



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

LA TROMBINA COMO MODULADOR
DEL MECANISMO DE LA REGULACIÓN
DEL VOLUMEN CELULAR

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 :
ERIKA VÁZQUEZ JUÁREZ



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

TUTOR: DR. BENITO ORDAZ SÁNCHEZ

2007



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.

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno Vázquez Juárez Erika 56580563 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 30052465-1
2. Datos del tutor Dr Benito Ordaz Sánchez
3. Datos del sinodal 1 Dra Herminia Pasantes Ordoñez
4. Datos del sinodal 2 Dr Julio Eduardo Roque Morán Andrade
5. Datos del sinodal 3 Dr Gerardo Ramos Mandujano
6. Datos del sinodal 4 M en IBB Alette Ortega Gómez
7. Datos del trabajo escrito. La trombina como modulador del mecanismo de la regulación del volumen celular 47 p. 2007

ÍNDICE

➤ AVBREVIATURAS.....	3
➤ INTRODUCCIÓN.....	4
♦ Importancia del Volumen Celular.....	4
♦ Osmolitos.....	7
♦ Mecanismos de Movilización de Osmolitos.....	8
♦ El Mecanismo Sensor del Volumen.....	11
♦ Osmotransducción.	13
♦ Participación de Receptores Acoplados a Proteínas G en la Regulación del Volumen.....	15
♦ La Trombina Como Agonista de PARs.....	16
♦ Interacción entre RAPGs y RTKs.....	19
➤ OBJETIVO GENERAL.....	21
➤ MATERIALES Y METODOS.....	22
♦ Cultivo celular.....	22
♦ Soluciones y fármacos.....	22
♦ Experimentos de liberación de ³ H-aurina.....	23
♦ Estimación de cambios en el volumen celular.....	23
♦ Análisis estadístico.....	24
➤ RESULTADOS.....	25
♦ La trombina potencia la liberación osmosensible de taurina.....	25
♦ La potenciación por trombina es parcialmente dependiente de Ca ²⁺ , fosfolipasa C (PLC) y sensible a bloqueadores de proteínas activadas por Ca ²⁺	27
♦ EGFR y src están involucrados en la potenciación por trombina.....	29
♦ La potenciación de la liberación de taurina por trombina tiene dos componentes independientes.	30
♦ La regulación de volumen en condiciones hiposmóticas se potencia por trombina.....	31
♦ La potenciación de la regulación de volumen tiene componentes similares a la de liberación de taurina.....	32
➤ DISCUSIÓN.....	34
➤ CONCLUSIÓN.....	39
➤ REFERENCIAS.....	40

RESUMEN

El proceso conocido como Decremento Regulatorio del Volumen (DRV) es la respuesta de una célula al hinchamiento provocado por un medio con osmolaridad disminuida. El DRV consta de una serie de eventos enfocados a la recuperación del volumen celular divididos principalmente en tres etapas: (1) la percepción del cambio en volumen, (2) la transducción de señales y (3) la activación de las vías de movilización de osmolitos. Como parte de la etapa de osmotransducción se han encontrado dos respuestas celulares claramente inducidas por hiposmolaridad; por un lado el aumento en los niveles de Ca^{2+} intracelular y por otro la activación de cinasas de tirosina. En algunos tipos celulares, el Ca^{2+} no influye en el proceso de regulación de volumen; sin embargo, en otros se presenta una dependencia en la que el Ca^{2+} actúa como modulador del DRV incrementando su eficiencia. El presente trabajo se centra en estudiar si cuando se aumentan los niveles de Ca^{2+} por una condición fisiológica como es el estimular un receptor acoplado a proteínas G (RAPG) también hay una potenciación del DRV; para ello se estudió el efecto de la trombina (agonista de un RAPG) en la salida del osmolito taurina y en la regulación del volumen celular en fibroblastos Swiss 3T3 expuestos a un choque hiposmótico, además se evaluaron algunos elementos de la vía de transducción que modulan la regulación del volumen. Se encontró que la condición de hiposmolaridad más trombina induce un aumento en la liberación osmosensible de taurina y la aceleración del proceso de recuperación del volumen celular. El efecto de la trombina fue mediado por dos vías de igual importancia e independientes; la primera incluye respuestas vinculadas a un aumento en los niveles de calcio citosólico vía PLC, como lo son la activación de PKC, CaM y CaMKII. La segunda, basada en la acción de cinasas de tirosina, tiene a la cinasa citosólica src como elemento principal, la cual, además de ser un importante efector directo de la vía de taurina, está involucrada en un proceso de transactivación de EGFR.

ABREVIATURAS

[Ca²⁺]_i: calcio intracelular

9-AC: Ácido 9-aminocamptotécico

AMPc: adenosinmonofosfato cíclico

ATP: adenosin 5'-trifosfato

CaM: Ca²⁺/calmodulina

CaMKII: proteína cinasa dependiente de Ca²⁺/calmodulina II

Canales Kv: canales de K⁺ activados por voltaje

CCE: entrada de Ca²⁺ capacitiva

Cl_{vol}⁻: canales de cloro regulados por volumen

DAG: diacilglicerol

DCPIB: 4-[(Butyl6,7dichloro2cyclopentul2,3dihydro-1oxo1H-inden5-yl) oxy]butanoic acid

DDFK: 1,9-dideoxiforskolina

DIDS: Ácido 4-4'-diisotiocianoestilben-2,2'-disulfónico

DRV: decremento regulador del volumen

EGFR: receptor al factor de crecimiento epidermal

EGTA-AM: ácido tetra-acético etilenglicol-AM

GDP: guanosin di-fosfato

GTP: guanosin tri-fosfato

IP₃: inositol trifosfato

LPA: ácido lisofosfatídico

MAPK: proteínas cinasas activadas por mitógenos

NPPB: Ácido N-fenilantálínico

PAR: receptor activado por proteasas

PI3K: fosfatidil-inositol-3 cinasa

PIP₂: fosfatidilinositol-bifosfato

PKC: proteína cinasa C

PLC: fosfolipasa C

PP2: (4-amino-5-(4-chlorophenil)-7-(t-butyl)pyrazol[3,4-d] pyrimidine

RAPG: receptores acoplados a proteínas G

RTK: receptores con actividad cinasa de tirosinas

SACs: canales activados por estiramiento

SIDH: síndrome de excreción inadecuada de la hormona antidiurética

SITS: Ácido 4-acetamido-4'-isotiocianoestilben-2-2'-disulfónico

TEA: tetraetilamonio

TEA: tetraetilamonio

TRP: canales-receptores a potenciales transientes

INTRODUCCIÓN

Importancia del Volumen Celular.

Para amortiguar los efectos del ambiente externo en constante cambio, los organismos animales mantienen un medio interno estable mediante su regulación por mecanismos que controlan la ingestión y la excreción de agua y electrolitos. De esta forma, las células del organismo se encuentran fisiológicamente expuestas a un líquido intersticial isosmótico; sin embargo, aún en condiciones de osmolaridad controlada, a nivel celular se generan microgradientes osmóticos locales y transitorios a consecuencia de funciones celulares básicas, tales como procesos de transporte de sustancias nutritivas, exocitosis de productos celulares, movimientos del citoesqueleto, síntesis y degradación de macromoléculas, entre otros. La interacción adecuada a nivel intracelular de enzimas y cofactores requiere, sobre todo en algunos tipos celulares, la preservación de la organización intacta de los compartimientos intracelulares que puede alterarse como consecuencia de un cambio brusco en el volumen de los espacios acuosos entre ellos. Para mantener este requerimiento estructural son necesarios mecanismos de regulación del volumen intracelular que funcionan de manera paralela a los que regulan la interacción de la célula con el medio externo. Un cambio en el volumen significa para la célula la pérdida de la homeostasis, ya que implica una modificación en la concentración y distribución espacial de iones y moléculas, afectando, por un lado, la compleja red de señalización que regula la comunicación intracelular basada en los niveles de mensajeros presentes y en la interacción espacial de moléculas y, por otro lado, el funcionamiento general de la célula, en parte, por alterar el metabolismo al modificarse las concentraciones de enzimas, sustratos, iones y cofactores (O'Neill, 1999). La preservación de este importante mecanismo homeostático, de regulación del volumen celular, a través de la escala evolutiva nos da una idea de la importancia adaptativa que tiene para la célula (Chamberlin y Strange, 1989).

La membrana plasmática de las células animales está formada por una bicapa lipídica que es impermeable a las proteínas, altamente permeable al agua y, en menor grado y de manera selectiva a varios solutos de bajo peso molecular. En ausencia de gradientes de presión hidrostática significativos, el flujo neto de agua a través de la membrana está determinado por la formación de un gradiente de presión osmótica que se genera al existir

una diferencia en la concentración de los componentes celulares con el exterior. Por ello, al inicio de la exposición a un medio anisomótico la mayoría de las células se comportan como osmómetros perfectos, incrementando su volumen por entrada de agua al enfrentarse a una disminución en la concentración de solutos osmoticamente activos en el medio extracelular y experimentan un encogimiento por salida de agua cuando el medio tiene una osmolaridad superior a la intracelular. Sin embargo, inmediatamente después, las células ponen en marcha mecanismos activos de regulación cuya eventual falla produciría lisis celular (Pasantés-Morales *et al.*, 2006b).

El mantenimiento de un volumen celular constante se encuentra mayormente comprometido en condiciones patológicas, como todas aquellas en las que se asocia un estado de hiponatremia, tal es el caso del síndrome de excreción inadecuada de la hormona antidiurética (SIDH) que básicamente consiste en una liberación excesiva de dicha hormona o en la polidipsia psicótica durante la cual se ingieren grandes cantidades de agua. Las células pueden también incrementar su volumen en condiciones externas de osmolaridad controlada por una falla en los mecanismos de transporte de solutos osmoticamente activos, tales como iones o moléculas orgánicas pequeñas. Esta situación puede llevar a un cambio en la distribución iónica característica de la fisiología de la célula, con el consiguiente cambio en el contenido de agua. Esta alteración ocurre en condiciones de isquemia, epilepsia, en la encefalopatía hepática o en el trauma cranoencefálico. En todos estos casos se genera edema celular, que en el caso de la hiponatremia se denomina edema anisomótico y en el caso de que el hinchamiento ocurra en condiciones isomóticas como las mencionadas, se conoce como edema citotóxico. En esta investigación nos enfocamos a condiciones que generan un aumento en el volumen celular en condiciones hiposmóticas sin abordar situaciones de edema citotóxico o de decremento en el volumen.

Inmediatamente después de que se presenta una disminución en la osmolaridad del medio extracelular, la célula pone en marcha un proceso de regulación de volumen que tiene como objetivo final la salida de solutos osmoticamente activos u osmolitos acompañados de agua osmoticamente obligada, para así restablecer el equilibrio osmótico con la nueva condición externa (Lang *et al.*, 1998). Este proceso activo de compensación de volumen que ocurre aún cuando la condición hiposmótica permanezca, ha sido denominado Decremento Regulador del Volumen (DRV) y consta de una cadena

de eventos en la que se pueden distinguir tres componentes básicos: (1) inicialmente la célula detecta el cambio en volumen mediante un mecanismo sensor de volumen que además sirva como memoria para detener la respuesta adaptativa una vez que se ha regresado al tamaño original, (2) a continuación se desencadenan una o varias cascadas de transducción que amplifican la señal iniciada por el sensor y la conectan con las vías de movilización de los osmolitos, (3) por último la activación de estas vías y la salida de los solutos osmóticamente activos permite establecer un nuevo equilibrio osmótico entre el entorno modificado y la nueva condición intracelular (Chamberlin y Strange, 1989; Sánchez-Olea y Pasantes-Morales, 1993; Okada *et al.*, 2001) (Figura 1).

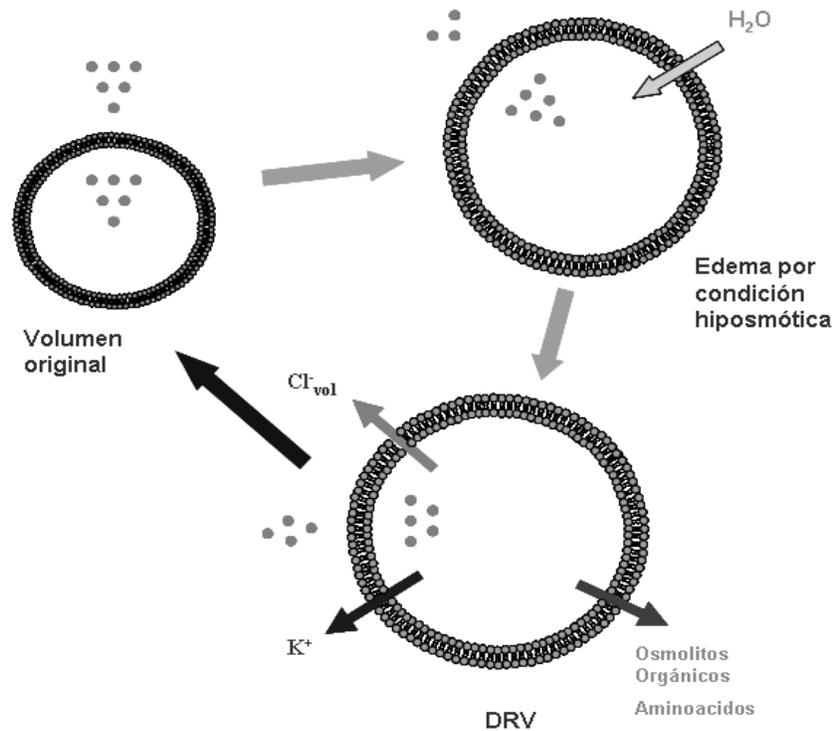


Figura 1. Para afrontar un aumento en volumen inducido por una condición hiposmótica las células animales cuentan con un mecanismo activo de regulación de volumen el cual ha sido denominado Decremento Regulator del Volumen (DRV). Durante este proceso se activan vías de salida de osmolitos para reestablecer la condición de volumen original. Los osmolitos pueden ser de tipo inorgánico (principalmente iones Cl^- y K^+) y moléculas orgánicas de bajo peso molecular dentro de los que se encuentran aminoácidos como la taurina, el glutámico y la glicina.

Osmolitos.

Los solutos osmoticamente activos tienen la característica de encontrarse en forma libre, disueltos en el citoplasma. Los osmolitos que la célula utiliza para el DRV son esencialmente de dos tipos: i) iones inorgánicos, principalmente Cl^- , K^+ y en menor medida Na^+ (Grinstein *et al.*, 1982; Roy y Sauve, 1987); y ii) compuestos de tipo orgánico de bajo peso molecular. Los osmolitos orgánicos son un grupo heterogéneo de pequeñas moléculas que están presentes en altas concentraciones dentro de las células. Los que comúnmente participan en la regulación del volumen son la urea, compuestos metilados (metilaminas, glicerofosforilcolina y betaina), polialcoholes (sorbitol o inositol), aminoácidos libres y sus derivados como glutamina, glutamato, glicina, GABA y taurina. (Balaban y Burg, 1987; Smith y Pierce, 1987; Nakanishi *et al.*, 1988; Wirthensohn *et al.*, 1989). Algunos de ellos tienen la propiedad de que no alteran significativamente la estructura y función de las macromoléculas intracelulares, por lo que pueden acumularse a elevadas concentraciones. La contribución de los solutos orgánicos e inorgánicos en los procesos de regulación del volumen varía de acuerdo al tipo celular estudiado y la naturaleza del cambio osmótico. En general la movilización de los iones es más rápida que la de los osmolitos orgánicos, pero la de estos últimos es más sostenida.

En el grupo de los osmolitos orgánicos, los aminoácidos parecen tener un papel importante en la regulación. Entre éstos, la taurina puede considerarse un osmolito ideal en virtud de que sus características le permiten moverse dentro y fuera de la célula sin perturbar ninguna de las funciones celulares. Este aminoácido se encuentra en concentraciones muy elevadas en el citoplasma, casi en su totalidad en forma soluble; en particular, en las células de tejidos como el corazón, el músculo esquelético, el tejido nervioso y los tejidos secretores como las glándulas pineal y pituitaria (Jacobsen y Smith, 1968; Huxtable, 1992). No forma parte de la estructura de las proteínas, y no participa en ninguna reacción metabólica, con excepción de la formación del ácido taurocólico. Su carácter de elemento terminal en el catabolismo de la cisteína le confiere un costo energético de producción notablemente bajo, lo que agrega una ventaja adicional única para su participación como osmolito. La taurina es un β -aminoácido sulfónico, tiene un $\text{pK}_{a1}=1.5$ y un $\text{pK}_{a2}=8.82$ y a pH fisiológico se encuentra como zwitterion (ión dipolar con cargas positiva y negativa separadas en el espacio). La salida de taurina se moviliza en respuesta a un incremento en el volumen celular y su liberación incrementa con

disminuciones crecientes en la osmolaridad del medio de incubación (Sánchez-Olea *et al.*, 1991; García *et al.*, 1991).

Otros aminoácidos que también actúan como osmolitos, tales como el GABA y el glutamato, tienen funciones como neurotransmisores, por lo que en el tejido nervioso su liberación al espacio extracelular puede modificar la excitabilidad neuronal. Lo mismo puede decirse para los osmolitos de tipo iónico, el K^+ y el Cl^- debido a que juegan un papel determinante en el mantenimiento del potencial de membrana y en el tejido nervioso, por lo que su movilización hacia el espacio extracelular en respuesta a un incremento en el volumen, cambia el valor de este potencial y puede traer como consecuencia la movilización de neurotransmisores y la puesta en marcha de un mecanismo de comunicación interneuronal con consecuencias importantes. Así se ha visto que la hiponatremia induce un incremento en la amplitud y la duración de los potenciales excitatorios postsinápticos. Esto podría deberse a la movilización del glutamato como un osmolito sumado a la despolarización causada por una movilización rápida del Cl^- en respuesta al cambio en el volumen. Estas modificaciones pueden ser también responsables de la mayor sensibilidad a las convulsiones que se asocia con la hiponatremia severa (Pasantes-Morales y Tuz, 2006).

Mecanismos de Movilización de Osmolitos.

Las vías de movilización de iones y osmolitos orgánicos en condiciones hiposmóticas han sido estudiadas con detalle y se ha llevado a cabo una caracterización de sus propiedades en términos de propiedades electrofisiológicas, en el caso de los canales que movilizan a los iones y su perfil farmacológico. Sin embargo en ningún caso se ha logrado identificar de manera específica a la especie molecular encargada de la movilización de los osmolitos.

En la mayor parte de los tipos celulares, la salida de Cl^- y K^+ , se lleva a cabo a través de la apertura selectiva de canales activados ya sea propiamente por el incremento en el volumen o por la conjunción de elementos asociados a este incremento, como se mencionará más tarde. Los canales para Cl^- y para K^+ funcionan de manera selectiva en cada caso, pero son interdependientes al menos por el imperativo de mantener la electroneutralidad. Los canales de cloro regulados por volumen (Cl^-_{vol}) han sido

identificados en numerosos tipos celulares y la mayoría muestran características electrofisiológicas y biofísicas semejantes lo que sugiere que existe solo un tipo de canal de Cl⁻ involucrado en el DRV. Los Cl⁻_{vol} son típicamente canales de rectificación saliente, con una conductancia unitaria de 40-78 pS a potenciales positivos y de 10-20 pS a potenciales negativos con una inactivación dependiente de voltaje generalmente por encima de +60 mV; exhiben una alta selectividad por los aniones sobre los cationes, entre los aniones son selectivos a una amplia variedad siendo permeables a la mayoría de los aniones monovalentes, incluyendo los de gran tamaño como el gluconato, benzoato, tiocianato y metanosulfonato y poseen una secuencia de selectividad aniónica Eisenman tipo I: SCN⁻>I⁻>Br⁻>Cl⁻>F⁻>gluconato (Okada, 1997; Nilius *et al.*, 1997). La activación de los Cl⁻_{vol} requiere de ATP más no de su hidrólisis. El canal es sensible a los bloqueadores generales de canales de Cl⁻ tales como DIDS, SITS, 9-AC, DCPIB, NPPB, DDFK, ácido niflúmico y ácido flufenámico. El ácido araquidónico y otros ácidos grasos poliinsaturados también modulan la función del Cl⁻_{vol} (Jackson y Strange, 1993; Sánchez-Olea *et al.*, 1993; Okada, 1997; Bres *et al.*, 2000; Decher *et al.*, 2001). La naturaleza molecular del Cl⁻_{vol} permanece desconocida, aún cuando un cierto número de canales de Cl⁻ han sido clonados hasta el momento, y algunos de ellos son sensibles a osmolaridad, ninguno exhibe todas las propiedades descritas para el Cl⁻_{vol}. Existen algunas moléculas que tienen entre sus características la de una permeabilidad al Cl⁻ y que durante la búsqueda de la identidad del canal Cl⁻_{vol} se ha sugerido que juegan un papel importante como reguladores o propiamente como la vía de salida del Cl⁻ son la glicoproteína-P (Valverde *et al.*, 1992; Higgins, 1995), el canal CIC-2 de la familia de canales dependientes de voltaje (Grunder *et al.*, 1992) y los canales aniónicos dependientes de voltaje VDAC (Thinnes *et al.*, 2000).

La participación del K⁺ en el DRV, se debe a que es el ión más abundante en el interior de la célula. En contraste con el Cl⁻_{vol}, que presenta características similares en los diferentes tipos celulares, las observaciones sugieren que la salida de K⁺ tiene múltiples vías, en algunos casos los canales que participan son canales presentes en la célula, involucrados en otras funciones celulares, pero que se activan por fenómenos concurrentes con la hiposmolaridad y el cambio en volumen, como pueden ser un aumento en el Ca²⁺ intracelular o la despolarización iniciada por la activación temprana de canales de Cl⁻ y en otros casos, cuando no parece haber ningún otro factor asociado, podría pensarse en un canal de K⁺ activado únicamente por hiposmolaridad o por volumen.

En la mayor parte de las células epiteliales, los canales de K^+ activados por volumen son dependientes de Ca^{2+} que pertenecen, en su mayoría, al tipo BK (canales de K^+ de conductancia grande activados por Ca^{2+}), se activan a concentraciones micromolares de Ca^{2+} , presentan una conductancia de 100-200 pS y son inhibidos por iberiotoxina y caribdotoxina. (Pasantes-Morales y Morales Mulia, 2000) Como resultado de la función de estos canales, la primera respuesta de las células epiteliales al incremento en volumen es una hiperpolarización y sólo posteriormente se activan los canales de Cl^- . En los demás tipos celulares, incluyendo astrocitos y algunas neuronas, la activación de la corriente de Cl^- precede a la de K^+ , lo que conduce a una despolarización, la cual estaría activando canales Kv (canales de K^+ activados por voltaje) ya que la salida de K^+ es bloqueada por tetraetilamonio (TEA), un inhibidor típico de canales de K^+ dependientes de voltaje (Baraban, 1997). En relación con un canal de K^+ exclusivamente activado por hiposmolaridad se ha descrito un tipo de canal de K^+ activado directamente por cambios físicos de la membrana durante la hiposmolaridad (K^+_{vol}), este tipo de canal posiblemente pertenece a la familia de los canales de dos poros y más específicamente al subtipo TASK-2, debido a que es el único de la familia con rectificación saliente, es insensible a los inhibidores clásicos de K^+ pero puede ser inhibido mediante clofilio, gadolinio y quinidina (Niemeyer *et al.*, 2001).

En cuanto a la vía de permeabilidad de los osmolitos orgánicos, para la mayor parte de ellos se reconoce que se trata de una vía de tipo difusional con las siguientes características: (a) el flujo molecular es bidireccional, dependiente del gradiente electroquímico presente, (b) se trata de un transporte no saturable e independiente de Na^+ y energía, (Sánchez-Olea, *et al.* 1991; Junankar y Kirk, 2000), (c) su perfil farmacológico es notablemente similar a la de Cl^-_{vol} ya que es inhibida por diversos tipos de bloqueadores generales de canales de Cl^- tales como el DIDS, dipiridamol, NPPB, DCPIB, DDF, ácidos grasos poliinsaturados y ácido niflúmico (Pasantes-Morales *et al.*, 1996). Esta característica ha sugerido la posibilidad de que la vía común para la salida de osmolitos orgánicos sea un canal aniónico muy similar o inclusive que sea el propio canal de Cl^- activado por hiposmolaridad. Este aspecto no ha podido ser aclarado todavía, ya que existen algunas evidencias que parecen contradecir esta hipótesis, y sobre todo, debido a que como se mencionó anteriormente, ni el Cl^-_{vol} ni la vía de movilización de los osmolitos orgánicos han podido ser identificados molecularmente. Una alternativa para

explicar la sensibilidad de la vía de transporte de los osmolitos orgánicos a los bloqueadores de canales de Cl⁻ es que un elemento modulador de esta vía sea justamente el nivel de cloro intracelular, de forma tal que al impedir que haya un decremento en los niveles de Cl⁻ la vía de los osmolitos orgánicos no se active.

El Mecanismo Sensor del Volumen.

A pesar de que el mecanismo sensor del aumento en volumen es el elemento inicial y un factor clave en la cadena de acciones encaminadas a la recuperación del volumen original de la célula, hasta el momento no se ha podido identificar su naturaleza. Aún no se sabe si esta tarea se encuentra a cargo de un solo tipo de molécula o de un grupo de moléculas que interactúan para finalmente detectar el cambio en volumen y poner en marcha los procesos correctores (Jakab *et al.*, 2002).

Diversos elementos cuya activación es inducida por hiposmolaridad han sido propuestos como los involucrados en el proceso sensor, a nivel de membrana podrían funcionar como osmoreceptores algunas moléculas de adhesión como las integrinas, receptores con actividad cinasa de tirosinas (RTK) como los receptores a factores de crecimiento y los canales-receptores a potenciales transientes (TRP). En el medio intracelular, las señales sugeridas para detectar el cambio en volumen comparten la característica de ser consecuencia de la entrada de agua al medio intracelular como lo son los cambios en el citoesqueleto, la reducción del agrupamiento macromolecular por dilución ó la disminución en la fuerza iónica (Motais *et al.*, 1991; Al-Habori, 2001; Cannon *et al.*, 1998; Cardin *et al.*, 1999; Wittels *et al.*, 2000; Hoffmann y Pedersen, 2006).

Entre los mecanismos sugeridos, los que han recibido mayor atención son los RTK y los TRP. Los RTK son típicamente proteínas transmembranales que tienen un dominio extracelular con el sitio para el reconocimiento de su ligando y un dominio intracelular en el que se encuentran tanto sitios con actividad de cinasa de tirosinas como sitios de fosforilación. Es esta característica constitutiva de estar situados a nivel de la membrana, con la capacidad de tener contacto tanto con el medio y la composición extracelular como con el medio intracelular, la que sugiere la idea de que pueden estar involucrados en el paso inicial y más aún desencadenar señales hacia diferentes vías, ya que, los RTK son el sitio de convergencia de una gran variedad de cascadas de señalización que finalmente

conducen a la expresión de múltiples funciones celulares. Tras su activación los RTK que generalmente se encuentran como monómeros en la membrana sufren un cambio de conformación en el dominio extracelular lo cual induce la dimerización del receptor que permite a los dos dominios citoplasmáticos fosforilarse uno al otro sobre varios residuos de tirosina (autofosforilación) (Hackel *et al.*, 1999). La activación de los RTK es desencadenada típicamente por la unión de su ligando específico; sin embargo, otros estímulos en ausencia de ligando pueden promover su activación como la radiación, el estrés oxidativo o el estiramiento de la membrana como sucedería después de cambios en la osmolaridad externa (Dent *et al.*, 2003). Durante el hinchamiento hiposmótico se ha observado la activación de diferentes tipos de RTK y su papel clave en la activación de otras cinasas de tirosina, blancos también de la hiposmolaridad. También existe una conexión entre RTK e integrinas y otras moléculas de adhesión como p125FAK que se encuentra ligada a la vía de fosforilación del RTK. Otras vías de señalización que convergen en los RTK incluyen la vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) y la vía antiapoptótica conformada por PI3K y Akt. Aún cuando no se ha comprobado la función de los RTK como moléculas sensoras de cambios en el volumen es claro que estos desempeñan un papel importante en las señales tempranas de osmotransducción (Pasantes-Morales y Franco, 2002; Franco *et al.*, 2004a; Lezama *et al.*, 2005).

Otras moléculas propuestas para realizar la función de sensar los cambios en el volumen celular son los TRP. Por ejemplo, el TRPV4 es un integrante de la familia de los TRP que tiene entre sus propiedades el ser un canal catiónico activado tanto por hiposmolaridad como por estiramiento de la membrana. Inmediatamente después de un choque hiposmótico el TRPV4 es fosforilado en la tirosina 253 probablemente por una cinasa citosólica de la familia de src; mutaciones en el sitio de fosforilación de estos canales indican que es el responsable del aumento de Ca^{2+} inducido por hiposmolaridad, sin embargo, esto solo tiene importancia en aquellas células en las que la regulación de volumen es dependiente de Ca^{2+} , en los demás tipos celulares es poco claro el papel del TRPV4 en la osmotransducción (Mizuno *et al.*, 2003; Liedtke *et al.*, 2005; Becker *et al.*, 2005).

Finalmente, las integrinas, son glicoproteínas transmembranales que reúnen características suficientes para ser propuestas dentro de los posibles osmosensores,

entre las que destacan, su papel fundamental como moléculas de adhesión de la célula a la matriz extracelular y su interacción a nivel intracelular con el citoesqueleto y moléculas de la red de señalización osmótica como las cinasas p38 y src así como con elementos que tienen que ver con la dinámica del citoesqueleto (Pedersen *et al.*, 2001; Haussinger *et al.*, 2006).

Osmotransducción.

Las vías de señalización que conectan el cambio en volumen con la activación de los efectores que conducen a la recuperación del volumen, es decir, la osmotransducción, están poco estudiadas. Como parte de la etapa de osmotransducción se han encontrado dos respuestas celulares claramente inducidas por hiposmolaridad, por un lado la activación de proteínas con actividad cinasa de tirosina (Pasantés-Morales *et al.*, 2006a; Tilly *et al.*, 1993) y por otro el incremento en los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ (McCarty y O'Neil, 1992).

En diversos tipos celulares, la liberación osmosensible de taurina se reduce considerablemente con distintos inhibidores de cinasas de tirosina y se potencia por bloqueadores de fosfatasa de tirosina (Deleuze *et al.*, 2000; Mongin *et al.*, 1999a; Morales-Mulia *et al.*, 2001). Entre las proteínas con actividad cinasa de tirosina que se han identificado como parte de la vía de osmotransducción por su clara activación por hiposmolaridad se encuentran, en la parte citosólica, las MAP cinasas ERK1/2 y p38, p125FAK, miembros de la familia src y en la región transmembranal, los receptores a factores de crecimiento, a los que se ha hecho ya referencia anteriormente (Haussinger y Schliess, 1999; Tilly *et al.*, 1993; de la Paz *et al.*, 2002; Franco *et al.*, 2004a; Lezama *et al.*, 2005). A pesar de estar claramente involucradas, aún no se conoce con certeza cual es el papel exacto que desempeñan en la osmotransducción. En general, el DRV es un fenómeno sumamente complejo que desencadena una gran variedad de respuestas celulares, muchas de las cuales no están directamente relacionadas con la recuperación del volumen y, más bien, se encuentran encaminadas a procesos como la reorganización del citoesqueleto impuesta por la condición de hinchamiento, el reacomodo de elementos a nivel de una membrana distendida y acciones para la supervivencia de la célula ante el estrés originado por la hiposmolaridad. Tomando en cuenta estos elementos, las diversas cinasas de tirosina que se activan por el cambio en volumen podrían estar asociadas a

una o varias de estas distintas reacciones de adaptación. Por ejemplo, p125FAK estaría involucrada en una reacción de adhesión celular, p38 puede estar actuando como un sensor de estrés mientras que ERK1/2 estaría relacionada con las señales de supervivencia. En cambio, se ha visto que tanto el receptor al factor de crecimiento epidermal (EGFR) como PI3K si están involucradas con la salida correctiva de algunos osmolitos (Pasantes-Morales y Franco, 2002).

El aumento en el $[Ca^{2+}]_i$ es una de las respuestas más consistentes inducidas por hinchamiento hiposmótico; sin embargo, como se mencionó anteriormente muchas células regulan su volumen mediante activación de canales de Cl^- , K^+ y flujo de osmolitos independientes al $[Ca^{2+}]_i$. El hinchamiento celular promueve tanto la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular como su liberación de pozas internas ubicadas en la mitocondria o en del retículo endoplásmico, de esta última se libera a través del canal activado por inositol trifosfato (IP_3). Se han descrito diversas vías para la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular; entre ellas destacan los canales activados por estiramiento (SACs), vías sensibles a dihidropiridinas, entrada de Ca^{2+} capacitiva (CCE) y a través del intercambiador Na^+/Ca^{2+} (Tsuzuki *et al.*, 2000; Bulow y Johansson *et al.*, 1994; Souza *et al.*, 2000).

Existe evidencia que muestra que aún cuando en diversos tipos celulares la liberación osmosensible de taurina sea independiente de Ca^{2+} , tiene un “calcio permisivo”, esto es, una concentración basal mínima aproximadamente entre 40 y 50 nM (Szucs *et al.*, 1996; Mongin *et al.*, 1999b). El calcio puede estar influyendo en el DRV mediante la activación de canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} , al participar en la remodelación del citoesqueleto, al promover exocitosis de osmolitos o al activar proteínas como la calmodulina (CaM) (Lang *et al.*, 1998; Kinne *et al.*, 1993; Hook y Means, 2001). La CaM esta involucrada directamente en la activación de proteínas cinasas dependientes de Ca^{2+} (CaMK) y se ha visto que el uso de inhibidores de estas proteínas disminuye tanto el DRV como la liberación de osmolitos (Pasantes-Morales y Morales-Mulia, 2000). El calcio también puede estar actuando como un modulador de la respuesta reguladora del volumen ya que se ha descrito que al aumentar los niveles de calcio durante la hiposmolaridad muy por encima de la concentración basal usando ionomicina, un ionóforo de Ca^{2+} , se potencia tanto la salida osmosensible de taurina como la regulación de volumen en astrocitos en cultivo, el papel del Ca^{2+} se describió únicamente como modulador de la respuesta

reguladora del volumen activada por hiposmolaridad debido a que en condiciones isosmóticas un aumento en Ca^{2+} de la misma magnitud inducida por el ionóforo no tiene efecto alguno sobre la salida de taurina (Cardin *et al.*, 2003).

Participación de Receptores Acoplados a Proteínas G en la Regulación del Volumen.

Los efectos de potenciación por Ca^{2+} antes descritos plantean la posibilidad de que un aumento de este ión pero inducido de manera fisiológica, como sería el caso de la activación de receptores acoplados a proteínas G (RAPG), tenga el mismo efecto modulador del DRV. Recientemente se han identificado algunos RAPG como elementos moduladores sobre algunas respuestas del mecanismo de regulación del volumen. Los RAPG constituyen la mayor familia de receptores membranales y tras la unión con sus ligandos, activan proteínas G heterotriméricas a las que se encuentran acoplados, mediante el reemplazo de GDP por GTP. Las proteínas G son un complejo de tres subunidades α , β y γ que al activarse se disocian en α y $\beta\gamma$, pudiendo ambos complejos activar a su vez moléculas efectoras específicas. Existen varios tipos de proteínas $G\alpha$ y dependiendo del subtipo que se encuentre acoplada al receptor es la vía de señalización que se va a activar. Los RAPG inducen un aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular mediante la activación de la proteína $G\alpha_q$; tras la unión del receptor a la proteína $G_{q/11}$ se activa la fosfolipasa C (PLC) que lleva a cabo la catálisis de fosfatidilinositol-bifosfato (PIP_2) en membrana generando inositol-trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG). El IP_3 eleva los niveles de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ liberando Ca^{2+} a través de los canales activados por IP_3 ubicados en el retículo endoplásmico. El DAG junto con el Ca^{2+} activan a la proteína cinasa C (PKC) en sus isoformas clásicas (α , β y γ) (Babich *et al.*, 1990; Hung *et al.*, 1992).

Se ha observado que el ATP a través de receptores metabotrópicos purinérgicos $\text{P2Y}_{2,4}$, miembros de la familia de los RAPGs, potencia la activación de canales de Cl^- activados por volumen, canales de K^+ y la liberación de glutamato y taurina (Darby *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 1996; Dezaki *et al.*, 2000; Mongin y Kimelberg, 2002, 2005; Light *et al.*, 2001; Franco *et al.*, 2004b). El ATP, tiene influencia sobre la liberación osmosensible de taurina únicamente cuando las vías de señales conocidas han sido activadas, lo que le confiere un papel modulador y no propiamente activador. La potenciación por ATP es dependiente

de Ca^{2+} intracelular mediado por PLC y se abate completamente al usar conjuntamente inhibidores de CaMKII y PI3K. La potenciación también es sensible a diversos inhibidores de proteínas cinasas (Franco *et al.*, 2004b).

Existen estudios que postulan la participación del ATP como regulador autocrino que activa de manera directa los mecanismos involucrados en el DRV, ya que la hiposmolaridad induce la liberación de ATP (Feranchak *et al.*, 2000; Light *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 1996).

La Trombina Como Agonista de PARs.

La trombina es una proteasa de serinas, generada a partir de la proenzima protrombina en respuesta a una herida, sin embargo, recientemente además de conferírsele un papel importante en la coagulación sanguínea y reparación tisular se conoce más bien como una molécula que produce señales multifuncionales en diversos tipos celulares a través de la activación proteolítica de receptores membranales conocidos como receptores activados por proteasas (PARs); este tipo de receptores pertenecen la superfamilia de RAPGs. En el caso del receptor a trombina, el mecanismo de activación es único y sumamente interesante, ya que el ligando es parte del receptor mismo y permanece encriptado hasta que la trombina por su actividad de proteasa corta al pro-receptor en un sitio específico dejando al descubierto una nueva secuencia N-terminal que se une intramolecularmente con la segunda asa extracelular del propio receptor, esta unión induce cambios conformacionales en el receptor que le permite activar a las proteínas G heterotriméricas. (Hirano y Kanaide, 2003; Coughlin, 2000; Hollenberg, 2003; Macfarlane *et al.*, 2001)

Existen cuatro miembros de la familia de los PARs hasta ahora identificados PAR₁₋₄ denominados así en orden a su descubrimiento, cada uno de ellos tiene distintos sitios de corte N-terminal y distintas secuencias de unión intramolecular, dos de ellos son activados por trombina el PAR₁ y PAR₄ mientras que el PAR₃ puede ser cortado por trombina pero no se activa y en cambio tiene como agonista principal a la tripsina al igual que el PAR₂ (Coughlin, 2000; Hollenberg, 2003; Macfarlane *et al.*, 2001).

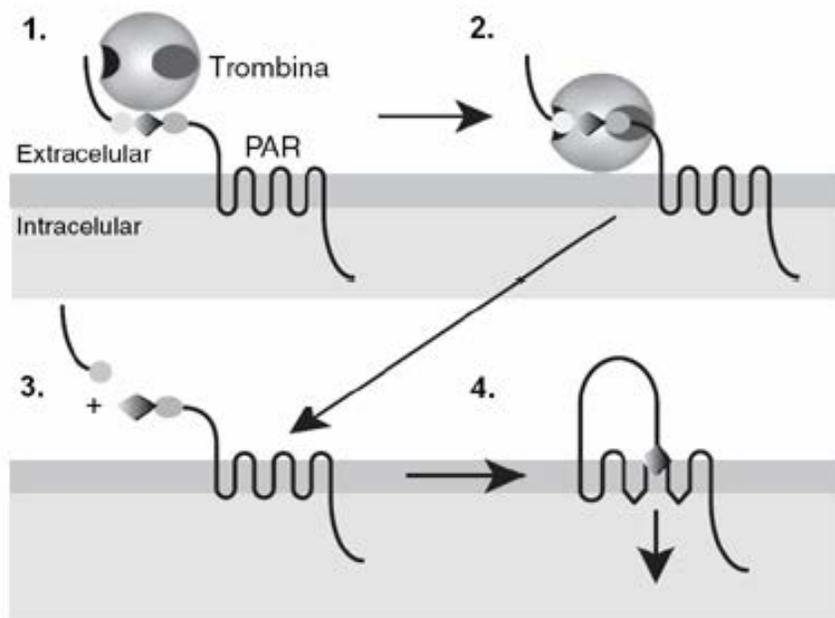


Figura 2. Mecanismo de activación de los Receptores Activados por Proteasas (PAR). El receptor PAR activado por trombina es un receptor perteneciente a la superfamilia de RAPGs. La trombina (esfera [1.]) es una proteasa que reconoce un exodominio del PAR por una doble interacción [2.]. La trombina corta al receptor PAR en una secuencia específica del sitio amino-terminal “desenmascarando” una nueva secuencia amino-terminal [3.]. La nueva secuencia actúa como un autoligando que se une al cuerpo del receptor en la segunda asa extracelular. Después de la unión de su ligando el receptor cambia de conformación y desencadena su vía de señalización al interior de la célula [4.].

La distribución de los PARs no solo se limita a las células involucradas en la reparación tisular como plaquetas, células endoteliales o de músculo liso sino también en tipos celulares como los neutrófilos, leucocitos, neuronas y células de la glia; de igual manera se ha encontrado que no solo existen mecanismos generadores de trombina en la sangre sino que también existen extravascularmente como en el cerebro (Gingrich *et al.*, 2000). Esto pone en manifiesto que, la trombina por medio de activación de PARs es capaz de producir respuestas en una gran cantidad de sistemas fisiológicos.

Al igual que otros RAPGs los PARs pueden unirse a múltiples tipos de proteínas G heterotrimericas que varían en cuanto a la subunidad α ; existen al menos cuatro principales vías de señalización a las que pueden estar asociados, ya que se conoce que

los receptores a trombina son capaces de estimular las proteínas G_q (α_q), G_i (α_i), G_{12} (α_{12}) y G_{13} (α_{13}) y por su parte, la señalización del complejo $\beta\gamma$. De esta forma un PAR puede desencadenar la inhibición de la producción de AMPc si interacciona con la proteína G inhibitoria G_i (Hung *et al.*, 1992; Kanthou *et al.*, 1996); tras la unión del receptor a la proteína $G_{q/11}$ se pone en marcha la catálisis de fosfatidilinositol-bifosfato (PIP_2) mediante la activación de la fosfolipasa C (PLC), dicha catálisis de PIP_2 genera inositol-trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG), por su parte el IP_3 eleva los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ liberando Ca^{2+} de reservas en el retículo endoplásmico y el DAG junto con el Ca^{2+} activan a la proteína cinasa C (PKC) en sus isoformas clásicas (α , β y γ) (Babich *et al.*, 1990; Hung *et al.*, 1992). Y finalmente la activación de G_{12}/G_{13} parece regular señales hacia citoesqueleto mediante la estimulación de la polimerización de actina y la formación de fibras de estrés (Buhl *et al.*, 1995; Gohla *et al.*, 1999) (Fig. 3).

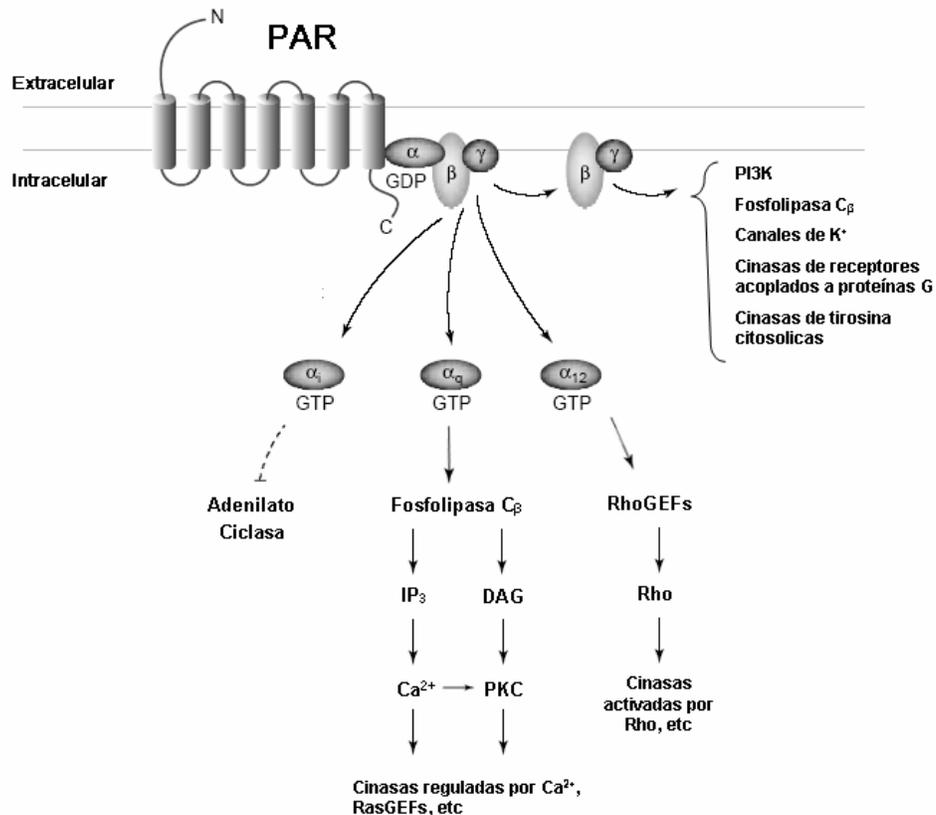


Figura 3. Los receptores PAR pueden acoplarse a las proteínas G_{α_q} , G_{α_i} y $G_{12/13}$ y activar diversas de redes de señalización hacia diferentes respuestas celulares. La señalización dirigida por $G_{12/13}$ provee una vía Rho-dependiente de respuesta en citoesqueleto. G_{α_q} conduce a la movilización de Ca^{2+} de depósitos intracelulares y activación de proteínas reguladas por Ca^{2+} mientras que tras la activación de G_{α_i} se inhibe la actividad de la adenilato ciclasa que origina a una disminución en los niveles de AMP cíclico. Por su parte, la subunidad $\beta\gamma$ influye en la activación de PI3K, proteínas cinasas y canales iónicos.

Interacción entre RAPGs y RTKs.

En la vía de señalización clásica de los RAPGs, la estimulación del receptor lleva a la activación de las proteínas G heterotriméricas, cuya ruta efectora se describió a grandes rasgos anteriormente. Recientemente, se ha propuesto que los RAPGs ejercen sus efectos no sólo a través de esta vía clásica, si no que también hay interacciones entre diferentes sistemas de transducción celular, lo que le permite a la célula integrar la gran cantidad de señales que recibe de su ambiente (Selbie y Hill, 1998; Hur y Kim, 2002; Gschwind *et al.*, 2001; Marinissen y Gutkind, 2001).

La transactivación del EGFR es la representante del paradigma de comunicación cruzada entre RAPGs y RTKs. Se ha reportado la transactivación del EGFR por actividad de diversos RAPG entre los que se encuentran el receptor a bradikinina, angiotensina, LPA, trombina, bombesina, endotelina y el muscarinico a acetilcolina (Daub *et al.*, 1997; Darmoul *et al.*, 2004; Gschwind *et al.*, 2001; Pierce *et al.*, 2001; Prenzel *et al.*, 1999).

Dentro de los mecanismos que se han sugerido como los involucrados en el fenómeno de transactivación del EGFR figuran la activación de metaloproteasas y de la cinasa citosólica src (Fig. 4). La activación de metaloproteasas inducida por el RAPG es Zn^{2+} -dependiente, y aún se desconoce mucho sobre el mecanismo directo de activación; las metaloproteasas cortan el precursor del ligando parecido a EGF que se encuentra unido a la membrana en la zona extracelular y cuando es liberado se une al EGFR activándolo y desencadenando su vía de señalización (Hur y Kim, 2002; Prenzel *et al.*, 1999). Existe evidencia de la activación de src por interacción directa con la subunidad α_s/α_i o el complejo $\beta\gamma$ tras la activación de un RAPG (Ma *et al.*, 2000; Pierce *et al.*, 2001; Hur y Kim, 2002; van Biesen *et al.*, 1996). Src es una cinasa citosólica que se encuentra dentro de la casacada de transducción clásica que se desencadena posterior a la activación del EGFR, sin embargo, si se activa a través de otro mecanismo es capaz de influir sobre EGFR, fosforilando y activándolo en ausencia de ligando, esto le confiere un papel clave en el fenómeno de transactivación (Bromann *et al.*, 2004; Abram y Courtneidge, 2000).

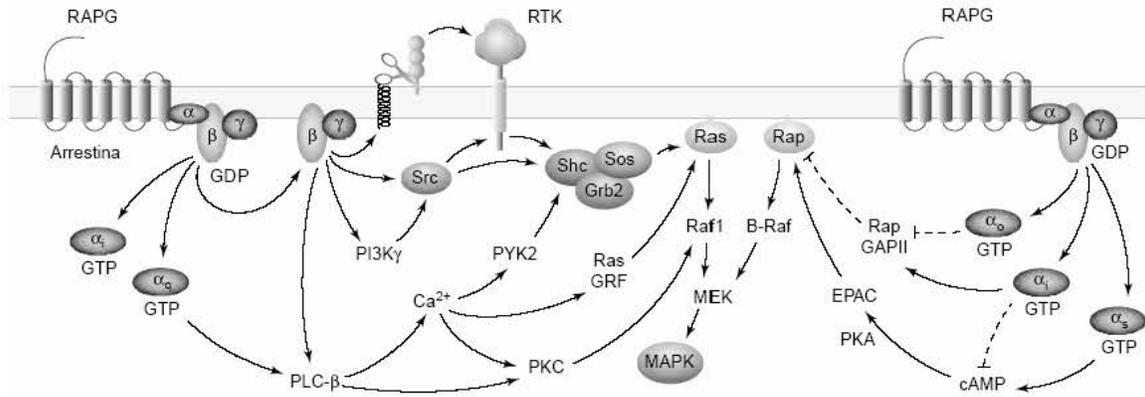


Figura 4. La vía de señalización clásica de los RAPG puede interactuar con otras redes de señalización celular. La transactivación del receptor EGFR es la representante del paradigma de comunicación cruzada entre RAPGs y RTKs. Dentro de los intermediarios propuestos para el fenómeno de transactivación figuran la activación de metaloproteasas y/o src (Marinissen y Gutkind, 2001).

Con antecedentes descritos, el presente proyecto de investigación contempla los siguientes objetivos:

OBJETIVO GENERAL

Identificar y caracterizar el papel modulador de la trombina en la liberación hiposmótica de taurina, así como en el proceso de regulación de volumen celular.

Objetivos particulares.

- I. Estudiar el efecto potenciador de la trombina sobre la liberación de taurina a distintas reducciones en la osmolaridad externa.
- II. Determinar el papel de la vía clásica de señalización activada por la trombina en la potenciación de la liberación hiposmótica de taurina, haciendo énfasis en el aumento en $[Ca^{2+}]_i$.
- III. Identificar si existe comunicación entre la vía desencadenada por la trombina con proteínas tirosina cinasas activadas por hiposmolaridad.
- IV. Estudiar el efecto de la trombina sobre la regulación de volumen así como la influencia de los distintos inhibidores usados para identificar la vía de potenciación de la liberación de taurina sobre la regulación del volumen.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo celular.

Se utilizó la línea celular de fibroblastos de ratón Swiss-3T3. Para propósitos experimentales los fibroblastos se sembraron en cajas de 35 mm a una densidad de 1.5×10^5 células/caja para mediciones de salida de taurina con marcaje radioactivo y en cajas de 60 mm a 5×10^5 células/caja con cubreobjetos rectangulares (10 mm x 50 mm) para estimaciones en cambios en el volumen celular. Las células se cultivaron en medio basal Eagle con 10% de suero fetal bovino, 2 mM de glutamina, 50 U/ml de penicilina y 50 μ g/ml de estreptomycin y se usaron 48 horas después de haber sido sembradas. Las cajas en cultivo se incubaron a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂ y 95% de aire.

Soluciones y fármacos.

El medio isosmótico se preparó utilizando (en mM): 135 NaCl, 5KCl, 1.17 MgSO₄, 1 CaCl₂, 10 glucosa y 10 HEPES dando una osmolaridad final de 300 mOsm y ajustando el pH a 7.4. Para obtener los medio hiposmótico H10%, H20%, H30% y H50% se disminuyó la concentración de NaCl de tal manera que la osmolaridad final fuera de 270, 240, 210 y 150 mOsm respectivamente. La osmolaridad de todas las soluciones usadas se determinó en un osmómetro de punto de congelación marca Pressision System. En el caso de medios libres de calcio se sustituyó el CaCl₂ por MgCl₂ y se agregó 0.5mM de EGTA, el cual no alteró de manera significativa la osmolaridad del medio. Para el tratamiento con los distintos fármacos, las condiciones de preincubación se indican en los pies de figura. Todos los fármacos estuvieron presentes durante todo el experimento, excepto el EGTA-AM que sólo se preincubó 30 min.

Los fármacos AG1478, PP2, EGTA-AM, Queleritrina, Gö6976, KN-93 y W-7 fueron de Calbiochem-Novabiochem Corp. (San Diego, CA). La trombina se obtuvo a través de Vital Products Inc. (Boynton Beach, FL.). Los reactivos para la elaboración de los medios utilizados se adquirieron de Merck (Darmstadt, Germany). Y el fármaco U-73122 de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

Experimentos de liberación de ³H-aurina.

Para determinar la liberación de taurina, se cambió el medio de cultivo de las cajas (35 mm) por medio isosmótico en el que se agregó 0.5 µCi/mL de ³H-aurina. El marcador radioactivo se preincubó para su incorporación durante una hora. Posteriormente, las células se comenzaron a perfundir, reemplazando completamente el medio cada minuto durante 15 minutos con medio isosmótico y a continuación durante 8 minutos con el medio hiposmótico solo o con 5 unidades de trombina disueltas. Después de 10 minutos con lavados isosmóticos se consigue estabilizar la línea basal, por lo que las colectas se hicieron a partir del lavado o minuto 11 obteniendo 5 colectas para determinar la salida de ³H-aurina en condiciones control (isosmóticas) y 8 muestras del estímulo (hiposmótico ó hiposmótico más trombina). Al concluir el experimento, se removieron completamente las células de la caja para tomarlas como la última muestra. La radioactividad presente en el lisado así como de cada colecta se determinó en un contador de centelleo líquido marca Beckman Coulter. Los resultados se expresan como el porcentaje de liberación de cada muestra respecto al total de la marca incorporada durante la carga (suma de las muestras colectadas y lisado). Para elaborar las gráficas de liberación neta de ³H-aurina se sumaron los 5 puntos máximos de liberación hiposmótica a los que se les restaron los 5 basales.

Estimación de cambios en el volumen celular.

Las mediciones del volumen celular se realizaron estimando cambios relativos en el volumen celular utilizando el sistema de dispersión de luz de ángulo amplio descrito en Pedersen *et al.*, 2002. Primeramente se cambió el medio de cultivo de las cajas con los cubreobjetos por medio isosmótico y se dejó adecuar a las células durante 20 minutos. Los cubreobjetos se introdujeron verticalmente en celdas para espectrofluorómetro con 2 mL de medio isosmótico en un ángulo de 50° respecto a la luz de excitación; se utilizó un espectrómetro de luminiscencia marca Fluoromax-3, Horiba. La excitación se calibró a 585 nm usando una lámpara de Argón-arc y la emisión se detectó a la misma longitud de onda. Después de colocar la celda en el espectrofluorómetro y establecer los parámetros, se comenzó la medición que duró 600 segundos, en los primeros 100 segundos se midió la emisión en medio isosmótico para determinar la emisión basal, después se diluyó con 1 mL de agua el medio isosmótico que contenía a las células obteniendo la hiposmolaridad

deseada (H30%), en los casos en los que se indica se agregó trombina al agua de dilución. Los resultados se expresan como la función inversa de la señal de emisión obtenida ya que la intensidad de luz se correlaciona inversamente con el volumen celular. La gráfica curso-temporal del cambio en volumen se construyó con el cociente I_0 / I_t en la que I_0 es la medida promedio de la señal de emisión basal (medio isosmótico) y I_t es la emisión obtenida al tiempo t.

Análisis estadístico.

Todos los datos estadísticos se muestran como promedios \pm el error estándar del promedio. La significación estadística, para comparaciones múltiples, se determinó usando análisis de varianza (ANOVA) seguido de una prueba de Tukey. Para comparaciones pareadas, se utilizó solamente la prueba de Student.

RESULTADOS

La trombina potencia la liberación osmosensible de taurina.

La liberación de taurina en un cultivo de fibroblastos Swiss 3T3 expuesto a un medio extracelular cuya osmolaridad se encuentra reducida en un 30% (H30%) es inmediata al estímulo y durante su curso-temporal aumenta de un 0.26% basal en medio isosmótico a un máximo de 2.8% durante el segundo minuto de exposición a la condición hiposmótica. Después de alcanzar el máximo, la liberación de taurina disminuye progresivamente hasta acercarse a los niveles basales en el octavo minuto. Esta liberación muestra una clara potenciación si en el medio hiposmótico se disuelven 5 unidades de trombina alcanzando un pico máximo al los 2 minutos en el que la liberación alcanza un 10.3% (Fig. 1).

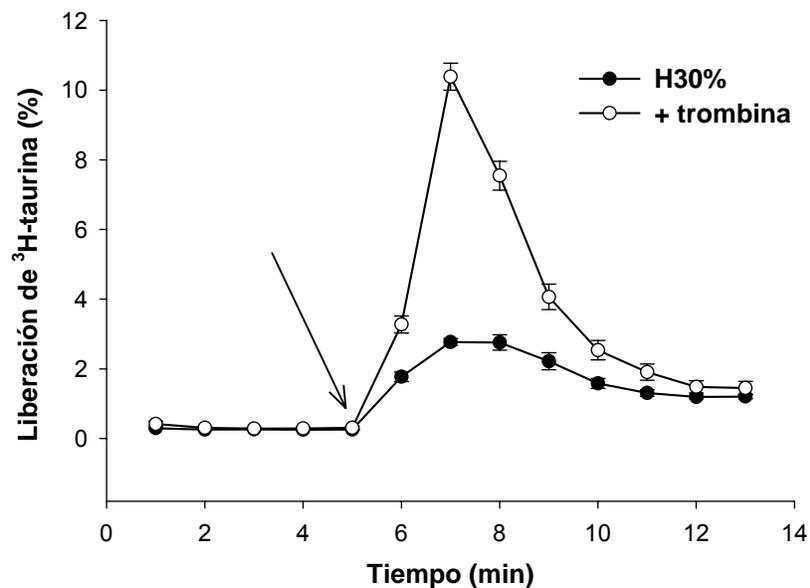


Figura 1. Efecto de la trombina sobre la liberación de taurina inducida por hiposmolaridad en cultivos de fibroblastos Swiss 3T3. Las células preincubadas con ³H-taurina fueron perfundidas con medio isosmótico y se obtuvieron colectas durante 5 min; posteriormente, en el momento indicado por la flecha, el medio se cambió por medio hiposmótico 30% (●), 5 U de trombina se agregaron al medio hiposmótico (○).

A diferentes osmolaridades la trombina consigue aumentar en distintos grados la liberación hiposmótica de taurina. Se examinó el efecto de la trombina adicionada a los estímulos hiposmótico 10, 20, 30 y 50% así como el efecto de agregar trombina en ausencia de estímulo hiposmótico (Fig. 2). La potenciación máxima se observa con un

medio hiposmótico 20%; sin embargo, debido a la escasa liberación de taurina que evoca el medio H20% y para efectos comparativos con el uso de inhibidores se utilizó como control la potenciación con medio H30%.

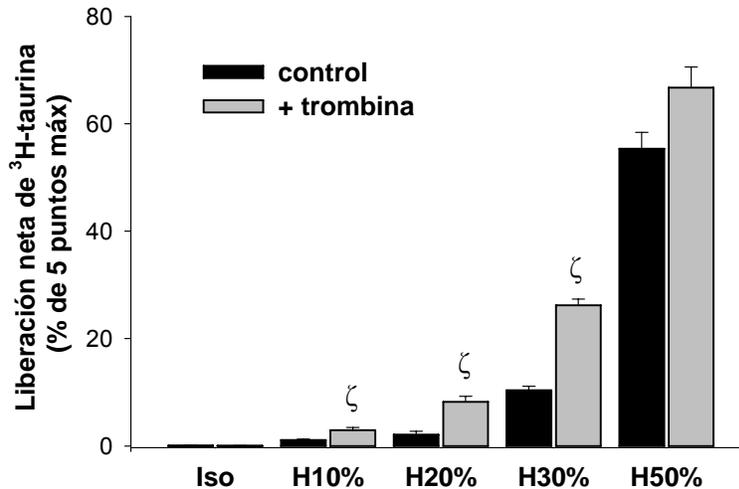


Figura 2. Efecto de la trombina sobre la liberación de ³H-aurina en respuesta a varias reducciones en la osmolaridad del medio: H10%, H20%, H30% H50% o en medio isosmótico, que corresponden a 270, 240, 180, 150 y 300 mOsm respectivamente. Las barras representan un porciento neto de taurina liberada por hiposmolaridad en cinco puntos máximos; esto es, la suma del porcentaje de las primeras cinco colectas después del estímulo hiposmótico menos el de liberación de las 5 muestras basales.

La potenciación por trombina sobre la liberación de taurina exhibe un comportamiento que se asemeja al que describe una curva de tipo Gaussiano. La trombina agregada en condiciones isosmóticas no induce por si sola liberación de taurina. Utilizando un medio hiposmótico 10% la potenciación alcanza un valor 174% por encima de la liberación de taurina inducida por esta misma osmolaridad en ausencia de trombina, indicando que el efecto de la trombina es sensible a hiposmolaridad. La mayor potenciación, en función de la osmolaridad, como se mencionó, se encuentra en el H20% (alrededor de 271%), después de esta osmolaridad se observa un cambio en la tendencia y la potenciación comienza a disminuir regresando a un punto cercano a 152% cuando el medio es hiposmótico 30% y aún cuando la liberación hiposmótica de taurina es mayor en H50% la potenciación está por debajo de la alcanzada por el H10% alcanzando sólo 20% más sobre el H50% sin trombina (Fig. 3). Este comportamiento se explica por el hecho de que la liberación osmosensible de taurina es un proceso saturable que tiene un comportamiento sigmoide, es decir, tiene tres fases, una inicial ante una disminución

pequeña en la osmolaridad, una exponencial entre reducciones en la osmolaridad del 20 al 50% y por encima del hiposmótico 50% inicia la fase estacionaria en la que la liberación de taurina ya no aumenta significativamente aún cuando la reducción en la osmolaridad sea mayor (Franco *et al.*, 2004b).

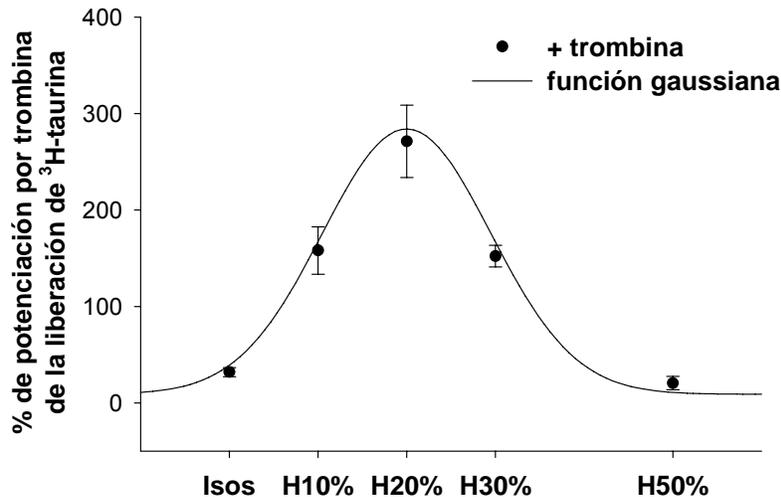


Figura 3. La potenciación por trombina en función de la reducción de la osmolaridad tiene un comportamiento que se asemeja al que describe una curva Gaussiana. Los datos se muestran como el porcentaje de aumento la liberación de taurina respecto al control de la misma osmolaridad en ausencia de trombina.

La potenciación por trombina es parcialmente dependiente de Ca^{2+} , fosfolipasa C (PLC) y sensible a bloqueadores de proteínas activadas por Ca^{2+} .

Debido a que una de las respuestas desencadenadas con la activación del receptor a trombina tras el reclutamiento de $G_{\alpha q}$ es la activación de PLC_{β} cuya vía, como ya se mencionó, induce posteriormente la liberación de Ca^{2+} de la poza intracelular ubicada en el retículo endoplásmico, se procedió a investigar el nivel de participación sobre la potenciación por trombina del Ca^{2+} , PLC y de algunas proteínas de señalización cuya activación es dependiente del aumento de las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} .

La liberación potenciada por trombina fue parcialmente sensible al tratamiento con U73122 (5 μM), un inhibidor de PLC, disminuyendo 46%; para medir la participación del Ca^{2+} se usaron medios libres del ión y se preincubó con EGTA-AM 25 μM , un quelante de

Ca²⁺ intracelular con esto se obtuvo una inhibición de 55%, similar a la obtenida con U73122 (Fig. 4).

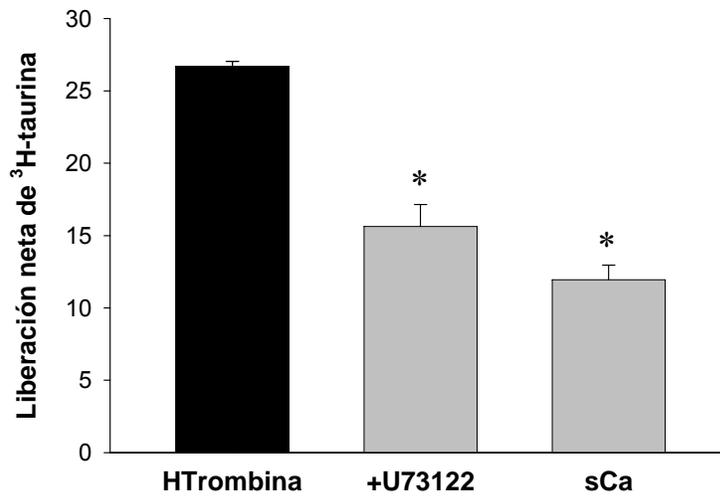


Figura 4. Efecto de los antagonistas de la vía de liberación de Ca²⁺ y de la actividad del Ca²⁺ liberado sobre la potenciación por trombina de la liberación H30% de ³H-aurina (HTrombina). El U73122 se preincubó 30 min y estuvo presente durante todo el experimento. En el caso del medio sin calcio (sCa) se preincubó con EGTA-AM 25µM 30 min y posteriormente el experimento se realizó con medio libre de calcio en ausencia del quelante. Los datos están expresados como en la figura 2 y son promedios de *n*=6-8.

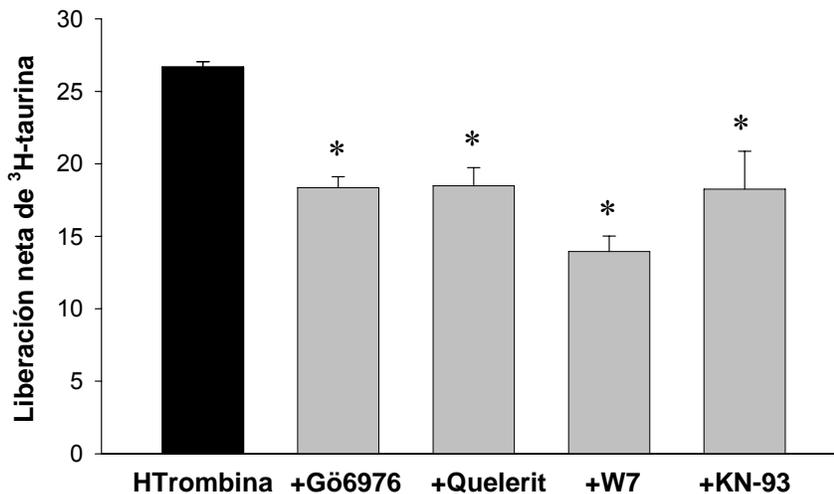


Figura 5. Participación de proteínas de la vía de G_{αq}/Ca²⁺ en la potenciación de la liberación H30% de taurina por trombina. Los inhibidores (barras grises) se preincubaron durante 30 min y estuvieron presentes durante todo el experimento a las concentraciones indicadas en el texto. Los datos están expresados como en la figura 2 y son promedios de *n*=4-6.

Para examinar la participación de proteínas reguladas por Ca^{2+} , que sería el paso siguiente en la vía de señalización de $\text{G}_{\alpha\text{q}}/\text{Ca}^{2+}$, se usaron inhibidores para PKC, CaM y CaMKII. Para investigar el papel de PKC se utilizaron Gö6976 (1 μM) un inhibidor de las isoformas dependientes de Ca^{2+} y queleritrina 5 μM , un antagonista más general de las diversas PKCs; ambos disminuyeron la liberación en 30%. Para CaM y CaMKII se utilizaron W-7 (50 μM) y KN-93 (10 μM) respectivamente, disminuyendo 48 y 31% el efecto de la trombina (Fig. 5).

EGFR y src están involucrados en la potenciación por trombina.

La reciente descripción de la participación de receptores con actividad cinasa de tirosina (RTK) en la respuesta a hiposmolaridad, en específico del EGFR (Franco *et al.*, 2004a; Lezama *et al.*, 2005), así como la existencia de numerosos trabajos en los que se ha caracterizado la comunicación cruzada entre RAPG's y RTK's motivaron el estudio de una posible comunicación entre PAR-EGFR.

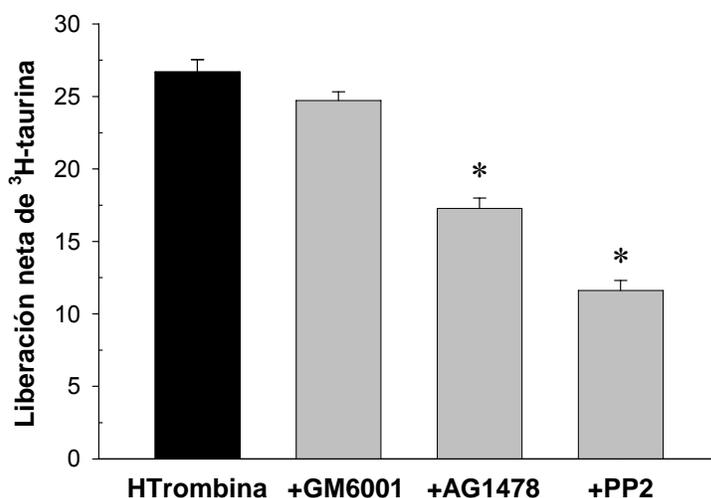


Figura 6. Participación de EGFR y src en la potenciación de la liberación H30% de ^3H -taurina por trombina (barra negra). Los inhibidores AG1478 10 μM (EGFR), PP2 10 μM (src) y GM6001 40 μM (metaloproteasas) se preincubaron 30 min y estuvieron presentes durante todo el experimento. Los datos están expresados como en la figura 2 y son promedios de $n=8-10$.

Como posibles intermediarios encargados directamente de la fosforilación de EGFR tras la activación de PAR se encuentran las metaloproteasas y la proteína cinasa citosólica src

(Marinissen y Gutkind, 2001), por ello se investigó su papel en la potenciación por trombina. La potenciación disminuyó 35% al agregar AG1478, un antagonista selectivo de EGFR, en el caso en el que se utilizó PP2 para inhibir src disminuyó en un 56% y al bloquear la acción de las metaloproteasas con GM6001 (40 μ M) no se observó alguna reducción significativa (Fig. 6).

La potenciación de la liberación de taurina por trombina tiene dos componentes independientes.

Para determinar si la vía de Ca^{2+} involucrada en la potenciación se encontraba de alguna forma relacionada con la vía de cinasas se examinó el grado de inhibición alcanzado por antagonistas de ambas vías usados en conjunto durante un experimento. Para el caso del PP2, al utilizarlo junto con Queleritina la liberación disminuyó hasta 76%, con U73122 ó medio sin Ca^{2+} la reducción en ambos casos fue similar 93-90% y en conjunto con AG1478 la inhibición no superó significativamente la obtenida por PP2 solo (Figura 7).

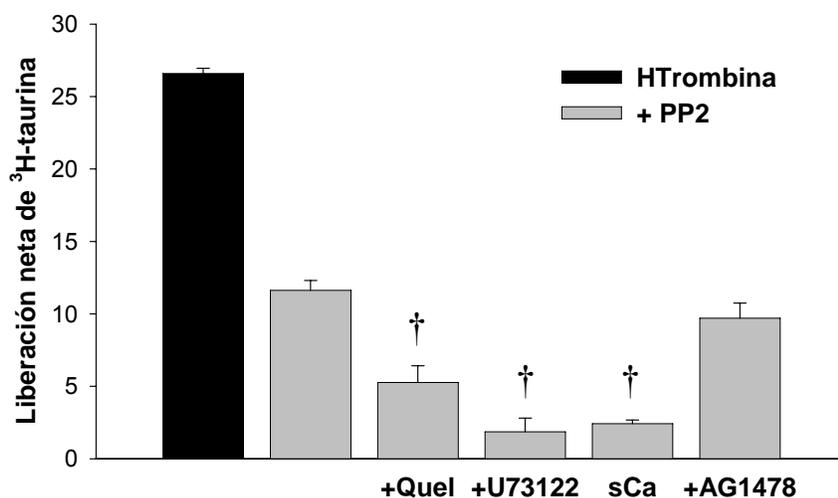


Figura 7. Efecto del uso conjunto de PP2 10 μ M con: queleritina 5 μ M, U-73122 5 μ M, medio sin calcio preincubado con EGTA-AM o AG1478 10 μ M sobre la potenciación de la liberación H30% de 3H -taurina por trombina (barra negra). Las células se preincubaron con los fármacos durante 30 min y estuvieron presentes durante todo el experimento. Los datos se expresan como en la figura 2 y son promedios de $n=4-6$.

Cuando se utilizó AG1478 junto con los inhibidores de la vía de Ca^{2+} también se observaron reducciones mayores a las obtenidas con el AG1478 por si solo, junto con

queleritrina disminuyó 53%, y nuevamente con U73122 ó sin Ca^{2+} se obtuvieron resultados similares 67-71% (Figura 8).

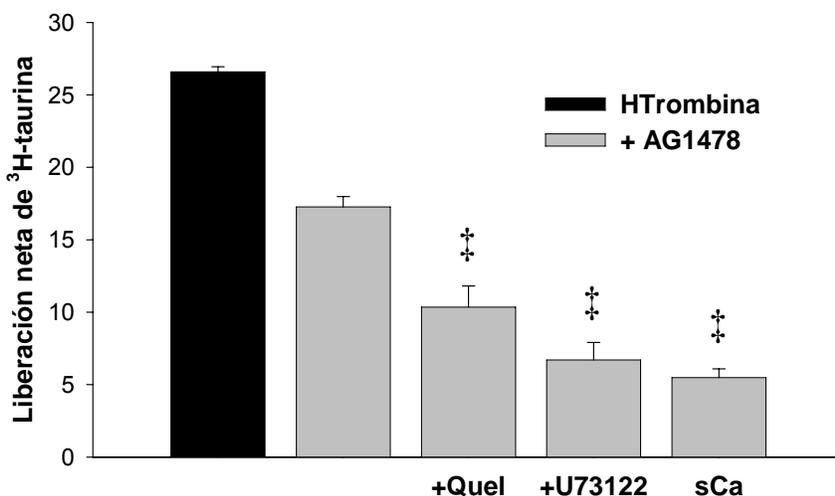


Figura 8. Efecto del uso conjunto de AG1478 10 μM con queleritrina 5 μM , U-73122 5 μM ó medio sin calcio preincubado con EGTA-AM 25 μM . sobre la potenciación de la liberación H30% de ^3H -taurina por trombina (barra negra). Las células se preincubaron con los fármacos durante 30 min y estuvieron presentes durante todo el experimento. Los datos se expresan como en la figura 2 y son promedios de $n=4-6$.

La regulación de volumen en condiciones hiposmóticas se potencia por trombina.

Aún cuando la taurina no es el osmolito más importante, en cuanto a contribución en la regulación del volumen celular, sigue un curso temporal muy cercano al descrito por el DRV (Pasantes-Morales y Schousboe, 1988; Cardin *et al.*, 1999). Por ello se abordó el estudio de la regulación de volumen en presencia de trombina. Los experimentos se realizaron de acuerdo a lo descrito en la sección de metodología.

En condiciones hiposmóticas los fibroblastos 3T3 regulan su volumen aproximadamente 33% después de 8 min del choque hiposmótico; al agregar trombina junto con la condición hiposmótica, se consigue, en el mismo lapso de tiempo, una regulación cercana al 70% (Fig. 9), esto es, 110% más que la alcanzada en medio ausente de trombina.

La potenciación de la regulación de volumen tiene componentes similares a la potenciación de liberación de taurina.

Para determinar la influencia de las vías involucradas en la potenciación de la liberación de taurina sobre la regulación del volumen se probaron tanto los inhibidores de cinasas de

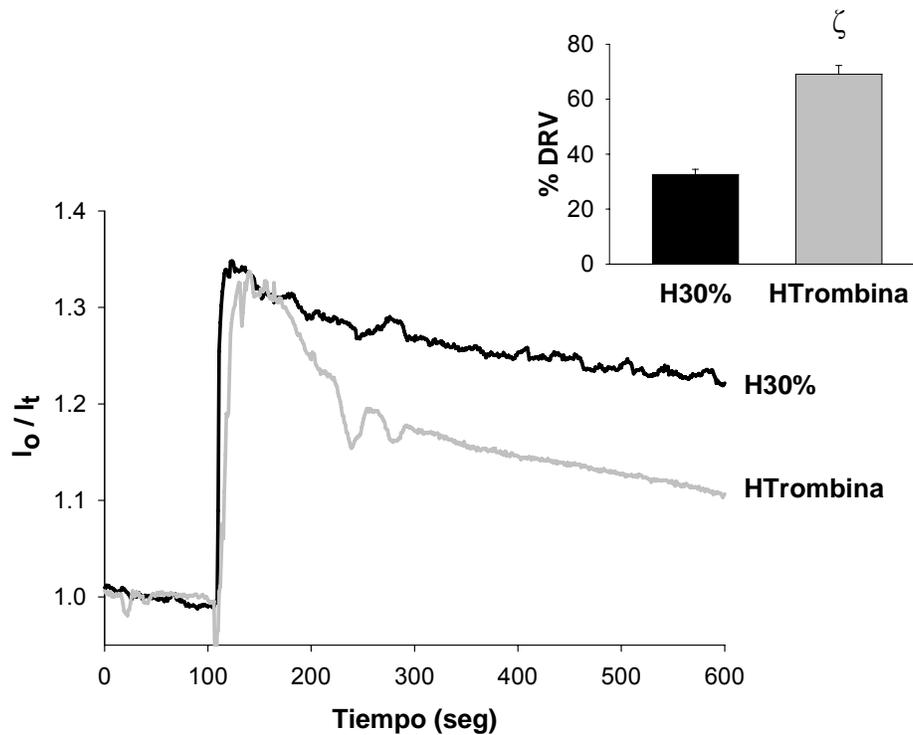


Figura 9. Efecto de la trombina sobre la regulación del volumen en condiciones de hiposmolaridad 30% en cultivos de fibroblastos Swiss 3T3. La gráfica muestra el curso temporal de la regulación de volumen de la condición H30% y H30% más trombina, como I_o/I_t descrito en la metodología. En el panel de arriba los datos se expresan en barras como el porcentaje de regulación alcanzado 8 min después del choque hiposmótico y son promedios de $n=8-10$

tirosina como medio libre de calcio. La inhibición alcanzada por AG1478 10 μ M fue de alrededor de 36%, la obtenida con PP2 10 μ M de 48% y usando medio libre de calcio con EGTA-AM o U73122 se logró una inhibición de 47% y 36%. Para determinar si en la regulación del volumen de estas dos vía también eran independientes se realizó un experimento en el que se probó PP2 conjuntamente con medio libre de Ca²⁺ preincubado con EGTA-AM, la inhibición como se pensó fue aditiva disminuyendo 92% (Fig. 10).

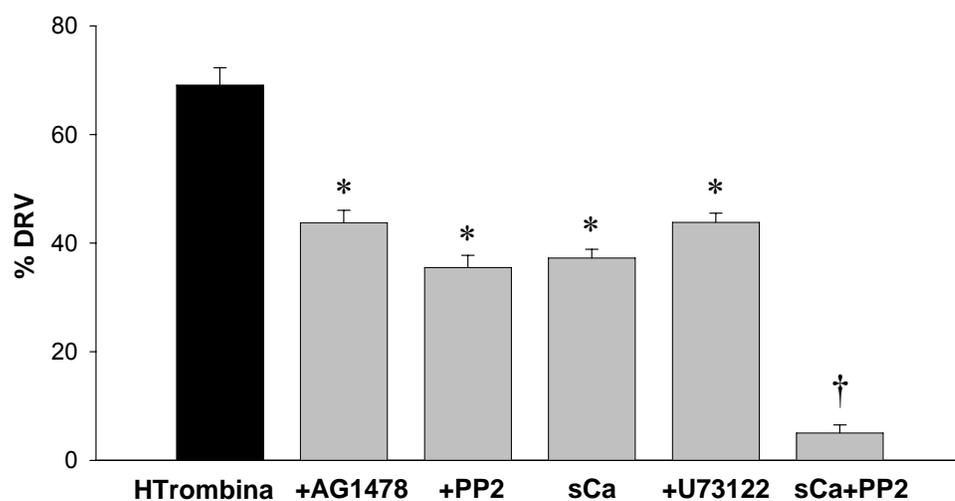


Figura 10. Papel de las cinasas EGFR y src así como del Ca^{2+} en la potenciación por trombina de la regulación del volumen. Los inhibidores AG1478 10 μM (EGFR), PP2 10 μM (src) y U73122 (PLC) se preincubaron durante media hora y estuvieron presentes durante todo el experimento. Para ver el efecto aditivo del Ca^{2+} se utilizaron medios libres del ión en el transcurso de todo el experimento y se agregó EGTA-AM antes del experimento. Los datos se expresan como en la figura 10 y son promedios de $n=5-7$ experimentos.

DISCUSIÓN

Como se ha descrito ampliamente en la introducción, el DRV es un proceso que se pone en marcha como respuesta al aumento en volumen celular y que culmina con la salida de solutos osmoticamente activos que finalmente restablecen la condición de volumen original. En este estudio se encontró que la trombina tiene una acción potenciadora sobre la liberación hiposmótica de taurina, el aminoácido representativo del grupo de los osmolitos orgánicos. El aumento en la salida de taurina por trombina se observa desde una reducción mínima en la osmolaridad externa, más no en condiciones isosmóticas, lo que hace pensar que es necesario el aumento en volumen inducido por la condición hiposmótica y que la trombina está actuando sobre los mecanismos activados en respuesta al cambio en volumen y no como un iniciador *per se* de la respuesta; por lo que su papel es de tipo modulador y no directamente involucrado en el mecanismo sensor de volumen.

La trombina activa a los receptores a proteasas que, de forma característica, desencadenan la liberación de $[Ca^{2+}]_i$ del retículo endoplásmico por la apertura de canales de Ca^{2+} sensibles a IP_3 . El hecho de que la liberación de taurina se atenúa en un 55% al prevenir el incremento en $[Ca^{2+}]_i$ y de forma muy similar al prevenir la operación de la vía desencadenada por PLC sugiere que la acción de la trombina se debe en parte al aumento en Ca^{2+} por IP_3 que proviene de la activación de PLC. El Ca^{2+} es un segundo mensajero muy importante y puede estar involucrado en la activación de diversas proteínas o canales dependientes de Ca^{2+} (McCarty y O'Neil, 1990; Pierce y Politis, 1990). En nuestro sistema parece haber proteínas dependientes de Ca^{2+} que están participando en la potenciación, tal es el caso de PKC y CaM/CaMKII. La inhibición de PKC con queleritrina, un inhibidor general de diversas de sus isoformas, consiguió una reducción del 30%, el mismo porcentaje que Gö6976 un inhibidor de isoformas dependientes de Ca^{2+} lo que está apuntando hacia la participación únicamente de isoformas dependientes de Ca^{2+} en el fenómeno.

El grado de participación del Ca^{2+} en la potenciación de la liberación hiposmótica de taurina parece depender del tipo de RAPG que se estimula; ya que, el nivel de intervención del Ca^{2+} observado en nuestro estudio por la activación del receptor a trombina, es muy similar al que se presenta con agonistas de receptores muscarínicos o

purinérgicos (Franco *et al.*, 2004b; Mongin y Kimelberg, 2005; Heacock *et al.*, 2004), pero difiere del que se observa tras la activación del receptor al LPA o al S1P, en donde el ión parece tener una participación poco relevante (Heacock *et al.*, 2006). Esta divergencia se presenta aún cuando, en todos los casos mencionados, la activación del RAPG correspondiente induce un aumento en el nivel de $[Ca^{2+}]_i$ (Franco *et al.*, 2004b; Heacock *et al.*, 2006). La dependencia o independencia de Ca^{2+} del fenómeno de potenciación, parece estar relacionada con la fuente de la que proviene el Ca^{2+} liberado al citosol, ya que, tanto en nuestro modelo, como en aquellos sensibles al Ca^{2+} , el aumento de este, parece estar vinculado a la actividad de PLC. En respuesta a la activación del receptor muscarínico se observa un aumento significativo en la liberación de IP_3 , y en el caso del receptor purinérgico, el aumento en el Ca^{2+} por ATP se suprime al agregar el inhibidor de la actividad de PLC; en cambio, en la potenciación por activación del receptor al LPA o al S1P no se encontró liberación de IP_3 lo que involucra necesariamente, una fuente para el aumento de $[Ca^{2+}]_i$ distinta a la poza ubicada en el retículo endoplásmico y una vía independiente de la actividad de PLC. Otra diferencia entre los miembros pertenecientes a RAPGs que han sido estudiados, en cuanto a señalización en la potenciación de la respuesta hiposmótica de liberación osmolitos, es el nivel de participación de la proteína PKC, ya que mientras que en la liberación por activación del receptor muscarínico o al LPA tiene una notable participación (Heacock *et al.*, 2004; Heacock *et al.*, 2006), en nuestro estudio su actividad es menos significativa.

Por otra parte, aún cuando el papel del Ca^{2+} parece ser importante en el fenómeno de la potenciación, no es el único mecanismo involucrado, lo que es evidente tras observar solo una disminución de la mitad del efecto de trombina al inhibir la vía de activación y de elevación del $[Ca^{2+}]_i$. Además de esta vía de $[Ca^{2+}]_i$, la trombina, mediante la activación de su receptor PAR, desencadena una amplia variedad de vías de señalización; sin embargo, la investigación se enfocó a la vía de las proteínas con actividad de cinasa de tirosina tanto citosólicas como en membrana, que han demostrado tener una gran influencia sobre la regulación del volumen celular. La activación de receptores de la familia del EGFR así como de la cinasa src en respuesta a hiposmolaridad esta ampliamente descrita y sustentada (Haussinger y Schliess, 1999; Tilly *et al.*, 1993; de la Paz *et al.*, 2002; Franco *et al.*, 2004a; Lezama *et al.*, 2005). Los receptores a trombina junto con otros múltiples receptores de la superfamilia de RAPG, como se describió en la introducción, han sido recientemente involucrados en vías de “comunicación cruzada” con

estas proteínas cinasa de tirosinas (Luttrell *et al.*, 1999). Los principales intermediarios, propuestos para la intercomunicación desde el receptor PAR hacia EGFR, son la proteína cinasa citosólica src que puede fosforilar directamente al receptor EGFR y activarlo, y las metaloproteasas que al activarse liberan al ligando de EGFR que se encuentra de manera endógena en la membrana plasmática. El estudio de la participación tanto de src como de las metaloproteasas reveló que, src juega un papel importante en la potenciación por trombina de la liberación de taurina, ya que al inhibir la actividad de esta cinasa citosólica se consigue reducir la respuesta alrededor de 56% y que, al menos en nuestro sistema, las metaloproteasas no están involucradas en el fenómeno de potenciación.

Tanto src como el Ca^{2+} parecen ser los intermediarios con la mayor influencia sobre la vía de transducción de señales que interviene en la potenciación por trombina de la liberación hiposmótica de taurina; estos dos elementos actúan de manera independiente, es decir a través de vías de señalización separadas que finalmente tienen una influencia de tipo modulador sobre la vía de movilización de taurina. Este hecho se desprende claramente de los experimentos en los que al medir la liberación de taurina en presencia de trombina se usaron conjuntamente inhibidores de ambas vías y su efecto, en todos los casos fue aditivo. Esto no ocurrió cuando se probó el antagonista de src junto con el de EGFR, lo que reafirma la idea de que src y EGFR son elementos de la misma vía. La mayor influencia de src a comparación de la de EGFR sobre la potenciación de la liberación hiposmótica de taurina indica que src no está siendo activada exclusivamente por EGFR como en una vía clásica. Lo más probable es que sea activada directamente por el receptor a trombina o por algún elemento de su vía y que de esta forma esta cinasa es el intermediario clave entre la comunicación del receptor a trombina hacia el EGFR. Además de jugar este papel, src puede estar actuando de manera directa sobre la vía de movilización de osmolitos como está descrito en la literatura (Cohen, 2005).

Con base en estos resultados, puede considerarse de manera muy general, que la cascada de señalización desencadenada por la trombina, que tiene influencia directa sobre la potenciación de la liberación hiposmótica de taurina opera a través de los siguientes elementos: 1. el receptor PAR, activado por la trombina, actúa reclutando una proteína G α q, 2. a esto sigue la activación de PLC y la liberación por esta lipasa, de IP_3 / DAG, con el subsecuente aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, 3. ocurre asimismo la activación de isoformas de PKC, así como de otras proteínas, dependientes de Ca^{2+} . A través de otra

vía independiente el receptor a trombina estaría, además, activando directamente a src que fosforila intrínsecamente al receptor EGFR. Así, los elementos que parecen estar directamente actuando sobre la vía de movilización de taurina son tanto el Ca^{2+} , por sí mismo o mediante proteínas dependientes de él, src y una vía dependiente de cinasas de tirosina que involucra a src como elemento primario y a EGFR (Morales-Mulia *et al.*, 2001; Pasantes-Morales y Morales-Mulia, 2000; Tilly *et al.*, 1993; Cohen, 2005).

Ya se ha mencionado que la vía de movilización de taurina activada por un cambio en volumen tiene características que la colocan como representativo de los osmolitos orgánicos; sin embargo, la regulación de volumen es un proceso que conduce a la movilización no solo de moléculas orgánicas, sino también inorgánicas, principalmente Cl^- y K^+ . El perfil farmacológico de la vía de traslocación del Cl^- es muy similar al de la taurina; esta característica y el hecho de que la identidad de la molécula responsable de la salida de estos osmolitos en las dos vías aún se desconoce, ha conducido a que desde hace muchos años se maneje la hipótesis de que ambos osmolitos comparten una misma vía de movilización, es decir, un canal aniónico no selectivo, el cual ha sido denominado canal aniónico regulado por volumen (VRAC). A su vez, este canal estaría regulando la movilización del K^+ por así requerirlo la electroneutralidad. Estas son las tres vías principales requeridas por el DRV, por lo que, de estar el VRAC influido también por la trombina, se podría esperar por una parte, que la trombina potencie el proceso completo del DRV y por otra, complementaria, el que esta potenciación presente una susceptibilidad semejante a los agentes que redujeron el la potenciación por trombina de la liberación de taurina. Los resultados obtenidos en los experimentos diseñados en esta investigación para sustentar dicha posibilidad confirman claramente esta hipótesis.

El estudio de los efectos de la trombina potenciando vías de movilización de osmolitos y la eficiencia del DRV, es una forma de abordar de manera general el estudio de moduladores de la respuesta adaptativa al aumento en volumen celular. Además, sienta las bases para extender la investigación con diferentes orientaciones y en modelos de estudio más complejos. Un ejemplo en este sentido es el estudio del efecto de la trombina sobre los mecanismos de regulación del volumen y sus consecuencias en el sistema nervioso.

Las células del cerebro presentan una especial importancia en cuanto a estudios en regulación del volumen, debido a que las neuronas son células altamente especializadas cuyo funcionamiento depende en gran medida de una alta regulación en la composición del medio que las rodea, así como en la preservación de la compleja citoarquitectura del tejido, por lo que si, de manera patológica, ocurren cambios en el medio extracelular y en el volumen celular comprometerían significativamente su desempeño. Por otra parte, el cráneo impone una limitante física a la expansión de volumen del cerebro, por lo que un aumento rápido y severo en el volumen celular lleva a la compresión del tejido, hay pérdida de funciones y daño vascular, en casos extremos la excesiva presión sobre núcleos de control cardíaco y respiratorio conducen a la muerte.

Nuestro modelo básico de presencia de trombina en condiciones de hinchamiento celular puede presentarse dentro de diversos cuadros patológicos. La trombina es una proteasa que está presente de manera normal en el sistema nervioso y está implicada en procesos de proliferación y cambios morfológicos, entre otros; sin embargo, tanto su síntesis como su actividad están altamente regulados y nunca alcanza elevados niveles de concentración. No obstante, en situaciones patológicas, en las que se pierde la protección de la barrera hematoencefálica y hay permeabilidad de elementos del sistema vascular hacia el sistema nervioso, la trombina alcanza altas concentraciones en el tejido cerebral. Entre las patologías en las que esto se presenta asociado a edema celular se encuentran isquemia, trauma craneoencefálico y epilepsia. La extrapolación a un modelo de esta naturaleza abre, además, interrogantes sobre lo que sucede en torno a otros osmolitos que adquieren mayor importancia en el sistema nervioso, como lo es el glutamato, el cual siendo el neurotransmisor excitador más importante del sistema nervioso también funciona como osmolito. Si como en el caso de la taurina existe una potenciación por la trombina de la liberación de este neurotransmisor, bajo condiciones de hinchamiento celular se podría generar una situación de excitotoxicidad por la sobreactivación de receptores a glutamato. Esto plantea una posible explicación a la muerte celular inducida por altas concentraciones de trombina en células nerviosas que ha sido observada consistentemente (Xi *et al.*, 2003; de Castro Ribeiro *et al.*, 2006). En esta línea se desarrollará la investigación subsecuente a este proyecto.

CONCLUSIÓN.

La trombina, una proteasa agonista de un receptor acoplado a proteínas G, tiene un efecto modulador sobre repuestas celulares evocadas por la hiposmolaridad en fibroblastos Swiss 3T3. La condición de hiposmolaridad más trombina induce un aumento en la liberación osmosensible de taurina y la aceleración del proceso de recuperación del volumen celular.

La potenciación de la respuesta de regulación del volumen celular en fibroblastos por la activación del receptor a trombina está mediada por dos vías primarias de igual importancia y en esencia independientes. La primera incluye respuestas vinculadas a un aumento en los niveles de calcio citosólico desencadenadas comúnmente por el receptor a trombina vía PLC, como son la activación de PKC, CaM y CaMKII. La segunda, basada en el mecanismo de acción de las cinasas de tirosina, tiene a la cinasa citosólica src como elemento principal, la cual, además de ser un importante efector, está involucrada en un proceso de transactivación sobre EGFR.

Las proteínas que evidenciaron tener un papel dentro del efecto modulador de la trombina son elementos de transducción que ponen en marcha el mecanismo final de liberación de taurina, sin embargo, al no conocerse la identidad molecular de la vía de salida de taurina, no es posible evidenciar, en este momento, un efecto directo de estas proteínas.

REFERENCIAS

Abram CL y Courtneidge SA. 2000. Src family tyrosine kinases and growth factor signaling. *Exp Cell Res.* 254:1-13.

Al-Habori M. 2001. Macromolecular crowding and its role as intracellular signalling of cell volume regulation. *Int J Biochem Cell Biol.* 33:844-64.

Babich M, King KL y Nissenson RA. 1990. Thrombin stimulates inositol phosphate production and intracellular free calcium by a pertussis toxin-insensitive mechanism in osteosarcoma cells. *Endocrinology.* 126:948-54.

Balaban RS y Burg MB. 1987. Osmotically active organic solutes in the renal inner medulla. *Kidney Int.* 31:562-64.

Baraban SC, Bellingham MC, Berger AJ y Schwartzkroin PA. 1997. Osmolarity modulates K⁺ channel function on rat hippocampal interneurons but not CA1 pyramidal neurons. *J Physiol.* 498:679-89.

Becker D, Blase C, Bereiter-Hahn J y Jendrach M. 2005. TRPV4 exhibits a functional role in cell-volume regulation. *J Cell Sci.* 118:2435-40.

Bres V, Hurbin A, Duvoid A, Orcel H, Moos FC, Rabie A y Hussy N. 2000. Pharmacological characterization of volume-sensitive, taurine permeable anion channels in rat supraoptic glial cells. *Br J Pharmacol.* 130:1976-82.

Bromann PA, Korkaya H y Courtneidge SA. 2004. The interplay between Src family kinases and receptor tyrosine kinases. *Oncogene.* 23:7957-68.

Buhl AM, Johnson NL, Dhanasekaran N y Johnson GL. 1995. G alpha 12 and G alpha 13 stimulate Rho-dependent stress fiber formation and focal adhesion assembly. *J Biol Chem.* 270:24631-4.

Bulow A, Johansson B. 1994. Membrane stretch evoked by cell swelling increases contractile activity in vascular smooth muscle through dihydropyridine-sensitive pathways. *Acta Physiol Scand.* 152:419-27.

Chamberlin ME y Strange K. 1989. Anisosmotic cell volume regulation: a comparative view. *Am J Physiol.* 257:C159-73.

Cannon CL, Basavappa S y Strange K. 1998. Intracellular ionic strength regulates the volume sensitivity of a swelling-activated anion channel. *Am J Physiol.* 275:C416-22.

Cardin V, Lezama R, Torres-Marquez ME y Pasantes-Morales H. 2003. Potentiation of the osmosensitive taurine release and cell volume regulation by cytosolic Ca²⁺ rise in cultured cerebellar astrocytes. *Glia.* 44:119-28.

Cardin V, Pena-Segura C y Pasantes-Morales H. 1999. Activation and inactivation of taurine efflux in hyposmotic and isosmotic swelling in cortical astrocytes: role of ionic strength and cell volume decrease. *J Neurosci Res.* 56:659-67.

- Cohen DM. 2005. SRC family kinases in cell volume regulation. *Am J Physiol Cell Physiol*. 288:C483-93.
- Coughlin SR. 2000. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature*. 407:258-64.
- Darby M, Kuzmiski JB, Panenka W, Feighan D y MacVicar BA. 2003. ATP released from astrocytes during swelling activates chloride channels. *J Neurophysiol*. 89:1870-7.
- Darmoul D, Gratio V, Devaud H, Peiretti F y Laburthe M. 2004. Activation of proteinase-activated receptor 1 promotes human colon cancer cell proliferation through epidermal growth factor receptor transactivation. *Mol Cancer Res*. 2:514-22.
- Daub H, Wallasch C, Lankenau A, Herrlich A y Ullrich A. 1997. Signal characteristics of G protein-transactivated EGF receptor. *EMBO J*. 16:7032-44.
- de Castro Ribeiro M, Badaut J, Price M, Meins M, Bogousslavsky J, Monard D, Hirt L. 2006. Thrombin in ischemic neuronal death. *Exp Neurol*. 198:199-203.
- de La Paz LD, Lezama R, Torres-Marquez ME y Pasantes-Morales H. 2002. Tyrosine kinases and amino acid efflux under hyposmotic and ischaemic conditions in the chicken retina. *Pflugers Arch*. 445:87-96.
- Decher N, Lang HJ, Nilius B, Bruggemann A, Busch AE y 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*. 134:1467-79.
- Deleuze C, Duvoid A, Moos FC, Hussy N. 2000. Tyrosine phosphorylation modulates the osmosensitivity of volume-dependent taurine efflux from glial cells in the rat supraoptic nucleus. *J Physiol*. 523:291-9.
- Dent P, Yacoub A y Contessa J. 2003. Stress and radiation-induced activation of multiple intracellular signaling pathways. *Radiat Res*. 159:283-300.
- Dezaki K, Tsumura T, Maeno E y Okada Y. 2000. Receptor-mediated facilitation of cell volume regulation by swelling-induced ATP release in human epithelial cells. *Jpn J Physiol*. 50:235-41.
- Feranchak AP, Fitz JG y Roman RM. 2000. Volume-sensitive purinergic signaling in human hepatocytes. *J Hepatol*. 33:174-82.
- Franco R, Lezama R, Ordaz B y Pasantes-Morales H. 2004a. Epidermal growth factor receptor is activated by hyposmolarity and is an early signal modulating osmolyte efflux pathways in Swiss 3T3 fibroblasts. *Pflugers Arch*. 447:830-9.
- Franco R, Rodriguez R, Pasantes-Morales H. 2004b. Mechanisms of the ATP potentiation of hyposmotic taurine release in Swiss 3T3 fibroblasts. *Pflugers Arch*. 449:159-69.
- Garcia JJ, Sanchez-Olea R y Pasantes-Morales H. 1991. Taurine release associated to volume regulation in rabbit lymphocytes. *J Cell Biochem*. 45:207-12.

- Gingrich MB, Junge CE, Lyuboslavsky P y Traynelis SF. 2000. Potentiation of NMDA receptor function by the serine protease thrombin. *J Neurosci.* 20:4582-95.
- Gohla A, Offermanns S, Wilkie TM, Schultz G. 1999. Differential involvement of Galpha12 and Galpha13 in receptor-mediated stress fiber formation. *J Biol Chem.* 274:17901-7.
- Grinstein S, Clarke CA, Dupre A y Rothstein A. 1982. Volume-induced increase of anion permeability in human lymphocytes. *J Gen Physiol.* 80:801-23.
- Grunder S, Thiemann A, Pusch M y Jentsch TJ. 1992. Regions involved in the opening of CIC-2 chloride channel by voltage and cell volume. *Nature.* 360:759-62.
- Gschwind A, Zwick E, Prenzel N, Leserer M y Ullrich A. 2001. Cell communication networks: epidermal growth factor receptor transactivation as the paradigm for interreceptor signal transmission. *Oncogene.* 20:1594-600.
- Hackel PO, Zwick E, Prenzel N y Ullrich A. 1999. Epidermal growth factor receptors: critical mediators of multiple receptor pathways. *Curr Opin Cell Biol.* 11:184-9.
- Haussinger D y Schliess F. 1999. Osmotic induction of signaling cascades: role in regulation of cell function. *Biochem Biophys Res Commun.* 255:551-5.
- Haussinger D, Reinehr R y Schliess F. 2006. The hepatocyte integrin system and cell volume sensing. *Acta Physiol (Oxf).* 187:249-55.
- Heacock AM, Dodd MS y Fisher SK. 2006. Regulation of volume-sensitive osmolyte efflux from human SH-SY5Y neuroblastoma cells following activation of lysophospholipid receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 317:685-93.
- Heacock AM, Kerley D, Gurda GT, VanTroostenberghe AT y Fisher SK. 2004. Potentiation of the osmosensitive release of taurine and D-aspartate from SH-SY5Y neuroblastoma cells after activation of M3 muscarinic cholinergic receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 311:1097-104.
- Higgins CF. 1995. P-glycoprotein and cell volume-activated chloride channels. *J Bioenerg Biomembr.* 27:63-70.
- Hirano K y Kanaide H. 2003. Role of protease-activated receptors in the vascular system. *J Atheroscler Thromb.* 10:211-25.
- Hoffmann EK y Pedersen SF. 2006. Sensors and signal transduction pathways in vertebrate cell volume regulation. *Contrib Nephrol.* 152:54-104.
- Hollenberg MD. 2003. Proteinase-mediated signaling: proteinase-activated receptors (PARs) and much more. *Life Sci.* 74:237-46.
- Hook SS y Means AR. 2001. Ca(2+)/CaM-dependent kinases: from activation to function. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 41:471-505.
- Hougaard C, Jorgensen F y Hoffmann EK. 2001. Modulation of the volume-sensitive K+ current in Ehrlich ascites tumour cells by pH. *Pflugers Arch.* 442:622-33.

- Hung DT, Wong YH, Vu TK y Coughlin SR. 1992. The cloned platelet thrombin receptor couples to at least two distinct effectors to stimulate phosphoinositide hydrolysis and inhibit adenylyl cyclase. *J Biol Chem.* 267:20831-4.
- Hur EM y Kim KT. 2002. G protein-coupled receptor signalling and cross-talk: achieving rapidity and specificity. *Cell Signal.* 14:397-405.
- Huxtable RJ. 1992. Physiological actions of taurine. *Physiol Rev.* 72:101-63
- Jackson PS y Strange K. 1993. Volume-sensitive anion channels mediate swelling-activated inositol and taurine efflux. *Am J Physiol.* 265:C1489-500.
- Jacobsen JG y Smith LH. 1968. Biochemistry and physiology of taurine and taurine derivatives. *Physiol Rev.* 48:424-511.
- Jakab M, Furst J, Gschwentner M, Botta G, Garavaglia ML, Bazzini C, Rodighiero S, Meyer G, Eichmueller S, Woll E, Chwatal S, Ritter M y Paulmichl M. 2002. Mechanisms sensing and modulating signals arising from cell swelling. *Cell Physiol Biochem.* 12:235-58.
- Junankar PR y Kirk K. 2000. Organic osmolyte channels: a comparative view. *Cell Physiol Biochem.* 10:355-60.
- Kanthou C, Kanse SM, Kakkar VV y Benzakour O. 1996. Involvement of pertussis toxin-sensitive and -insensitive G proteins in alpha-thrombin signalling on cultured human vascular smooth muscle cells. *Cell Signal.* 8:59-66.
- Kinne RK, Czekay RP, Grunewald JM, Mooren FC y Kinne-Saffran E. 1993. Hypotonicity-evoked release of organic osmolytes from distal renal cells: systems, signals, and sidedness. *Ren Physiol Biochem.* 16:66-78.
- Lang F, Busch GL, Ritter M, Volkl H, Waldegger S, Gulbins E y Haussinger D. 1998. Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol Rev.* 78:247-306.
- Lang F. 1998. The tyrosine kinase p56lck mediates activation of swelling-induced chloride channels in lymphocytes. *J Cell Biol.* 141:281-6.
- Lezama R, Ortega A, Ordaz B y Pasantés-Morales H. 2005. Hyposmolarity-induced ErbB4 phosphorylation and its influence on the non-receptor tyrosine kinase network response in cultured cerebellar granule neurons. *J Neurochem.* 93:1189-98.
- Liedtke W. 2005. TRPV4 as osmosensor: a transgenic approach. *Pflugers Arch.* 451:176-80.
- Light DB, Dahlstrom PK, Gronau RT y Baumann NL. 2001. Extracellular ATP activates a P2 receptor in necturus erythrocytes during hypotonic swelling. *J Membr Biol.* 182:193-202.
- Luttrell LM, Daaka Y y Lefkowitz RJ. 1999. Regulation of tyrosine kinase cascades by G-protein-coupled receptors. *Curr Opin Cell Biol.* 11:177-83.

- Ma YC, Huang J, Ali S, Lowry W y Huang XY. 2000. Src tyrosine kinase is a novel direct effector of G proteins. *Cell*. 102:635-46.
- Macfarlane SR, Seatter MJ, Kanke T, Hunter GD y Plevin R. 2001. Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev*. 53:245-82.
- Marinissen MJ y Gutkind JS. 2001. G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol Sci*. 22:368-76.
- McCarty NA y O'Neil RG. 1992. Calcium signaling in cell volume regulation. *Physiol Rev*. 72:1037-61.
- Mizuno A, Matsumoto N, Imai M y Suzuki M. 2003. Impaired osmotic sensation in mice lacking TRPV4. *Am J Physiol Cell Physiol*. 285:C96-101.
- Mongin AA y Kimelberg HK. 2002. ATP potently modulates anion channel-mediated excitatory amino acid release from cultured astrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*. 283:C569-78.
- Mongin AA y Kimelberg HK. 2005. ATP regulates anion channel-mediated organic osmolyte release from cultured rat astrocytes via multiple Ca²⁺-sensitive mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol*. 288:C204-13.
- Mongin AA, Cai Z y Kimelberg HK. 1999b. Volume-dependent taurine release from cultured astrocytes requires permissive [Ca²⁺]_i and calmodulin. *Am J Physiol*. 277:C823-32.
- Mongin AA, Reddi JM, Charniga C y Kimelberg HK. 1999a. [3H]taurine and D-[3H]aspartate release from astrocyte cultures are differently regulated by tyrosine kinases. *Am J Physiol*. 276:C1226-30.
- Morales-Mulia S, Cardin V, Torres-Marquez ME, Crevenna A y Pasantés-Morales H. 2001. Influence of protein kinases on the osmosensitive release of taurine from cerebellar granule neurons. *Neurochem Int*. 38:153-61.
- Motais R, Guizouarn H y Garcia-Romeu F. 1991. Red cell volume regulation: the pivotal role of ionic strength in controlling swelling-dependent transport systems. *Biochim Biophys Acta*. 1075:169-80.
- Nakanishi T, Balaban RS y Burg MB. 1988. Survey of osmolytes in renal cell lines. *Am J Physiol*. 255:C181-91.
- Niemeyer MI, Cid LP y Sepulveda FV. 2001. K⁺ conductance activated during regulatory volume decrease. The channels in Ehrlich cells and their possible molecular counterpart. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 130:565-75.
- Nilius B, Eggermont J, Voets T, Buyse G, Manolopoulos V y Droogmans G. 1997. Properties of volume-regulated anion channels in mammalian cells. *Prog Biophys Mol Biol*. 68:69-119.

- O'Neill WC. 1999. Physiological significance of volume-regulatory transporters. *Am J Physiol.* 276:C995-1011.
- Okada Y, Maeno E, Shimizu T, Dezaki K, Wang J y Morishima S. 2001. Receptor-mediated control of regulatory volume decrease (RVD) and apoptotic volume decrease (AVD). *J Physiol.* 532:3-16.
- Okada Y. 1997. Volume expansion-sensing outward-rectifier Cl⁻ channel: fresh start to the molecular identity and volume sensor. *Am J Physiol.* 273:C755-89.
- Pasantes-Morales H y Franco R. 2002. Influence of protein tyrosine kinases on cell volume change-induced taurine release. *Cerebellum.* 1:103-9.
- Pasantes-Morales H y Morales Mulia S. 2000. Influence of calcium on regulatory volume decrease: role of potassium channels. *Nephron.* 86:414-27.
- Pasantes-Morales H y Schousboe A. 1988. Volume regulation in astrocytes: a role for taurine as an osmoeffector. *J Neurosci Res.* 20:503-9.
- Pasantes-Morales H, Lezama RA y Ramos-Mandujano G. 2006a. Tyrosine kinases and osmolyte fluxes during hyposmotic swelling. *Acta Physiol (Oxf).* 187:93-102.
- Pasantes-Morales H, Lezama RA, Ramos-Mandujano G y Tuz KL. 2006b. Mechanisms of cell volume regulation in hypo-osmolality. *Am J Med.* 119:S4-11.
- Pasantes-Morales H, Peña Segura C, Garcia O, Morales Mulia MM, Sanchez Olea R y Moran J. 1996. Characterization of the volume-activated taurine pathway in cultured cerebellar granule neurons. *Adv Exp Med Biol.* 403:393-400.
- Pasantes-Morales H y Tuz K. 2006. Volume changes in neurons: hyperexcitability and neuronal death. *Contrib Nephrol.* 152:221-40.
- Pedersen SF, Beisner KH, Hougaard C, Willumsen BM, Lambert IH y Hoffmann EK. 2002. Rho family GTP binding proteins are involved in the regulatory volume decrease process in NIH3T3 mouse fibroblasts. *J Physiol.* 541:779-96.
- Pedersen SF, Hoffmann EK y Mills JW. 2001. The cytoskeleton and cell volume regulation. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 130:385-99.
- Pierce SK y Politis AD. 1990. Ca²⁺(+)-activated cell volume recovery mechanisms. *Annu Rev Physiol.* 52:27-42.
- Pierce KL, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. 2001. New mechanisms in heptahelical receptor signaling to mitogen activated protein kinase cascades. *Oncogene.* 20:1532-9.
- Prenzel N, Zwick E, Daub H, Leserer M, Abraham R, Wallasch C y Ullrich A. 1999. EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature.* 402:884-8.
- Roy G y Sauve R. 1987. Effect of anisotonic media on volume, ion and amino-acid content and membrane potential of kidney cell (MDCK) in culture. *J Memb Biol.* 106:83-96.

Sanchez-Olea R y Pasantes-Morales H. 1993. El control del volumen: una propiedad fundamental para la supervivencia de las células animales. *Ciencia*. 44:473-85.

Sanchez-Olea R, Moran J, Schousboe A y Pasantes-Morales H. 1991. Hyposmolarity-activated fluxes of taurine in astrocytes are mediated by difusión. *Neurosci Lett*. 13:233-6.

Sanchez-Olea R, Peña C, Moran J y Pasantes-Morales H. 1993. Inhibition of volume regulation and efflux of osmoregulatory amino acids by blockers of Cl⁻ transport in cultured astrocytes. *Neurosci Lett*. 156:141-4.

Selbie LA y Hill SJ. 1998. G protein-coupled-receptor cross-talk: the fine-tuning of multiple receptor-signalling pathways. *Trends Pharmacol Sci*. 19:87-93.

Smith LH y Pierce SK. 1987. Cell volume regulation by molluscan erythrocytes during hypoosmotic stress: Ca²⁺ effects on ionic and organic osmolyte effluxes. *Bio Bull*. 173:407-18.

Souza MM, Gross S, Boyle RT y Lieberman M. 2000. Na⁺/K⁺-ATPase inhibition during cardiac myocyte swelling: involvement of intracellular pH and Ca²⁺. *Mol Cell Biochem*. 210:173-83.

Szucs G, Heinke S, Droogmans G y Nilius B. 1996. Activation of the volume-sensitive chloride current in vascular endothelial cells requires a permissive intracellular Ca²⁺ concentration. *Pflugers Arch*. 431:467-9.

Thinnes FP, Hellmann KP, Hellmann T, Merker R, Schwarzer C, Walter G, Gotz H y Hilschmann N. 2000. Studies on human porin XXI: gadolinium opens Up cell membrane standing 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*. 69:240-51.

Tilly BC, van den Berghe N, Tertoolen LG, Edixhoven MJ y de Jonge HR. 1993. Protein tyrosine phosphorylation is involved in osmoregulation of ionic conductances. *J Biol Chem*. 268:19919-22.

Tsuzuki T, Okabe K, Kajiya H y Habu T. 2000. Osmotic membrane stretch increases cytosolic Ca²⁺ and inhibits bone resorption activity in rat osteoclasts. *Jpn J Physiol*. 50:67-76.

Valverde MA, Diaz M, Sepulveda FV, Gill DR, Hyde SC y Higgins CF. 1992. Volume-regulated chloride channels associated with the human multidrug-resistance P-glycoprotein. *Nature*. 355:830-3.

van Biesen T, Luttrell LM, Hawes BE y Lefkowitz RJ. 1996. Mitogenic signaling via G protein-coupled receptors. *Endocr Rev*. 17:698-714.

Wang Y, Roman R, Lidofsky SD y Fitz JG. 1996. Autocrine signaling through ATP release represents a novel mechanism for cell volume regulation. *Proc Natl Acad Sci*. 93:12020-5.

Wirthensohn G, Beck FX y Guder WG. 1987. Role and regulation of glycerophosphorylcholine in rat renal papilla. *Pflugers Arch*. 1987. 409:411-5.

Wittels KA, Hubert EM, Musch MW y Goldstein L. 2000. Osmolyte channel regulation by ionic strength in skate RBC. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 279:R69-76.

Xi G, Reiser G y 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.