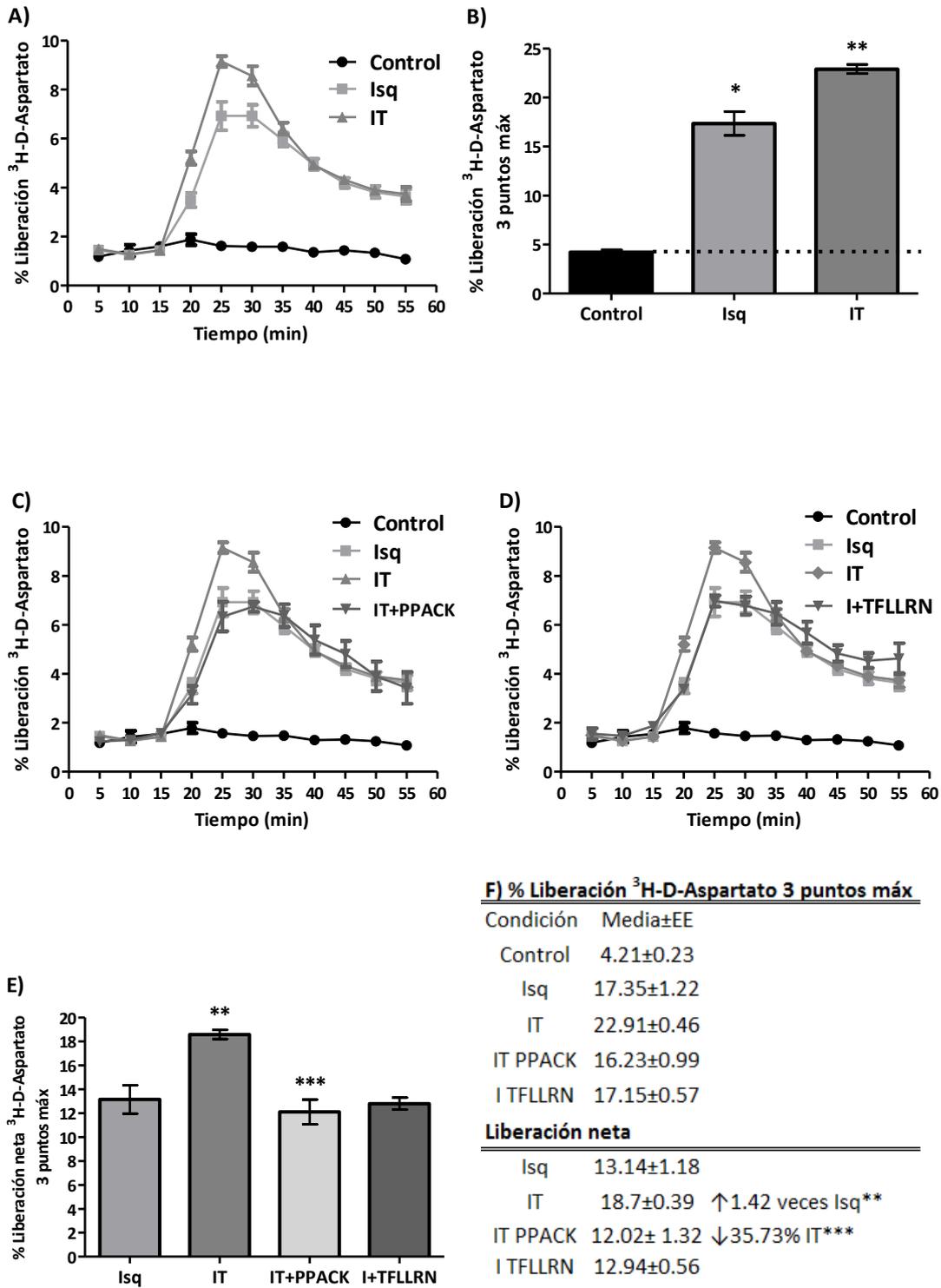
**Fig. 7.5.** La exposición a isquemia química es una condición de aumento en volumen en NGC, la adición de 5U/ml de trombina potencia la liberación osmosensible de  $^3\text{H}$ -Taurina. **A.** Liberación curso temporal de  $^3\text{H}$ -Taurina, los primeros 3 puntos indican la liberación basal (Control) y el estímulo, Isq o IT fue agregado al tiempo t=15. **B.** Las barras representan el porcentaje de radioactividad acumulada en el pico de liberación. **C.** Las barras representan la liberación neta, liberación en cada condición sin considerar la liberación basal. **D.** La tabla indica los porcentajes de estimulación de la liberación en cada condición. Los datos mostrados son la media  $\pm$  error estándar. La significancia estadística se determinó para comparaciones pareadas con una prueba de *t* y para comparaciones múltiples con un ANOVA seguido de una prueba de Tukey. Significativamente diferente del Control \**P*<0.05, significativamente diferente Isq \*\**P*<0.05, *n*≤4.

La liberación de glutamato por isquemia química se estimó mediante el empleo del trazador radioactivo  $^3\text{H}$ -D-Aspartato. Al exponer a NGC al estímulo de isquemia química (Isq) se indujo un aumento en la liberación de  $^3\text{H}$ -D-Aspartato, de un 4.2% en condiciones basales (control) a un 17.4%; al agregar 5U/ml de trombina en la solución de isquemia química (IT) la liberación de  $^3\text{H}$ -D-Aspartato alcanzó un máximo de 22.9% (Fig. 7.6 A y B). Considerando sólo la liberación neta, la trombina potenció un 42% (Fig. 4.6 E y F).

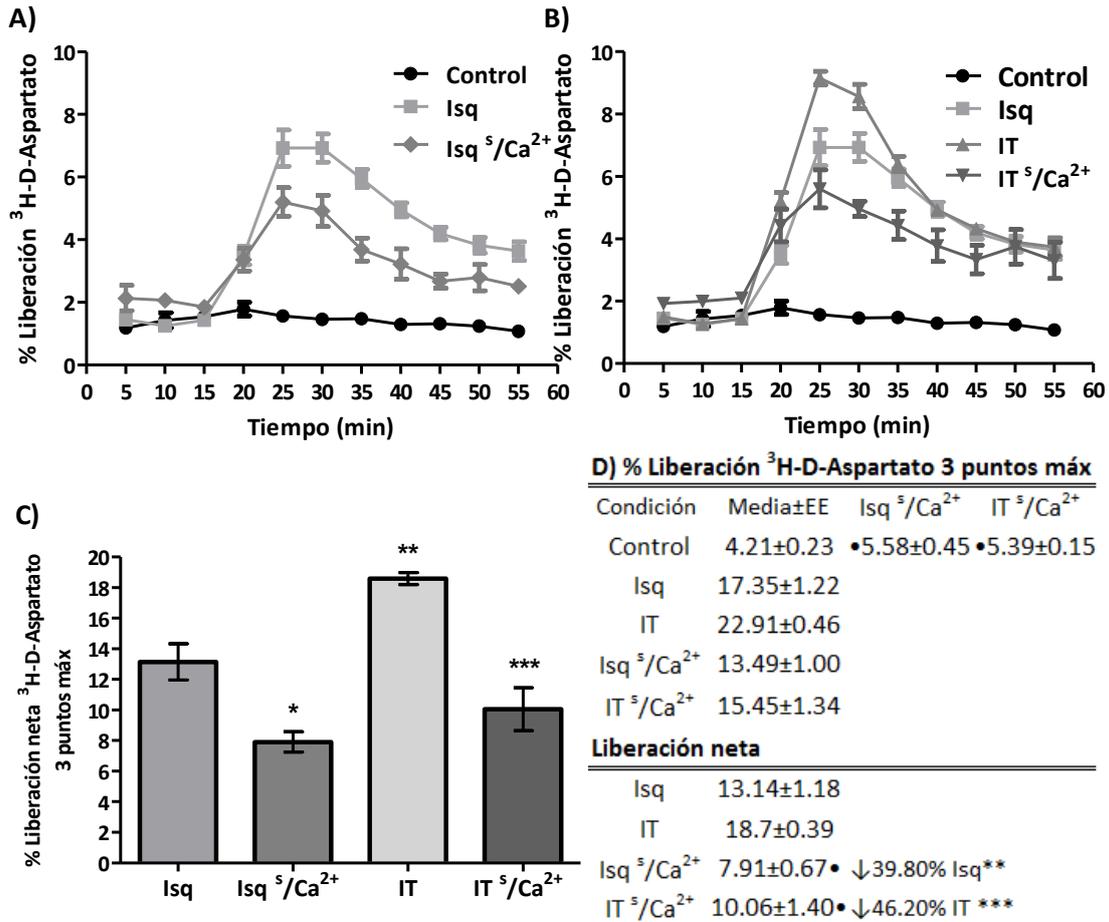
Para determinar si este efecto de la trombina depende de su actividad de serina proteasa se pretrató con 1 $\mu\text{M}$  de PPACK (IT PPACK), un inhibidor

irreversible de su actividad proteolítica (Kovach *et al.*, 2009), el tratamiento disminuyó la liberación en un 36% lo que corresponde a una completa inhibición del efecto potenciador de trombina sobre la liberación de  $^3\text{H-D-Aspartato}$  (Fig. 7.6 C, E y F). Para determinar la participación de PAR-1 en el efecto de trombina se agregó  $10\mu\text{M}$  de TFLLR-NH<sub>2</sub>, péptido sintético agonista específico del receptor PAR-1, a la solución estímulo (I TFLLRN) pero no se equiparó el efecto potenciador de la liberación de  $^3\text{H-D-Aspartato}$  por trombina (Fig. 7.6 D, E y F). Los resultados anteriores indican que el efecto de trombina sobre la liberación de  $^3\text{H-D-Aspartato}$  en la condición de isquemia química depende de su actividad catalítica pero no del corte proteolítico de PAR-1; una posible explicación es que la trombina, por su actividad enzimática, es capaz de activar a un mayor número de receptores PAR de los que se podrían activar solamente por uso de un agonista, como lo es el péptido sintético, convirtiéndose en un factor limitante para mimetizar el efecto de trombina. Además la trombina podría estar activando otro subtipo de receptor PAR, como el PAR-4 que no se probó en este trabajo.

La  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  puede aumentar durante la isquemia por la activación de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles a voltaje, de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  del tipo NMDA, por el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  y por el cese del funcionamiento de la bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  como consecuencia de la disminución del metabolismo energético y de la producción de ATP. Para determinar la dependencia del efecto potenciador de trombina al  $\text{Ca}^{2+}$  se realizaron experimentos de liberación de  $^3\text{H-D-Aspartato}$  en condiciones libres de este catión. Bajo estas condiciones la liberación neta consecuente al estímulo de isquemia química disminuye en un 39.8% (Fig. 7.7 A, C y D); lo que sugiere que la liberación vía exocitosis calcio-dependiente contribuye a la liberación de  $^3\text{H-D-Aspartato}$  por isquemia. La liberación posterior a la activación del receptor a trombina es completamente prevenida en condiciones libres de  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. 7.7 B, C y D), lo que indica que el efecto potenciador de trombina depende de la señalización de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ .



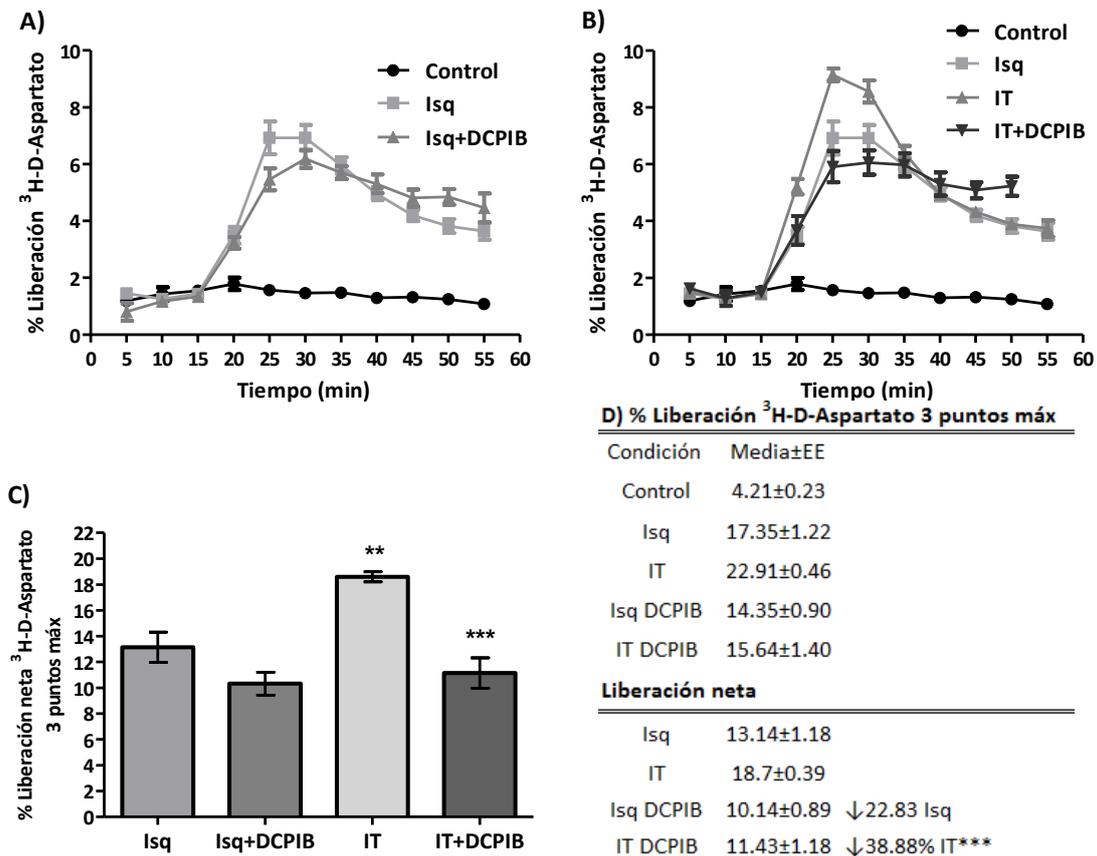
**Fig. 7.6.** La adición de 5U/ml de trombina (IT) potencia la liberación de <sup>3</sup>H-D-Aspartato evocada por isquemia (Isq). **A, C y D.** Liberación curso-temporal de <sup>3</sup>H-D-Aspartato, los primeros 3 puntos indican la liberación basal (Control), el estímulo Isq o IT fue agregado al tiempo t=15, en presencia o ausencia de inhibidores/agonistas. **B.** Las barras representan el porcentaje de radioactividad acumulada en el pico de liberación (20-30 min.) **E.** Las barras representan la liberación neta, liberación en cada condición sin considerar la liberación basal. **F.** La tabla indica los porcentajes de estimulación o inhibición de la liberación en cada condición. Los datos mostrados son la media±error estándar. La significancia estadística se determinó para comparaciones pareadas con una prueba de *t* y para comparaciones múltiples con un ANOVA seguido de una prueba de Tukey. Significativamente diferente del Control \**P*<0.05, significativamente diferente de Isq \*\**P*<0.05, significativamente diferente de IT \*\*\**P*<0.05; *n*≤4.



**Fig. 7.7. El efecto potenciador de trombina sobre la liberación de <sup>3</sup>H-D-Aspartato depende de un aumento en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>.** A y B. Liberación curso-temporal de <sup>3</sup>H-D-Aspartato, los primeros 3 puntos indican la liberación basal (Control), el estímulo Isq o IT fue agregado al tiempo t=15, en condiciones libres de Ca<sup>2+</sup>. C. Las barras representan la liberación neta, liberación en cada condición sin considerar la liberación basal. D. La tabla indica los porcentajes de inhibición de la liberación en cada condición. Los datos mostrados son la media ± error estándar. La significancia estadística se determinó para comparaciones pareadas con una prueba de t y para comparaciones múltiples con un ANOVA seguido de una prueba de Tukey. Significativamente diferente de Isq\*\*P<0.05, significativamente diferente de IT\*\*\*P<0.05; n≤4.

Las otras vías de liberación que pueden estar participando en la movilización de <sup>3</sup>H-D-Aspartato tras la exposición al estímulo de isquemia química son la actividad reversa del transportador de glutamato, como consecuencia de la pérdida del gradiente de Na<sup>+</sup> y la vía de liberación de osmolitos orgánicos activada por aumento en volumen. Para corroborar que la potenciación en la liberación de <sup>3</sup>H-D-Aspartato por trombina ocurre a través de la vía sensible a volumen se utilizó 10μM de DCPIB, inhibidor selectivo de esta vía (Decher, *et al* 2001). En dichas condiciones la liberación neta de <sup>3</sup>H-D-Aspartato no se previno significativamente (Fig. 7.8 A, C y D) y la liberación de

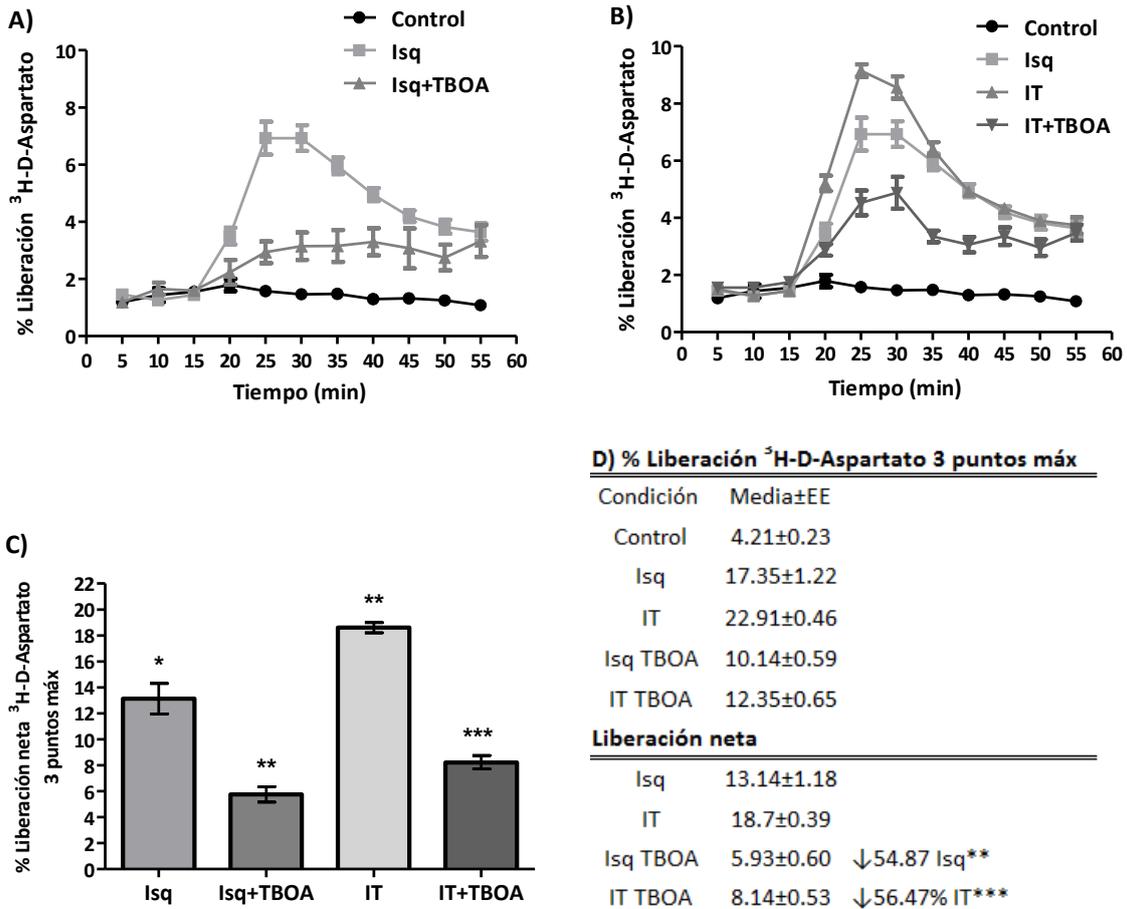
$^3\text{H-D-Aspartato}$  por trombina disminuyó en un 39%, que corresponde a una completa inhibición de la potenciación (Fig. 7.8 B, C y D). Estos resultados indican que la condición de isquemia química genera poca liberación de  $^3\text{H-D-Aspartato}$  dependiente de volumen y que la trombina tiene un efecto potenciador sobre la movilización a través de la vía sensible a volumen.



**Fig. 7.8.** La vía activada por hinchamiento participa en la liberación de  $^3\text{H-D-Aspartato}$  potenciada por trombina. **A y B.** Liberación curso-temporal de  $^3\text{H-D-Aspartato}$ , los primeros 3 puntos indican la liberación basal (Control), el estímulo Isq o IT fue agregado al tiempo t=15, en presencia o ausencia de DCPIB. **C.** Las barras representan la liberación neta, liberación en cada condición sin considerar la liberación basal. **D.** La tabla indica los porcentajes de inhibición de la liberación en cada condición. Los datos mostrados son la media  $\pm$  error estándar. La significancia estadística se determinó para comparaciones pareadas con una prueba de *t* y para comparaciones múltiples con un ANOVA seguido de una prueba de Tukey. Significativamente diferente de Isq \*\**P* < 0.05, significativamente diferente de IT \*\*\**P* < 0.05; n $\leq$ 4.

Para determinar el aporte en la liberación de  $^3\text{H-D-Aspartato}$  por la actividad en reversa del transportador de glutamato se utilizó 10 $\mu\text{M}$  de DL-TBOA, un inhibidor no sustrato que se une extracelularmente al transportador bloqueando su interacción con el glutamato impidiendo su movilización. Este tratamiento disminuyó en un 55% la liberación neta de  $^3\text{H-D-Aspartato}$  por

isquemia química y en un 56% la liberación por IT (Fig. 7.9), lo que indica que es la principal vía por la cual se moviliza el  $^3\text{H-D-Aspartato}$  en la condición de isquemia química; además el DL-TBOA al tener el mismo efecto inhibitor indica que no afecta la liberación de  $^3\text{H-D-Aspartato}$  dependiente de volumen potenciada por trombina lo que concuerda con el hecho de que el efecto de trombina se ejerce únicamente sobre la vía activada por hinchamiento.



**Fig. 7.9.** La actividad reversa del transportador de glutamato es la principal vía a través de la cual se moviliza el  $^3\text{H-D-Aspartato}$  por isquemia química. **A y B.** Liberación curso-temporal de  $^3\text{H-D-Aspartato}$ , los primeros 3 puntos indican la liberación basal (Control), el estímulo Isq o IT fue agregado al tiempo  $t=15$ , en presencia o ausencia de DL-TBOA. **C.** Las barras representan la liberación neta, liberación en cada condición sin considerar la liberación basal. **D.** La tabla indica los porcentajes de inhibición de la liberación en cada condición. Los datos mostrados son la media  $\pm$  error estándar. La significancia estadística se determinó para comparaciones pareadas con una prueba de  $t$  y para comparaciones múltiples con un ANOVA seguido de una prueba de Tukey. Significativamente diferente de de Isq \*\* $P < 0.05$ , significativamente diferente de IT \*\*\* $P < 0.05$ ;  $n \leq 4$ .

## 7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

---

Los resultados presentados en este trabajo indican que en cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo, la trombina tiene un efecto potenciador sobre la liberación de glutamato que ocurre en respuesta a condiciones de aumento en volumen. Este efecto depende de la actividad proteolítica de la trombina y en el caso del modelo hiposmótico, se tiene la certeza de que la actividad proteolítica media el corte y la activación del receptor PAR-1. La cascada intracelular que participa en el efecto de la trombina en condiciones de aumento en volumen involucra principalmente la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$ .

La trombina ejerce su efecto exclusivamente sobre la vía de liberación de osmolitos activada por volumen. El modelo de isquemia química utilizado en este estudio, no parece inducir un aumento en volumen suficiente para que el efecto de la trombina sea visualizado con claridad, por lo que se propone realizar estudios en los que se evalúen otros modelos experimentales de isquemia que tengan un efecto más significativo sobre el aumento en volumen, como pueden ser el burbujeo con 95%  $\text{N}_2$ / 5%  $\text{CO}_2$ , el remplazo de glucosa por sucrosa junto con la inhibición de la glicolisis y la fosforilación oxidativa.

Este trabajo demuestra que las neuronas granulares de cerebelo son susceptibles al efecto de la trombina como potenciador de la liberación de glutamato activada por volumen; esto nos lleva a postular que esta proteasa u otros agonistas de GPCRs pueden promover excitotoxicidad al potenciar la liberación de aminoácidos excitadores en patologías donde coinciden el edema celular cerebral y la pérdida de la selectividad de la barrera hematoencefálica.

## REFERENCIAS

---

1. Álvarez S., Blancas S. y Morán J. 2006. Effect of NMDA antagonists on the death of cerebellar granule neurons at different ages. *Neuroscience Letters* 398(3):241-245.
2. Basic Neurochemistry, 6th edition, Molecular, Cellular and Medical Aspects. Siegel G, Agranoff B, Albers W, Fisher S and Uhler M. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1999. American Society for Neurochemistry.
3. Camacho A, Massieu L. 2006. Role of glutamate transporters in the clearance and release of glutamate during ischemia and its relation to neuronal death. *Arch Med Res* 37(1):11-8.
4. Cardin V, Lezama R, Torres-Márquez ME y Pasantes-Morales H 2003 Potentiation of the osmosensitive taurine release and cell volume regulation by cytosolic  $Ca^{2+}$  rise in cultured cerebellar astrocytes. *Glia* 44:119-128.
5. Coughlin SR. 2000. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature* 407(6801):258-64.
6. Coughlin SR. 2005. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J Thromb Haemost* 3(8):1800-14.
7. De Castro Ribeiro M, Badaut J, Price M, Meins M, Bogousslavsky J, Monard D, Hirt L. 2006. Thrombin in ischemic neuronal death. *Exp Neurol* 198(1):199-203.
8. Decher N, Lang HJ, Nilius B, Brüggemann A, Busch AE, Steinmeyer K. 2001. DCPIB is a novel selective blocker of I(Cl,swell) and prevents swelling-induced shortening of guinea-pig atrial action potential duration. *Br J Pharmacol* 134(7):1467-79.
9. Fisher SK, Cheema TA, Foster DJ, Heacock AM. 2008. Volume-dependent osmolyte efflux from neural tissues: regulation by G-protein-coupled receptors. *J Neurochem* 106(5):1998-2014.
10. Grand RJ, Turnell AS, Grabham PW. 1996. Cellular consequences of thrombin-receptor activation. *Biochem J* 313 ( Pt 2):353-68.
11. Hoffmann EK, Lambert IH, Pedersen SF. 2009. Physiology of cell volume regulation in vertebrates. *Physiol Rev*. Jan; 89(1):193-277.
12. Hollenberg MD. 2003. Proteinase mediated signaling: proteinase-activated receptors (PARs) and much more. *Life Sci*. 74(2-3): 237-46
13. Mongin AA. 2007. Disruption of ionic and cell volume homeostasis in cerebral ischemia: The perfect storm. *Pathophysiology*. 14(3-4):183-93.

14. Moran J, Patel AJ. 1989. Stimulation of the N-methyl-D-aspartate receptor promotes the biochemical differentiation of cerebellar granule neurons and not astrocytes. *Brain Res.*1;486(1):15-25.
15. Morán J, Morales-Mulia S, Hernández-Cruz A, Pasantes-Morales H. Regulatory volume decrease and associated osmolyte fluxes in cerebellar granule neurons are calcium independent. *J Neurosci Res.* 1997 Jan 15; 47(2):144-54.
16. Noorbakhsh F, Vergnolle N, Hollenberg MD, Power C. 2003 Proteinase-activated receptors in the nervous system. *Nat Rev Neurosci*; 4(12):981-90.
17. Pasantes-Morales H, Maar TE and Morán J. 1993. Cell Volume Regulation in Cultured Cerebellar Granule Neurons. *J Neurosci Res* 34:219-224.
18. Pasantes-Morales H, Chacón E, Murray RA and Morán J. 1994. Properties of Osmolyte Fluxes Activated During Regulatory Volume Decrease in Cultured Cerebellar Granule Neurons. *J Neurosci Res* 37:720-727.
19. Pasantes-Morales H, Cardin V, Tuz K. 2000. Signaling events during swelling and regulatory volume decrease. *Neurochem Res.* 25(9-10):1301-14.
20. Pasantes-Morales H, Lezama RA, Ramos-Mandujano G and Tuz KL. (2006) Mechanisms of cell volume regulation in hypo-osmolality. *Am J Med.* 119 S4-11.
21. Pasantes-Morales H, Cruz-Rangel S. (2010). Brain volume regulation: osmolytes and aquaporin perspectives. *Neuroscience.* 28;168(4):871-84.
22. Kovach IM, Kelley P, Eddy C, Jordan F, Baykal A. 2009 Proton bridging in the interactions of thrombin with small inhibitors. *Biochemistry.*4;48(30):7296-304.
23. Ramos-Mandujano G, Vázquez-Juárez E, Hernández-Benítez R, Pasantes-Morales H. 2007. Thrombin potently enhances swelling-sensitive glutamate efflux from cultured astrocytes. *Glia* 55(9):917-25.
24. Rossi DJ, Brady JD, Mohr C. 2007. Astrocyte metabolism and signaling during brain ischemia. *Nat Neurosci* 10(11):1377-86.
25. Tuz K, Ordaz B, Vaca L, Quesada O, Pasantes-Morales H. 2001. Isovolumetric regulation mechanisms in cultured cerebellar granule neurons. *J Neurochem* 79(1):143-51.
26. Tuz KL, Pasantes-Morales H. 2004. Edema cerebral: aportaciones de la investigación básica al manejo clínico. *TIP Revista especializada en Ciencias Químico-Biológicas.* 7(2):93-102.
27. Vázquez-Juárez E, Ramos-Mandujano G, Hernández-Benítez R, Pasantes-Morales H. 2008a. On the role of G-protein coupled receptors in cell volume regulation. *Cell Physiol Biochem*; 21(1-3):1-14.

28. Vázquez-Juárez E, Ramos-Mandujano G, Lezama RA, Cruz Rangel S, Islas L.D, Pasantes-Morales H. 2008b. Thrombin increases hyposmotic taurine efflux and accelerates ICI-swell and RVD in 3T3 fibroblasts by a src-dependent EGFR transactivation. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 455(6):859-872.
29. Vázquez-Juárez E, Hernández-Benítez R, López-Domínguez A, Pasantes-Morales H. 2009. Thrombin potentiates D-aspartate efflux from cultured astrocytes under conditions of K homeostasis disruption. *J Neurochem* 111(6):1398-408.
30. Vu TK, Hung DT, Wheaton VI, Coughlin SR. 1991. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* 64(6):1057-68.
31. Xi G, Reiser G, Keep RF. 2003. The role of thrombin and thrombin receptors in ischemic, hemorrhagic and traumatic brain injury: Deleterious or protective? *J Neurochem* 84:3–9.