



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**EFFECTO DE LA TROMBINA EN LA MOVILIZACIÓN DE  
GLUTAMATO EN ASTROCITOS EXPUESTOS A EDEMA  
HIPOSMÓTICO E ISQUEMIA QUÍMICA**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGA**

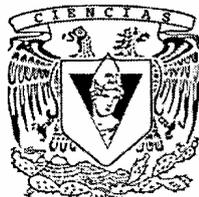
**PRESENTA:**

**HERNÁNDEZ BENÍTEZ REYNA**

**TUTOR:**

**DR. GERARDO RAMOS MANDUJANO**

**2008**



**FACULTAD DE CIENCIAS  
UNAM**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## **JURADO**

*Dra. Herminia Pasantes Ordóñez*

*Dr. Gerardo Ramos Mandujano*

*M. en C. Marco Antonio Martínez Ávila*

*Biól. Felipe Alcántara Sánchez*

*Biól. Iván Ramiro Espínola Alvarado*

## AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue realizada en el **Instituto de Fisiología Celular, UNAM**, Departamento de Biofísica, dirigido por la *Dra. Herminia Pasantes Ordóñez*, a quien agradezco la orientación y comentarios en la elaboración de este trabajo.

Agradezco el financiamiento brindado por el *Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología* (CONACYT) proyecto 46465 y *DGAPA-PAPIIT* IN209507, así como la asistencia técnica de *Claudia Peña Segura*.

## Hoja de Datos del Jurado

### 1. Datos del alumno

Hernández  
Benítez  
Reyna  
57 80 94 38  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
300021686

### 2. Datos del tutor

Dr.  
Gerardo  
Ramos  
Mandujano

### 3. Datos del sinodal 1

Dra.  
Herminia  
Pasantes  
Ordóñez

### 4. Datos del sinodal 2

M. en C.  
Marco Antonio  
Martínez  
Ávila

### 5. Datos del sinodal 3

Biól.  
Iván Ramiro  
Espínola  
Alvarado

### 6. Datos del sinodal 4

Biól.  
Felipe  
Alcántara  
Sánchez

### 7. Datos del trabajo escrito

El efecto de la trombina en la movilización de glutamato en astrocitos expuestos a edema hiposmótico e isquemia química  
60 p  
2008

# ÍNDICE

*Página.*

<b>2</b>	<b>JURADO</b>
<b>3</b>	<b>AGRADECIMIENTOS</b>
<b>4</b>	<b>ÍNDICE</b>
<b>5</b>	<b>RESUMEN</b>
<b>6</b>	<b>ABREVIATURAS</b>
<b>7</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>
	<b>REGULACIÓN DEL VOLUMEN CELULAR</b>
<b>11</b>	<b>OSMOLITOS</b>
<b>13</b>	<b>EDEMA CEREBRAL</b>
<b>14</b>	<b>ISQUEMIA CEREBRAL</b>
<b>16</b>	<b>EL PAPEL DE LOS ASTROCITOS EN EL EDEMA</b>
<b>17</b>	<b>MECANISMOS DE DAÑO CEREBRAL DURANTE LA ISQUEMIA</b>
	<ul style="list-style-type: none"><li>- Hinchamiento celular</li><li>- Aumento de la concentración de glutamato extracelular</li><li>- Excitotoxicidad</li></ul>
<b>19</b>	<b>PAPEL DE LA TROMBINA EN EL DAÑO CEREBRAL</b>
<b>22</b>	<b>OBJETIVO</b>
<b>23</b>	<b>PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL</b>
	<ul style="list-style-type: none"><li>- Materiales</li><li>- Cultivos celulares</li><li>- Medición de la salida de osmolitos</li><li>- Medición de calcio</li><li>- Análisis estadístico</li></ul>
<b>28</b>	<b>RESULTADOS</b>
<b>43</b>	<b>DISCUSIÓN</b>
<b>49</b>	<b>CONCLUSIONES</b>
<b>51</b>	<b>GLOSARIO</b>
<b>52</b>	<b>REFERENCIAS</b>

## RESUMEN

El edema en astrocitos se presenta en accidentes cerebrovasculares, en traumatismo craneoencefálico y tras episodios de isquemia cerebral, patologías en las que coincide con un aumento de los niveles de trombina. En esta investigación se encontró que la trombina potencia la salida de glutamato sensible a volumen, en cultivos de astrocitos corticales y de cerebelo expuestos a hiposmolaridad. Esta salida fue reducida con el empleo de los bloqueadores de canales de  $\text{Cl}^-$ , lo que sugiere que el glutamato se desplaza por la vía de canales de aniones y osmolitos orgánicos sensible a volumen (VSOAC). El efecto de la trombina dependió de su actividad proteolítica sobre la isoforma 1 de su receptor (PAR-1). La potenciación de la salida de glutamato fue dependiente de un incremento en la concentración citosólica de calcio, provocada por la trombina, e implica una vía dependiente de la calcio-calmodulina (CaM). Además de esta vía sensible a calcio, el efecto de la trombina en la liberación de glutamato, involucra la activación de la cinasa-3 de Inositol (PI3K). Con la demostración del incremento en la salida de glutamato, en condiciones de edema hiposmótico en presencia de trombina, se exploró el daño potencial que esta proteasa podría provocar al incrementar los niveles de glutamato durante un episodio de isquemia, mediante la activación de mecanismos excitotóxicos. No obstante, la trombina en astrocitos expuestos a una despolarización de membrana (como la que ocurre a consecuencia de un episodio de isquemia) o mediante un modelo de inducción química de isquemia, no incrementó los niveles de liberación de glutamato. La razón por la cual la trombina no pudo activar el mismo mecanismo potenciador de la liberación hiposmótica, puede ser que bajo este modelo de isquemia, los astrocitos no presenten hinchamiento, y a su vez, la inhibición glicolítica y respiratoria inducida, reduce los niveles de ATP impidiendo el funcionamiento de la vía de VSOAC, por la cual se movilizan los osmolitos durante el mecanismo desencadenado por la trombina. En el modelo de  $\text{K}^+$ /Ouabaina, se concluye que glutamato liberado se moviliza fundamentalmente por el funcionamiento en reversa de su transportador, y en menor medida por la vía activada por volumen, la cual puede tener mayor relevancia en áreas adyacentes al foco isquémico.

## ABREVIATURAS

<b>AMPC</b>	Adenosine <b>Mono-Phosphate</b> cyclic, monofosfato cíclico de adenosina.
<b>AMPA</b>	$\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-Methylisoxazole-4- <b>Propionic Acid</b> .
<b>ANDEVA</b>	<b>Análisis de Varianza</b> .
<b>ATP</b>	Adenosine 5'- <b>Tri-Phosphate</b> , adenosín trifosfato.
<b>CaM</b>	Calcio-Calmodulina.
<b>[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub></b>	Concentración intracelular de calcio.
<b>DAG</b>	Diacilglicerol.
<b>DNA</b>	<b>Deoxyribo-Nucleic Acid</b> , ácido desoxirribonucleico.
<b>DCPIB</b>	(4-[2-Butyl-6,7- <b>dicloro</b> -2-cyclopentyl-2,3-dihydro-1-oxo-1H-inden-5-yl)oxy] <b>butanoic acid</b> .
<b>DRV</b>	<b>Decremento Regulador de Volumen</b>
<b>EAAC</b>	<b>Excitatory Amino Acid Carrier</b> , transportador de aminoácidos excitadores.
<b>EAAT (1-3)</b>	<b>Excitatory Amino Acid Transporter</b> , transportador de aminoácidos excitadores.
<b>EGFR</b>	<b>Epidermal Grow Factor Receptor</b> , Receptor del factor de crecimiento epidermal.
<b>GLAST</b>	<b>Glutamate Aspartate Transporter</b> , transportador de aspartato y glutamato.
<b>GLT</b>	<b>Glutamate Transporter</b> , transportador de glutamato.
<b>Go</b>	Gö6976.
<b>GPCR</b>	<b>G-Protein Coupled Receptors</b> , receptores acoplados a proteínas G.
<b>GRK</b>	<b>GPCR Receptor Kinases</b> , cinasas de receptores del tipo GPCR.
<b>H(7.5, 15 ó 30)</b>	Hiposmótico (con el porcentaje de la reducción de osmolaridad).
<b>HT</b>	Hiposmótico (30%) con Trombina (5U/mL).
<b>IoA</b>	Iodoacetato, ácido iodoacético
<b>Ionom</b>	<b>Ionomicina</b> .
<b>IP3</b>	Inositol <b>Phosphate-3</b> , Inositol-3-fosfato.
<b>IRV</b>	<b>Incremento Regulador de Volumen</b>
<b>Isos</b>	<b>Isosmótico</b> .
<b>IsoT</b>	<b>Isosmótico con Trombina</b> .
<b>K (40-100)</b>	Medio alto en potasio (a la concentración en mM indicada).
<b>[K<sup>+</sup>]<sub>e</sub></b>	Concentración extracelular de potasio.
<b>mOsm</b>	<b>mili-Osmolar</b> (unidad de medición).
<b>NaN<sub>3</sub></b>	Azida de sodio.
<b>NMDA</b>	<b>N-Metil-D-Aspartato</b> .
<b>nNOS</b>	<b>Neuronal- Nitric Oxide Sintase</b> , Óxido-nítrico-sintasa de tipo neuronal.
<b>NO</b>	<b>Nitric Oxide</b> , óxido nítrico.
<b>NPPB</b>	5-Nitro-2-(3-phenylpropyl-amino)- <b>benzoic acid</b> .
<b>O</b>	Ouabaina.
<b>PAR (1-4)</b>	<b>Protease-Activated Receptors</b> , Receptores activados por proteasas (del tipo 1 al 4).
<b>PI3K</b>	<b>Protein Inositol-3 Kinase</b> , Proteína cinasa-3 de inositol.
<b>PKC</b>	<b>Protein Kinase C</b> , Proteína cinasa C.
<b>PLC</b>	<b>Phospho-Lipase C</b> , fosfolipasa C.
<b>Quel</b>	<b>Quelerritrina</b> .
<b>RNA<sub>m</sub></b>	<b>Ribo-Nucleic Acid –messenger</b> , Ácido ribonucleico mensajero.
<b>SNC</b>	Sistema Nervioso Central.
<b>T</b>	Trombina.
<b>TBHA</b>	Treo- $\beta$ - <b>Hidroxyaspartic-Acid</b> , ácido treo- $\beta$ -hidroxiaspártico.
<b>TMX</b>	<b>Tamoxifen</b> .
<b>TRK</b>	<b>Tyrosine Receptor Kinase</b> , Receptor de Cinasas de Tirosina.
<b>TRP</b>	<b>Transient Receptor Potencial</b> , Receptor de potencial transitorio.
<b>VSOAC</b>	<b>Volume Sensitive Organic and Anion Channels</b> , Canales de aniones y osmolitos orgánicos sensible a volumen.
<b>Wort</b>	<b>Wortmanina</b> .

# EFECTO DE LA TROMBINA EN LA MOVILIZACIÓN DE GLUTAMATO EN ASTROCITOS EXPUESTOS A EDEMA HIPOSMÓTICO E ISQUEMIA QUÍMICA

## INTRODUCCIÓN

### REGULACIÓN DEL VOLUMEN CELULAR

El volumen celular es una característica adaptativa, regulada continuamente por las células animales, como parte de su dinámica homeostática. El mantenimiento de un tamaño celular casi constante, ante una gran variedad de situaciones ambientales, implica la participación de diversos mecanismos reguladores del volumen, incluyendo el movimiento de agua, iones y osmolitos orgánicos, a través de la membrana celular. Para mantener sus funciones metabólicas, las células acumulan cierto número de sustancias cuya concentración, tasas de síntesis y degradación, son determinantes para procesos que van desde el crecimiento, diferenciación, excitabilidad y mecanismos de muerte, y que a su vez contribuyen a la creación de gradientes osmóticos entre la célula y su medio (Pasantes-Morales, 1996; Lang *et al.*, 1998; Pasantes-Morales *et al.*, 2006).

Las membranas de las células animales son altamente permeables al agua, por lo que el volumen celular, está determinado por la osmolaridad intracelular y extracelular (Lang *et al.*, 1998). Ante esta diferencia en la osmolaridad, ocurren flujos netos de agua en la dirección necesaria para alcanzar un equilibrio osmótico (Lambert, 2004; Ordaz *et al.*, 2004); esta diferencia, también es compensada por la movilización de osmolitos, ya sea por mecanismos difusionales o acoplados a un gasto energético.

Las células presentan una regulación constante de su volumen, que ocurre mediante flujos activos y pasivos de iones, que se dan en función de sus gradientes electroquímicos y de las características particulares de membrana (presencia de bombas, transportadores, canales). El mecanismo principal que contribuye al mantenimiento de los gradientes transmembranales, es el funcionamiento de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ; mediante esta bomba las células sacan  $\text{Na}^+$  que intercambian por  $\text{K}^+$ , lo cual implica un gasto de energía, pero permite en gran parte, el mantenimiento del volumen celular. Como la membrana celular es poco permeable al  $\text{Na}^+$ , su salida

contrapesa la osmolaridad creada por los solutos orgánicos que permanecen en el interior de la célula. Asimismo, la célula tiene una membrana altamente permeable al  $K^+$ ; de modo que el  $K^+$  (pero no el  $Na^+$ ), puede moverse a favor de su gradiente electroquímico. La salida de  $K^+$  crea el lado externo positivo de la membrana, y como consecuencia el  $Cl^-$  sale de la célula. La baja concentración de  $Cl^-$  intracelular, es compensada por la presencia de sustancias orgánicas intracelulares (Lang *et al.*, 1998; Kimelberg, 2005; Friedrich *et al.*, 2006) figura A.

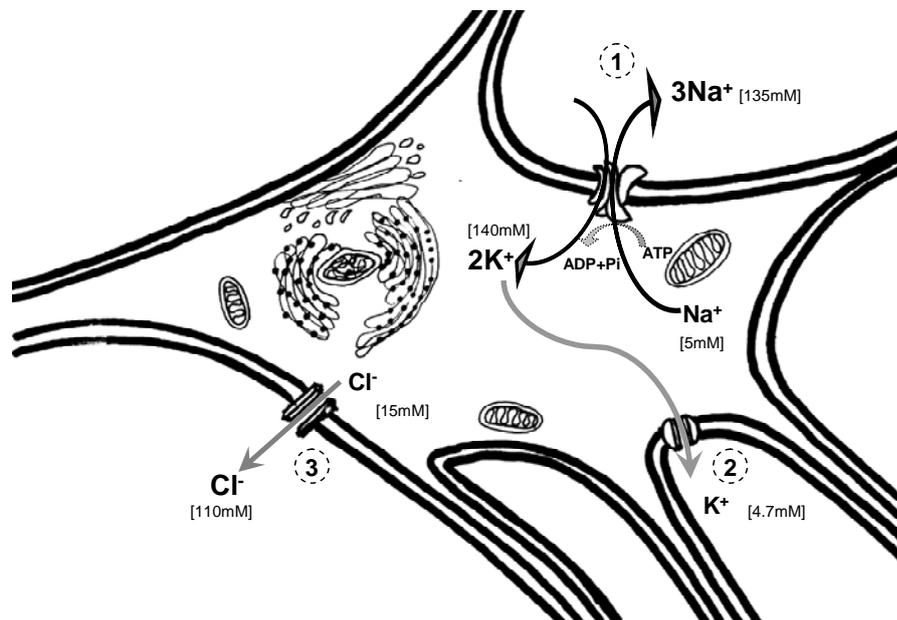


Figura A. La regulación del volumen es uno de los procesos que permiten el mantenimiento de la homeostasis celular. Los tres principales mecanismos que contribuyen al mantenimiento del volumen celular y que determinan los gradientes transmembranales normales, son: (1) La operación de la ATPasa  $Na^+/K^+$ , que permite la acumulación del  $Na^+$  extracelular y la captura de  $K^+$ ; (2) a su vez, el potasio puede moverse fácilmente a través de la membrana celular mediante los canales de  $K^+$  y (3) los canales de  $Cl^-$ , movilizan al ion hacia el exterior, para alcanzar el equilibrio electroquímico impuesto por el interior negativo de la membrana, consecuencia de la operación de los mecanismos anteriores.

En las células operan mecanismos de regulación del volumen celular, ante cambios abruptos de osmolaridad, originados principalmente durante procesos patológicos (Lang *et al.*, 1998; Friedrich *et al.*, 2006). Si las células se exponen a una condición hiposmótica (con una menor cantidad de solutos, que los que contiene la

célula), inicialmente se hincharán, pero luego se activará un mecanismo tendiente a recuperar su volumen original, mediante la liberación de iones y osmolitos orgánicos, proceso llamado “Decremento Regulador de Volumen” (DRV). Si las células se exponen a un fluido extracelular hiperosmótico (con más solutos, que los contenidos en el interior de la célula), inicialmente se encogerán, pero luego tenderán a acercarse a su volumen original, por medio de la acumulación de iones, en un proceso conocido como “Incremento Regulador del Volumen” (IRV) (Lang *et al.*, 1989; Lang *et al.*, 1998; Friedrich *et al.*, 2006).

La regulación del volumen celular, es un mecanismo que probablemente implica un sensor al cambio del volumen, el cual transmite la señal mediante una cadena de osmotransducción, tendiente a la recuperación del volumen original de la célula. En la actualidad, se desconoce la identidad de dicho sensor de volumen; sin embargo, se ha propuesto que pudieran funcionar en ese sentido moléculas como integrinas, algún receptor de cinasas de tirosina (TRK) o bien receptores de potencial transitorio (TRP) (Pasantes-Morales *et al.*, 2006), pues hay reportes que muestran la activación de dichos receptores ante un estímulo hiposmótico (Xu *et al.*, 2003; Franco *et al.*, 2004; Cohen, 2005). Es sabido que el hinchamiento hiposmótico, conduce a cambios en la concentración de segundos mensajeros tales como el  $\text{Ca}^{2+}$ , AMP-cíclico (AMPC), Inositol-3-fosfato (IP3) y ácido araquidónico (Pasantes-Morales *et al.*, 2000; Cardin *et al.*, 2003; Lambert, 2004) por mencionar algunos; sin embargo, las señales de transducción que median el reconocimiento de un cambio de volumen en la célula y la activación de mecanismos de salida de osmolitos, permanecen sin ser dilucidados completamente.

El DRV requiere de un sistema de transporte particular, que involucra la activación de canales aniónicos y canales de  $\text{K}^+$ . Los canales de osmolitos orgánicos y aniones sensible a volumen (VSOAC), son no selectivos, es decir, permiten el paso tanto de  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$  y aniones orgánicos. En este proceso de regulación, existe evidencia de la participación del cotransportador electroneutro de  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$ ; otras células aparentemente liberan  $\text{KCl}$  por la activación paralela del intercambiador  $\text{K}^+/\text{H}^+$  y el  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ ; asimismo, el hinchamiento puede conducir a la activación de canales catiónicos no selectivos en algunos tipos celulares, dichos canales permiten el paso de  $\text{Ca}^{2+}$  que entra a las células activando canales de  $\text{K}^+$  sensibles a  $\text{Ca}^{2+}$  (Lang *et al.*, 1998; Friedrich *et al.*, 2006) figura B.

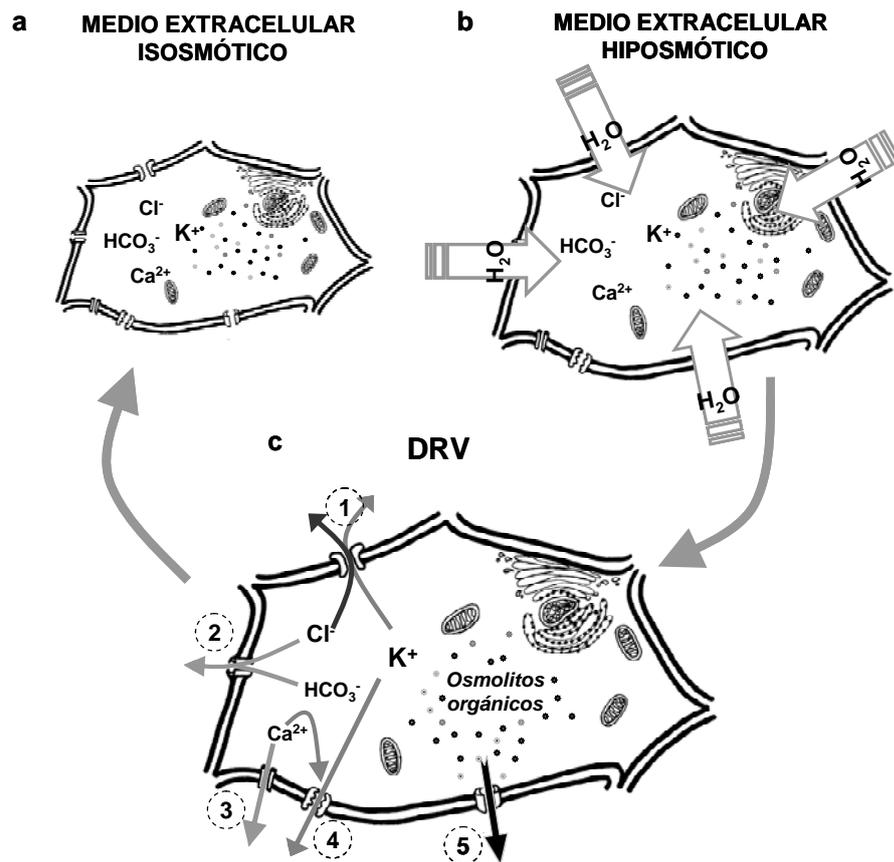


Figura B. Una célula expuesta a un medio extracelular isosmótico (a), al recibir un estímulo hiposmótico, moviliza agua a su interior para compensar la mayor cantidad de solutos que contiene en comparación con su medio extracelular, lo que le provoca un hinchamiento (b). Para compensar dicho hinchamiento, las células activan determinados sistemas de transporte, durante el proceso de DRV (c), éstos implican el funcionamiento del cotransportador  $\text{Cl}^-\text{K}^+$  (c1), la activación de canales aniónicos (c2), canales de  $\text{Ca}^{2+}$  (c3) y de  $\text{K}^+$  (c4); no obstante la vía de salida de los osmolitos orgánicos (VSOAC), constituye uno de los principales mecanismos que contribuye al DRV (c5).

No solo los cambios abruptos de osmolaridad pueden afectar el volumen celular, pues incluso ante una osmolaridad extracelular constante, el volumen puede cambiar debido a una composición iónica extracelular alterada, que puede producirse tanto en condiciones fisiológicas, como patológicas (Ordaz *et al.*, 2004, Pasantes-Morales, 2006). Un ejemplo típico ocurre cuando hay un incremento del  $\text{K}^+$  extracelular, que eventualmente conduce a su acumulación junto con diversos aniones ( $\text{Cl}^-$  y  $\text{HCO}_3^-$ , principalmente), con el subsecuente hinchamiento celular (Pasantes-Morales, 2006).

## OSMOLITOS

Los osmolitos son un conjunto de pequeñas moléculas de estructura heterogénea, que varían en concentración dependiendo del tipo celular y están ampliamente distribuidas (Pasantes-Morales; 1989; Yancey, 2005). Según su naturaleza química, se han agrupado en osmolitos orgánicos e inorgánicos; ambos contribuyen de manera significativa a la regulación de volumen celular, mediante su movilización, síntesis y degradación.

Los iones como el  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Na}^+$ , se consideran dentro del grupo de osmolitos inorgánicos (Wehner *et al.*, 2003); no obstante, este tipo de moléculas tienen repercusiones importantes en el metabolismo habitual de las células, sobre todo si aludimos a las células nerviosas, debido a su tipo de comunicación. De este modo, las fluctuaciones de estos osmolitos, en respuesta a una alteración del volumen celular, no pueden sino ser un fenómeno transitorio y de corta duración, a fin de no provocar un colapso en la excitabilidad neuronal (Pasantes-Morales, 2006).

Los osmolitos orgánicos, se pueden clasificar en tres grupos: (1) los polialcoholes (sorbitol, inositol), (2) las metilaminas (glicerolfosforilcolina, betaina, amina, creatina, creatinina) y (3) los aminoácidos con sus derivados (glicina, glutamina, glutamato, aspartato y taurina). La acumulación intracelular de osmolitos orgánicos, involucra su síntesis a través de reacciones metabólicas, así como su captura por medio de sistemas de transporte específicos a través de la membrana celular (Wehner *et al.*, 2003; Pasantes-Morales *et al.*, 2006). A estos osmolitos se les ha asignado la característica de ser “solutos compatibles”, debido a que no desnaturalizan macromoléculas (Brown y Simpson, 1972).

Cuando ocurre la adaptación de una célula a una condición hiposmótica, se produce la salida de osmolitos orgánicos y electrolitos, como parte del DRV. Se ha logrado determinar que el flujo de osmolitos orgánicos, tiene un perfil farmacológico similar, pues es sensible a los bloqueadores generales de canales de  $\text{Cl}^-$ , lo que permite sugerir que ésta sea una de las rutas por las cuales los osmolitos son liberados. Sin embargo, no se ha logrado la plena caracterización de la vía de salida, ni se conoce cuál es la verdadera relación que guarda con los flujos aniónicos (Friedrich *et al.*, 2006; Pasantes-Morales *et al.*, 2006).

Uno de los osmolitos más estudiados es la taurina (ácido  $\beta$ -aminoetansulfónico), dada su ubicuidad en células animales (Pasantes-Morales, 1989); es producto final de la síntesis de aminoácidos como la cisteína y la metionina, quedando la mayor parte libre como *zwitterion* (Sturman, 1987; Lambert, 2004; Yancey, 2005). Se encuentra en muy altas concentraciones en diversos tejidos de los mamíferos, como la retina, el corazón, músculo esquelético, leucocitos y en menor cantidad en otros tejidos, incluidas las células cerebrales (Sturman, 1987; Pasantes-Morales, 1989; Schuller-Levis y Park, 2003). No obstante su abundancia, se sabe que la taurina no forma parte estructural de las proteínas, ni tampoco participa en reacciones metabólicas a nivel celular. El interés en saber el por qué la taurina está en concentraciones tan elevadas en algunos tejidos, pese a la nula evidencia de su participación en las vías del metabolismo celular, llevó a investigar y encontrar su papel fundamental como osmolito orgánico, con evidentes implicaciones en el control del volumen celular. Ha sido reportado que la liberación de taurina, se incrementa proporcionalmente con la reducción en la osmolaridad del medio extracelular, que a su vez, está en relación con el incremento en el volumen de la célula (Pasantes-Morales, *et al.*, 1992).

Otro de los osmolitos ampliamente estudiados es el ácido glutámico (glutamato<sup>1</sup>), que forma parte de los aminoácidos estructurales de las proteínas, cuenta con un grupo radical cargado negativamente (a pH 7.0) y es considerado una molécula metabólicamente muy activa, pues se ubica entre los más importantes neurotransmisores en mamíferos (Fonnum, 1984). La transmisión excitadora glutamatérgica, es la forma predominante en los procesos de señalización cerebral, es aquí dónde los astrocitos cobran especial importancia, al ser requeridos para la biosíntesis<sup>2</sup>, captura y reciclaje de glutamato, tras los procesos de liberación sináptica (Hertz y Zielke, 2004). El glutamato es responsable del inicio de la señalización postsináptica, a través de receptores ionotrópicos como el NMDA (N-Metil-D-Aspartato), AMPA ( $\alpha$ -Amino- 3-hydroxy- 5-Methylisoxazole- 4-Propionic Acid) y Kainato, cuya activación modifica la permeabilidad a los iones sodio, potasio y/o calcio; o bien por medio de sus receptores metabotrópicos, que median su señalización a través de proteínas G (Fonnum, 1984; Furukawa *et al.*, 1997; Hertz y

---

<sup>1</sup> “Ácido glutámico”, nombre asignado al aminoácido, mientras que “glutamato” se le llama a su forma ionizada.

<sup>2</sup> El ácido glutámico es sintetizado a partir de glutamina, por medio de la glutaminasa mitocondrial de las terminales sinápticas.

Zielke, 2004). Esta actividad metabólica y de transmisión sináptica, hace que la movilización de glutamato como osmolito, represente un riesgo para la célula, en particular si pertenece al sistema nervioso central (SNC). En cuanto a la salida de glutamato inducida por hiposmolaridad, ha sido ampliamente estudiada en células gliales, reportándose un incremento proporcional de la liberación, respecto a un estímulo hiposmótico (Kimelberg *et al.*, 1990; Rutledge *et al.*, 1998); también hay reportes del incremento de la salida de glutamato bajo ciertas patologías, que implican un desbalance en la composición iónica del espacio extracelular (Rutledge y Kimelberg, 1996; Liu *et al.*, 2006; Molchanova *et al.*, 2006). Dado que el glutamato cumple funciones adicionales a su papel como osmolito, la liberación y el consecuente incremento de su concentración en el espacio extracelular, repercute fuertemente a nivel cerebral, donde en principio, su salida será parte del proceso de regulación del volumen celular, pero con consecuencias adicionales.

## **EDEMA CEREBRAL**

La alteración del volumen celular ocasionado por la acumulación de agua por parte de las células, es un cambio que cobra especial relevancia a nivel cerebral, con consecuencias que pueden llegar a ser dramáticas. Esto es debido a los límites que impone el cráneo, al dejar un espacio limitado para un incremento en el volumen celular; además las alteraciones de la composición iónica, pueden afectar la excitabilidad (Pasantés-Morales *et al.* 2000). La palabra edema, alude a esta condición y deriva del griego *oedema*, que significa hinchazón. Cuando ocurre edema en células cerebrales (principalmente gliales), se ejerce una fuerte presión del tejido sobre el cráneo, lo que puede conducir a la compresión e incluso ruptura de los vasos sanguíneos que irrigan al cerebro, llevándolo a una condición de privación de oxígeno y nutrientes (isquemia).

El edema cerebral puede ocurrir asociado a hiponatremia, es decir, una baja concentración en el sodio del plasma sanguíneo (Upadhyay *et al.*, 2006); fue inicialmente clasificado por Klatzo (1967), en función de el área afectada por el incremento en su contenido de agua. Cuando ocurre un aumento del contenido de fluidos a nivel celular, se habla de un edema citotóxico; en cambio, cuando el incremento del contenido de agua, ocurre en el espacio intersticial del cerebro en su

totalidad, se habla de un edema vasogénico, cuya causa de manera general es una alteración en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica.

Durante un proceso de isquemia, la falta de oxígeno, es una cuestión determinante sobre todo para las neuronas, por ello el edema cerebral se asocia frecuentemente a muerte neuronal. Bajo ciertos casos de traumatismo cráneo-encefálico, ocurre edema agudo, en el cual el tejido cerebral puede ejercer presión sobre las áreas de menor resistencia, ubicadas en la base del cerebro (tallo cerebral), sitio donde se hallan los centros de control respiratorio y cardiaco, conduciendo a un paro de los mismos (Pasantés-Morales *et al.* 2000; Liang *et al.*, 2007).

Recapitulando, en el cerebro los cambios en el volumen celular, pueden ser consecuencia tanto de hiposmolaridad extracelular, donde el edema se produce por una disminución en la osmolaridad del plasma; o bien ser producto de un incremento en la presión osmótica intracelular, bajo una condición isosmótica, como ocurre en la isquemia.

## **ISQUEMIA CEREBRAL**

Isquemia es el proceso por el cual las células se ven sometidas a condiciones deficientes de oxígeno y glucosa, lo que afecta de manera determinante su metabolismo. Algunos de los cambios asociados incluyen la producción de radicales libres, la alteración de la homeostasis de calcio y la activación de diversas proteasas.

El metabolismo de las células cerebrales tiene características particulares, que incluyen una alta tasa metabólica, almacenes de energía limitados y una dependencia crítica del metabolismo aeróbico de la glucosa, esto hace que el cerebro exhiba una gran vulnerabilidad ante el daño isquémico. Dicho daño ocurre a consecuencia de diversas alteraciones bioquímicas y neurofisiológicas, comúnmente se origina por golpes, o por disrupción focal o global del flujo sanguíneo en el cerebro (Dugan y Choi, 1999). La isquemia puede originar severas discapacidades dependiendo del área del cerebro afectada, de la distribución e intensidad del bloqueo del flujo sanguíneo y de la población celular dañada, ya que cada tipo celular puede manifestar distintos grados de vulnerabilidad ante un mismo proceso isquémico (Hossmann, 1998; Dugan y Choi, 1999; Suresh *et al.*, 2006).

Con la declinación del flujo sanguíneo, las funciones neuronales se afectan primero y conforme la isquemia progresa, la actividad metabólica se suprime,

llegando a afectar la integridad estructural de las células (Suresh *et al.*, 2006). Los eventos que le siguen a la isquemia son la excitotoxicidad mediada por glutamato, la acumulación excesiva de calcio, el estrés oxidativo, alteraciones neurovasculares, inflamación y la expresión de genes de muerte celular (Won *et al.*, 2002; Dienel y Hertz, 2005; Suresh *et al.*, 2006).

Cuando la isquemia ocurre, las demandas energéticas del tejido cerebral no se pueden cumplir, dada la caída de niveles de ATP; la disminución de esta molécula, resulta en la pérdida de la función de las bombas de iones que dependen de ATP, como la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (Dhar-Chowdhury *et al.*, 2007); consecuentemente ocurre la pérdida de los gradientes iónicos transmembranales, la despolarización de la membrana, la apertura de canales iónicos sensibles a voltaje y la activación de una cascada de eventos, que si se mantienen conducirán en última instancia a la muerte celular (Dugan y Choi, 1999; Dienel y Hertz, 2005). Tras algunos segundos de daño isquémico, la actividad eléctrica cerebral normal cesa, debido a la activación de canales de  $\text{K}^+$  y al esparcimiento de una hiperpolarización neuronal (Kristian y Siesjo, 1997). La hiperpolarización, puede ser debida a la apertura de canales de  $\text{K}^+$ , que responden a los cambios en las concentraciones locales de ATP,  $\text{H}^+$  o  $\text{Ca}^{2+}$ , lo conduce a una regulación alterada de dichos canales (Haddad y Jiang, 1997).

La caída de  $\text{O}_2$  durante la isquemia lleva a un aumento de la producción de ácido láctico y disminución del pH, conforme las células experimentan un cambio de dependencia de un metabolismo aeróbico, a una dependencia de la glicólisis (Pasantés-Morales y Franco, 2004); además, la salida de  $\text{K}^+$  de las neuronas despolarizadas, resulta en prolongadas elevaciones de la concentración extracelular de potasio ( $[\text{K}^+]_e$ ) y en una masiva despolarización celular (Haddad y Jiang, 1997). Otros gradientes iónicos de la célula también se pierden, de manera que el  $\text{Na}^+$  y el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular se elevan, mientras que hay una caída del  $\text{Mg}^{2+}$  (Kristian y Siesjo, 1997).

Las concentraciones extracelulares de muchos solutos, se incrementan ante una situación de isquemia, esto debido a que la despolarización induce la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  vía los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles a voltaje, estimulando la liberación del *pool* vesicular de neurotransmisores, incluido el aminoácido excitador glutamato (Nelson *et al.*, 2003; Kimelberg *et al.*, 2004; Cavallini *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2006).

## EL PAPEL DE LOS ASTROCITOS EN EL EDEMA

Uno de los cambios más conspicuos que ocurren en el SNC tras un episodio de edema, se presenta a nivel de los astrocitos, los cuales son las células gliales más abundantes en el cerebro y las responsables del soporte de las neuronas. Los astrocitos juegan un papel muy importante en el mantenimiento de la homeostasis, previenen la excitotoxicidad, limpian el sistema de radicales libres, proveen de nutrientes y factores de crecimiento, están involucrados en el control del movimiento de fluidos entre el espacio intracelular y extracelular, controlan el metabolismo y captura de glutamato, la neurotransmisión normal y también participan en la formación de la barrera hematoencefálica. Además, los astrocitos contienen las más grandes concentraciones de antioxidantes en el cerebro y proveen a las neuronas de substratos tales como glutatión como antioxidante (Dringen, 2000; Panickar y Norenberg, 2005; Verkhratsky y Toescu, 2006).

Tras un daño isquémico, los astrocitos desempeñan funciones neuroprotectoras y pueden contribuir a la recuperación de las neuronas (Panickar y Norenberg, 2005). Es sabido que los astrocitos son más resistentes que las neuronas ante el daño isquémico (Almeida *et al.*, 2002; Dienel y Hertz, 2005; Panickar y Norenberg, 2005) y esto es porque en el caso de falla energética, tienen la capacidad de activar la vía glicolítica, al tener almacenes de sustratos metabólicos, que les permiten mantener un aporte energético en ausencia de glucosa (Yu y Hertz, 1983).

Los astrocitos tienen características morfológicas similares, pero manifiestan diferencias funcionales en distintas áreas del SNC. Tal heterogeneidad es observada en su perfil de receptores de membrana, canales iónicos, capacidad para la toma de neurotransmisores, contenidos enzimáticos, habilidad para generar factores de crecimiento, sus uniones intercelulares y la expresión de genes (Cholewinski y Wilkin, 1988; Wilkin *et al.*, 1990), lo que contribuye a que puedan manifestar una capacidad de respuesta distinta ante una misma situación de daño.

## MECANISMOS DE DAÑO CEREBRAL DURANTE LA ISQUEMIA

### Hinchamiento celular

El hinchamiento de los astrocitos es una respuesta temprana ante una condición de isquemia en el cerebro (García *et al.*, 1977; Kimelberg, 2005). Los mecanismos que propician su hinchamiento son variados e incluyen el aumento en la concentración de  $[K^+]_e$ , glutamato, ácido láctico y radicales libres, la entrada de agua al espacio intracelular, resultado del movimiento osmótico tras la disrupción de la homeostasis iónica y la participación de intercambiadores como el de  $Na^+/H^+$ , que participa tanto en el hinchamiento, como en el incremento de la concentración de  $Na^+$  intracelular (Norenberg, 1998; Kintner *et al.*, 2004; Kimelberg, 2005). De estas consecuencias, la liberación de glutamato es considerada potencialmente deletérea (Kimelberg *et al.*, 1990; Budd, 1998).

### Aumento de la concentración de glutamato extracelular

Bajo condiciones fisiológicas normales, la concentración extracelular de glutamato es mantenida en el rango micromolar ( $1\mu M$  a  $2\mu M$ ), lo cual está constantemente regulado por la operación de transportadores de glutámico dependientes de  $Na^+$ , principalmente por los transportadores de los astrocitos (Erecinska y Silver, 1990; Anderson y Swanson, 2000). Después de un proceso isquémico, hay una excesiva liberación de glutamato (Benveniste *et al.*, 1984; Budd, 1998), esto ocurre porque durante la isquemia, hay una ruptura de los gradientes iónicos celulares y la fuerza conductora para la entrada de glutamato se pierde; como el transportador es electrogénico (es decir, transfiere una carga positiva hacia el interior), la despolarización de membrana lo puede llevar a su funcionamiento reverso, produciendo la salida de glutamato al espacio extracelular. La entrada normal de glutamato, ocurre por al menos tres tipos de transportadores conocidos como GLAST-1 (EAAT1), GLT-1 (EAAT2) y EAAC1 en astrocitos, o bien por el transportador neuronal (EAAT-3) (Nicholls y Attwell, 1990; Rothstein *et al.*, 1994); los cuales pueden ser regulados por la oxidación mediada por los radicales libres que son producidos en la isquemia (Trotti *et al.*, 1997). Así, el fallo en la entrada del glutamato por la activación del transportador en reversa y la liberación potenciada

por el hinchamiento celular, contribuyen a la elevación sostenida de los niveles extracelulares de glutamato en el cerebro isquémico (Nicholls y Attwell, 1990; Kimelberg y Mongin, 1998). En las fases tardías de la isquemia, cuando los mecanismos de movimiento del glutamato operan ineficientemente, se desencadena una cascada de excitotoxicidad, con un inevitable aumento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, degradación de fosfolípidos, liberación de ácidos grasos libres y formación de especies reactivas de oxígeno (Pasantés-Morales y Franco, 2004; Arudine y Tymianski, 2004).

### **Excitotoxicidad**

Onley (1972) describió por primera vez el término excitotoxicidad, al referirse al daño inducido por glutamato en el cerebro. Desde entonces, la excitotoxicidad ha sido relacionada a varios desórdenes neurológicos, episodios traumáticos, episodios convulsivos e isquemia (Hugon *et al.*, 1996; Bittigau e Ikonomidou, 1997; Doble, 1999). Cuando los niveles extracelulares de glutamato se elevan, se sobreactivan sus receptores, en particular el NMDA, que conducen a un incremento de los niveles de calcio, lo que parece ser el factor determinante de los procesos patológicos que le siguen y que llevan en última instancia a la muerte celular (Beal, 1992; Hugon *et al.*, 1996).

Los iones  $\text{Ca}^{2+}$  son reguladores de un gran número de procesos celulares, a nivel del SNC modulan la excitabilidad, al ser responsables de la liberación vesicular de neurotransmisores. Las concentraciones fisiológicas de  $\text{Ca}^{2+}$  se mantienen en el orden de 100nM, mientras que en el espacio extracelular están alrededor de 1mM; a la vez los receptores ionotrópicos NMDA están bloqueados por iones  $\text{Mg}^{2+}$  de forma dependiente de voltaje. La elevación de  $\text{Ca}^{2+}$  resulta en el inicio de procesos que conducen a la degeneración neuronal, esto involucra la degradación de proteínas estructurales por activación de proteasas, lipasas, endonucleasas y consecuentemente a la ruptura de la membrana celular, citoesqueleto y daños a nivel del DNA (Furukawa *et al.*, 1997, Suresh *et al.*, 2006). Además el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  puede llevar a la activación de la oxido-nítrico-sintasa de tipo neuronal (nNOS) y a la liberación de óxido nítrico (NO) que conduce a la formación de radicales superóxido  $\text{O}_3$ , peroxinitrito e hidroxilo (Iadecola, 1997).

## **PAPEL DE LA TROMBINA EN EL DAÑO CEREBRAL**

La trombina es una proteasa de serina, que tiene una función bien conocida en la cascada de coagulación sanguínea, lo que la ha llevado a ser objeto de múltiples investigaciones biomédicas (Huntington, 2005). Sin embargo, va en aumento la evidencia que la implica como una potente molécula señalizadora, que regula respuestas fisiológicas y patológicas, en una gran variedad de poblaciones celulares y tejidos (Suo *et al.*, 2004).

La trombina transduce su señal a través de receptores activados por proteasas (PAR, Protease-Activated Receptors), que son un tipo particular de receptores acoplados a proteínas G (GPCR), descubiertos a principios de los años 90's (Vu *et al.*, 1991). Los GPCR's son proteínas caracterizadas por presentar siete dominios transmembranales, siendo receptores ubicuos a lo largo de la escala filogenética. Existen cuatro miembros de la familia de los PAR identificados y clonados, que comparten el mismo mecanismo de activación, todos ellos presentes en el SNC. PAR-1 y PAR-3 son activados específicamente por trombina, PAR-2 se activa por una gran variedad de proteasas, incluyendo a la tripsina y triptasa, mientras que PAR-4 se activa principalmente por trombina, pero también por tripsina (Schmidlin y Bunnett, 2001; Cottrell *et al.*, 2002; Mackie *et al.*, 2002). A su vez se ha demostrado que los cuatro tipos de PAR mencionados, se coexpresan funcionalmente en cultivos de astrocitos de rata (Wang *et al.*, 2002). De los cuatro receptores a trombina conocidos, el PAR-1 resulta de especial interés, ya que ha sido detectado cerca de los capilares que conforman la barrera hematoencefálica, lo cual lo ubica en una posición óptima para responder a la trombina derivada de cualquier influjo de sangre originado por algún daño (Junge *et al.*, 2004; Sheehan y Tsirka, 2005).

Para que un PAR sea activado, se requiere de un corte proteolítico específico en su extremo amino terminal extracelular, lo cual deja al receptor con un "nuevo extremo amino", que es capaz de unirse a una región propia del receptor, iniciando la cascada de señalización (Wang *et al.*, 2002) Figura C. Este corte proteolítico, no solo puede estar mediado por trombina, sino por una familia de enzimas bien caracterizada que requieren serina dentro de su sitio activo (Scott *et al.*, 2001). Una vez activado, el PAR se puede asociar a diversas proteínas G heterotriméricas y activar una cascada de eventos de señalización; dependiendo del tipo de PAR, la proteína G asociada es distinta. La activación de los PAR's a través de sus proteasas,

ocurre de manera irreversible y los mecanismos de desensibilización de la respuesta desencadenada, implican la fosforilación del receptor a través de cinasas para GPCR's conocidas como GRK's (GPCR Receptor Kinases), de proteína cinasa C (PKC), así como la participación de  $\beta$ -arrestina (Schmidlin y Bunnett, 2001).

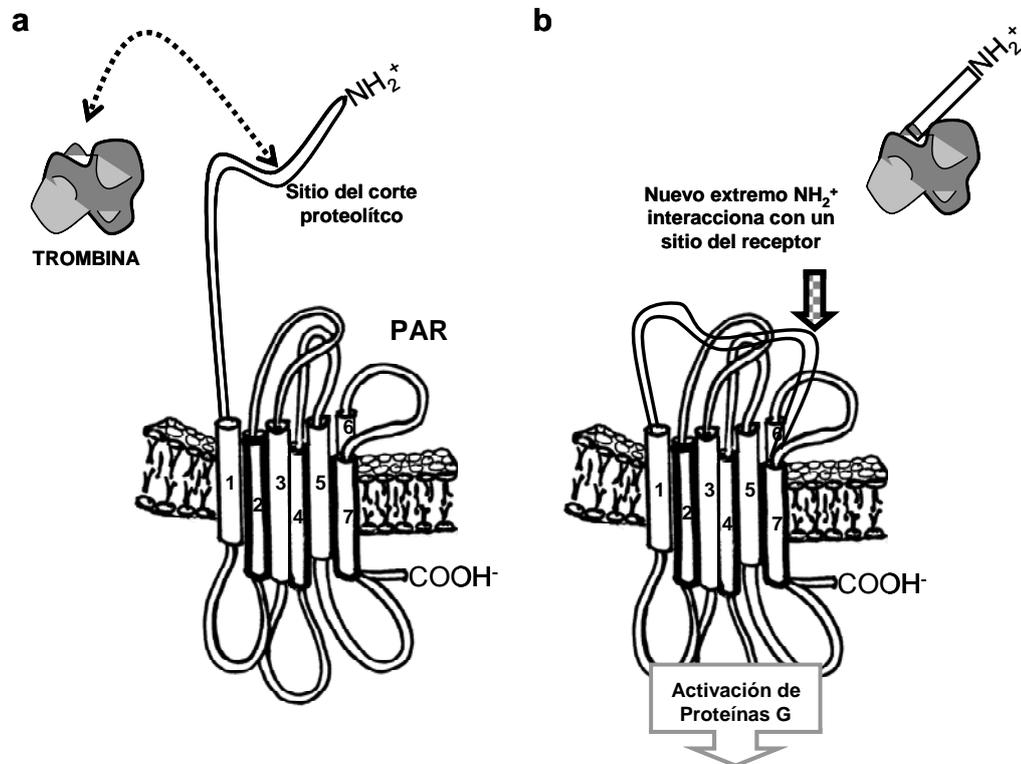


Figura C. Mecanismo de acción de la trombina sobre su receptor PAR. (a) Estado inactivo del receptor en el que su extremo amino terminal expuesto a la parte extracelular interactúa con el sitio catalítico de la trombina. La proteasa hace un corte en dicho extremo generando un nuevo extremo amino terminal en el receptor. (b) El corte origina un cambio conformacional y el nuevo extremo amino interactúa con una región del mismo receptor activándolo y desencadenando una señalización mediante proteínas G.

Mediante técnicas de hibridación *in situ*, se ha localizado el RNAm de la protrombina y de sus receptores, en diversas regiones del cerebro (Dihanich *et al.*, 1991; Weinstein *et al.*, 1995). Ha sido bien documentado que ante diversos daños en el SNC, existe una activación de la protrombina, mediante un corte que genera trombina activa (Scott *et al.*, 2001; Suo, *et al.*, 2004). Para estudiar los efectos de acción de la trombina sobre los receptores PAR's, se han utilizado péptidos sintéticos, para activarlos sin el uso de la proteasa natural, la cual podría tener efectos independientes del receptor (Schmidlin y Bunnett, 2001).

Otros estudios *in vitro*, señalan que los efectos de la trombina varían de acuerdo a su concentración, de modo que a bajas concentraciones, es capaz de proteger a neuronas y astrocitos de la muerte celular causada en diversos daños. *In vivo*, tratando previamente al cerebro con una baja dosis de trombina, se atenúa el daño inducido por una hemorragia intracerebral o por isquemia cerebral focal. En cambio, altas dosis de trombina inducen muerte celular en neuronas y astrocitos *in vitro*, y causan la disrupción de la barrera hematoencefálica, edema cerebral y convulsiones *in vivo* (Striggow *et al.*, 2000; Xi *et al.*, 2003). Los efectos citotóxicos o citoprotectores de la trombina de acuerdo a su concentración, podrían deberse a cascadas de transducción distintas o traslapadas, debido a la activación diferencial de sus receptores (Wang y Reiser, 2003). Asimismo, han sido reportados cambios en los patrones de expresión de los receptores a trombina, los cuales se incrementan durante los periodos de isquemia cerebral (De Castro Ribeiro *et al.*, 2006); esto se aúna a que mientras altas dosis de trombina conducen a la activación de microglia e inducen muerte a los astrocitos, bajas concentraciones de esta proteasa tienen un efecto protector en la isquemia (Sheehan y Tsirka, 2005).

Puede haber otros mecanismos por los cuales la trombina ejerce sus efectos bajo una condición isquémica; hay reportes que evidencian que la presencia de trombina, potencia la liberación de taurina bajo una condición hiposmótica (Cheema *et al.*, 2005), aunado a que la salida sensible a volumen de otros osmolitos, como el glutámico y el aspártico, se ha visto potenciada a través de la activación de receptores muscarínicos y colinérgicos (Heacock *et al.*, 2004). Estos antecedentes abren pautas para indagar, los mecanismos por los cuales la trombina, pudiera estar ejerciendo sus efectos perjudiciales ante una condición de isquemia cerebral, pues podría ocurrir una exacerbación de la liberación de glutamato, inducido por un aumento en volumen, que condujera a una cadena excitotóxica. Por lo tanto, en el presente trabajo se estudiará si la presencia de trombina, induce un aumento significativo en la salida de glutamato, bajo condiciones de incremento en el volumen celular de astrocitos.

## OBJETIVO

Determinar los efectos de la trombina en la movilización de glutamato, en cultivos de astrocitos expuestos a modelos de edema, generados por hiposmolaridad y por isquemia inducida químicamente.

### *Objetivos particulares*

- Determinar si la trombina en una condición hiposmótica, potencia la salida de glutamato<sup>3</sup>H en astrocitos de cerebelo.
- Determinar el tipo de receptor que activa la trombina en astrocitos sometidos a un choque hiposmótico.
- Identificar algunas de las proteínas de señalización implicadas en la liberación de osmolitos, que subyacen a la activación del receptor de trombina, durante una condición de hinchamiento.
- Monitorear los cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$  en astrocitos durante un estímulo hiposmótico con trombina.
- Identificar la vía por la cual el glutamato es movilizado cuando su liberación es potenciada por trombina.
- Investigar si la trombina potencia la salida de glutamato en astrocitos expuestos a edema isosmótico mediante modelos de isquemia.

## PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

### Materiales

Productos	Compañía proveedora
Medio basal Eagle, suero fetal bovino y Fura-2	Invitrogen, Eugene, OR.
Trombina bovina	Bio Pharm Laboratories, LLC.
W7-HCl, queleritrina, G66976, EGTA y EGTA-AM	Calbiochem-Novabiochem Corp. (San Diego CA.)
DCPIB (4-[2-Butyl-6,7-dicloro-2-cyclopentyl-2,3-dihydro-1-oxo-1H-inden-5-yl)oxy]butanoic acid)	TOCRIS (Ellisville Mo.)
D-[2,3- <sup>3</sup> H]ácido aspártico, L-[G- <sup>3</sup> H]ácido glutámico	New England Nuclear (Boston, MA)
[ <sup>3</sup> H]-taurina	American Radiolabeled Chemicals (St. Louis Mo).
Trombina de plasma humana, NPPB (5-Nitro-2-(3-phenylpropyl-amino)-benzoic acid), tamoxifen, U73122, PPACK, SFFLRN, GYPGKF, ouabaina octahidratada, ionomicina, TBHA (Treo-β-Hidroxyaspartic-Acid) y azida de sodio (NaN <sub>3</sub> ), sal de ácido iodoacético (ICH <sub>2</sub> COONa).	Sigma Chemical (St. Louis, MO.)
Sales para preparar medios	Merk (México)

#### *Medio isosmótico*

NaCl 135mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.17mM; KCl 4.7mM; CaCl<sub>2</sub> 1mM; glucosa 5mM; MgSO<sub>4</sub> 1.17mM; HEPES 10mM; (300mOsm).

Para el resto de los medios, se parte de la misma composición del medio isosmótico con las siguientes variaciones:

#### *Medio hiposmótico*

Se reduce la concentración de NaCl para obtener la osmolaridad requerida: 30% (210mOsm), 15% (255mOsm), 7.5% (277mOsm).

#### *Medio isosmótico libre de Ca<sup>2+</sup>*

Se elimina el CaCl<sub>2</sub>, compensando el Cl<sup>-</sup> añadiendo MgCl<sub>2</sub> (10mM) y se adiciona EGTA (0.1mM), (300mOsm).

#### *Medio hiposmótico libre de Ca<sup>2+</sup>*

Misma composición del medio isosmótico libre de Ca<sup>2+</sup>, reduciendo la concentración de NaCl para obtener la osmolaridad requerida (30%, 210mOsm).

### *Medio alto [K<sup>+</sup>]*

Se agrega la concentración requerida de KCl (40mM, 80mM, 100mM y 120mM) y se hace la reducción respectiva en la concentración de NaCl; (300mOsm).

### *Medio isosmótico sin glucosa IoA-NaN<sub>3</sub>*

Únicamente se elimina la glucosa del medio (300mOsm, la osmolaridad se ajusta una vez agregados los inhibidores ICH<sub>2</sub>COONa y NaN<sub>3</sub>).

Todos los medios son ajustados a pH de 7.4 con NaOH 0.1N y la osmolaridad es determinada por punto de congelación osmótico (Automatic osmometer, Precision Systems INC).

## **Cultivos celulares**

Se emplearon cultivos de astrocitos corticales y de cerebelo obtenidos de ratas *Wistar* postnatales de 2 y 8 días, respectivamente. Las suspensiones celulares obtenidas fueron sembradas en cajas *petri* plásticas de 35mm a una densidad de  $2.1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>; para los experimentos de medición de calcio, las células cultivadas sobre cubreobjetos rectangulares previamente esterilizados y colocados en el fondo de cajas *petri* plásticas de 60mm. Para el cultivo se empleó medio basal Eagle adicionado con 10% de suero fetal bovino, glutamina (2mM), penicilina (50U/mL) y estreptomycin (50µg/mL). Los cultivos fueron mantenidos en incubadora (5%CO<sub>2</sub>/95% aire atmosférico) a 37° C, durante al menos 15 días.

## **Medición de la salida de osmolitos**

Los experimentos fueron llevados a cabo usando astrocitos cultivados en cajas *petri* de 35mm. Tras retirar el medio de cultivo, son lavados con 1mL de medio isosmótico y se incuban a 37° C en 1mL de medio isosmótico con la molécula<sup>3</sup>H trazadora necesaria de acuerdo al experimento: L-ácido glutámico-<sup>3</sup>H (0.075µCi/mL), D-ácido aspártico-<sup>3</sup>H (0.05µCi/mL) o taurina-<sup>3</sup>H (0.5µCi/mL). Para los casos donde se emplean inhibidores como ouabaina (1mM), U73122 (5µM), W7 (50 µM), Gö6976 (1 µM), queleritrina (2.5 µM), wortmanina (100nM), DCPIB (1, 5 ó 10 µM), tamoxifen (2.5, 5 ó 10 µM) o NPPB (10, 25, 50, 100 µM), estos se incuban dentro de este periodo de tiempo en condiciones isosmóticas, junto con la marca radiactiva,

durante un lapso de 30min previos a iniciar las perfusiones<sup>1</sup>, salvo la wortmanina que se pre-incuba durante 1h.

En la perfusión las células se *lavan* dos veces consecutivas con 1mL de medio isosmótico, con la finalidad de retirar el exceso de radiactividad; luego durante 8min con 1mL/min para alcanzar un nivel basal estable, posteriormente se realizan 5 *colectas* bajo la misma condición isosmótica; en los casos donde se emplean inhibidores, éstos se deben añadir al medio empleado y a la concentración indicada. Tras las 5 muestras isosmóticas colectadas se cambia al medio con el estímulo requerido, el cual puede ser un medio: (a) hiposmótico 7.5%, 15% ó 30% (H7.5, H15 o H30); (b) hiposmótico con trombina (5U/mL<sup>2</sup>) adicionada al respectivo medio reducido en osmolaridad (HT); (c) hiposmótico 30% con PPACK (1µM) SFFLRN (5µM) o GYPGKF (50µM); (d) isosmótico con la adición de algún inhibidor o con trombina (Iso); (e) hiposmótico en presencia de algún inhibidor, con o sin trombina; (f) hiposmótico libre de Ca<sup>2+</sup>, con o sin wortmanina; (g) isosmótico alta [K<sup>+</sup>] con ouabaina (1mM) (K[mM]O); condición también probada en presencia de trombina, TBHA (50 µM) o DCPIB (10µM)<sup>3</sup>.

Al finalizar con las perfusiones, se colecta el remanente de radiactividad contenido en todas las células. Cada una de las alícuotas obtenidas se mezcla con líquido de centelleo y se mide empleando un contador de radiactividad por centelleo (Beckman Instruments CA.).

#### *Particularidades.*

- El uso de agentes quelantes, como el EGTA-AM (25 µM) se incuban en un medio libre de calcio durante 20min, posteriores a la hora de incubación con el trazador radiactivo y previos al inicio de la perfusión. No es necesario añadirlos durante las perfusiones.
- El uso del inhibidor PPACK (1µM) requiere de una pre-incubación junto a la trombina, durante 30min previos al inicio de las perfusiones correspondientes al estímulo.

---

<sup>1</sup> Cambios consecutivos del medio con el que se tratan a las células en cada modelo experimental, en todos los casos de este trabajo, el recambio de medio es de 1mL/min, tanto en lavados como en colectas.

<sup>2</sup> Concentración estándar empleada en la mayor parte del trabajo, pero es usada a menores concentraciones para realizar curva dosis-respuesta. Ver figura 2.

<sup>3</sup> El efecto directo de los fármacos empleados se describe en el Glosario (pp. 51).

- Para el modelo de isquemia con IoA y  $\text{NaN}_3$ , todos los lavados iniciales se realizan con el medio de estímulo (isomótico sin glucosa + IoA- $\text{NaN}_3$ ), durante 10min y luego se realizan colectas de 1mL cada 5min durante 50min.

Los resultados obtenidos se expresan como porcentaje de radiactividad liberada respecto al total de radiactividad incorporada en las células durante la hora de carga (el total de radiactividad se considera como la suma de la radiactividad medida en cada una de las colectas más la radiactividad presente en las células al final del experimento) y se muestran gráficamente como un proceso curso-temporal de liberación (Figura Da). Estos mismos valores permiten calcular el porcentaje de liberación neta, entendido como la suma de la liberación alcanzada en los 5 puntos máximos durante el periodo de estímulo respecto al nivel basal (Figura Db).

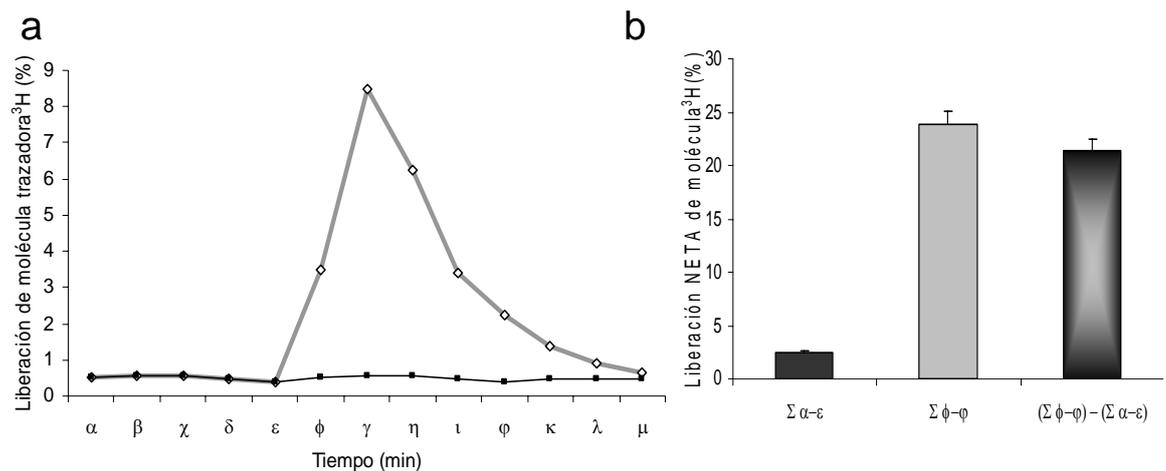


Figura D. Ejemplo de la presentación y manejo de los datos en liberaciones curso temporales y su expresión en liberación neta. a) Liberación curso-temporal que muestra el porcentaje de radiactividad (eje Y) presente en cada colecta (eje X). Los porcentajes son respecto al total de radiactividad (determinado por la radiactividad de  $\Sigma\alpha-\mu$  más la radiactividad presente en las células al finalizar las perfusiones). La línea negra representa la salida de la molécula trazadora en una condición basal estable; la línea gris representa la salida de la misma molécula ante la aplicación de un estímulo en el tiempo  $\epsilon$  y mantenido hasta el final de la liberación. b) La diferencia entre suma de la liberación evocada durante un estímulo ( $\Sigma\phi-\varphi$ ) y la suma de la liberación en su estado basal estable ( $\Sigma\alpha-\epsilon$ ) da como resultado el valor de la liberación neta.

## **Medición de calcio**

El  $[Ca^{2+}]_i$  fue determinado usando Fura-2/AM, en astrocitos cultivados sobre cubreobjetos de 60mm. Las células se incuban en medio isosmótico libre de  $Ca^{2+}$ , con EGTA (0.1mM) o EGTA-AM (25 $\mu$ M) el cual es incubado únicamente durante 20 minutos, o bien con ionomicina (1 $\mu$ M) incubada previamente durante 5min. Las condiciones son mantenidas durante la determinación de fluorescencia, la cual fue determinada en un espectrómetro de luminiscencia (Fluoromax-3 Horiba), donde la excitación fue alternada entre 340nm y 380nm, mientras que emisión fue monitoreada a 510nm. La fluorescencia fue medida bajo condiciones isosmóticas hasta alcanzar una línea basal estable (durante 100s) y después el medio se reduce en osmolaridad mediante la adición del volumen apropiado de agua destilada, con o sin los agonistas. Los resultados son calculados empleando una ecuación que relaciona la proporción entre la cantidad de calcio unido al indicador utilizado, con la cantidad de calcio libre y su constante de disociación (Takahashi *et al.*, 1999).

## **Análisis estadístico**

Los resultados expresan valores promedio  $\pm$  error estándar, la significancia ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ ) fue determinada usando análisis de varianza (ANDEVA) y pruebas de Newman-Keuls (Zar, 1984).

## RESULTADOS

La estimulación de astrocitos de cerebelo con un medio reducido en osmolaridad (edema hiposmótico), provoca la liberación de glutamato<sup>3</sup>H, que bajo esta condición se comporta como un osmolito, moviéndose del interior al exterior de la célula como parte del DRV. Los experimentos fueron hechos usando L-glutamato<sup>3</sup>H como trazador y avalados con experimentos control con ácido D-aspártico, una molécula análoga al ácido L-glutámico, que se desplazará por la misma vía, pero que tiene la ventaja de no ser metabolizable, que permite asegurar que es despreciable la cantidad de glutamato que se metaboliza a glutamina durante el periodo experimental. Se probaron diferentes disminuciones en la osmolaridad a partir de un medio isosmótico, examinando lo que ocurre a reducciones del 7.5%, 15% y 30%, encontrándose un incremento en la liberación de glutamato<sup>3</sup>H al pasar de medio isosmótico al hiposmótico. La liberación basal promedio neta fue de 0.2%; en una condición H7.5 aumentó a 1.42%, con el estímulo de H15 la liberación alcanzada fue de 1.47% y para la condición H30, el porcentaje de liberación pasó de 0.2% a 5.74% (Figura 1).

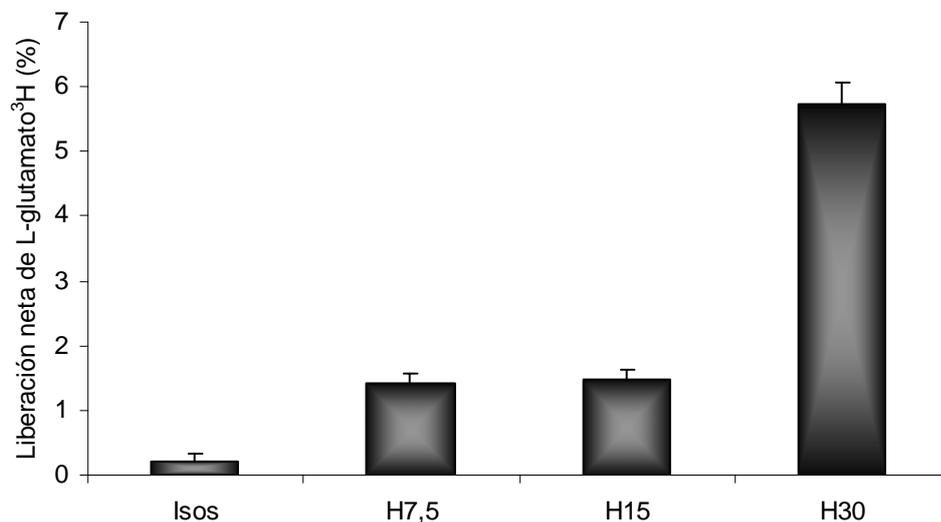


Figura 1. **La hiposmolaridad provoca un aumento en la salida de glutamato en astrocitos de cerebelo.** La liberación de glutamato<sup>3</sup>H fue evaluada en cultivos primarios de astrocitos, en osmolaridades de 300mOsm, 277mOsm, 255mOsm y 210mOsm, respectivamente. Resultados expresados como promedio  $\pm$  error estándar. Los distintos estímulos hiposmóticos difieren significativamente de la condición isosmótica con  $p < 0.01$ ;  $n \geq 5$ .

Para conocer el efecto de la adición de trombina en la liberación estimulada por un medio hiposmótico (210mOsm), se realizó una curva del efecto por trombina, con dosis desde 0.005U/mL hasta 5U/mL, encontrándose un efecto máximo y saturable a partir de 20nM, equivalente a 0.1U/mL (Figura 2), concentración a la cual se alcanzó una liberación neta del 25%. Se decidió adicionar, a distintas reducciones de osmolaridad, 5U/mL de trombina equivalentes a una concentración de 1 $\mu$ M; se optó por dicha concentración, pues es la que puede llegar a ocurrir en un proceso patológico como la isquemia. La figura 3 muestra un aumento de la liberación de glutamato<sup>3</sup>H, en cada condición hiposmótica e incluso, en condiciones isosmóticas.

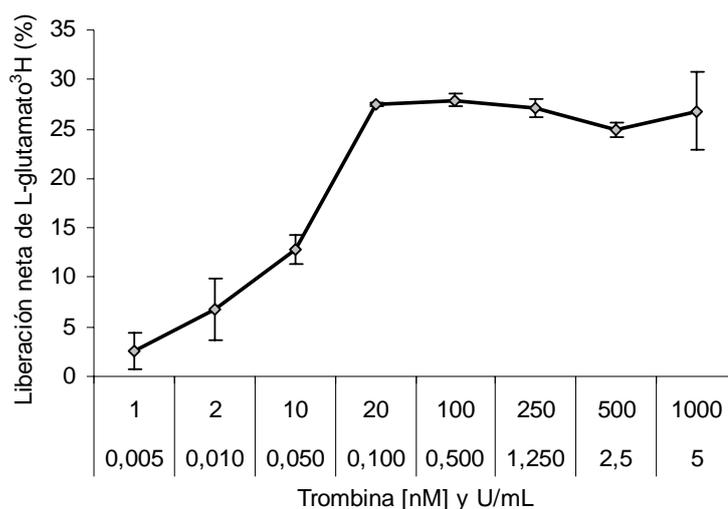


Figura 2. **La salida osmosensible de glutamato es potenciada por la trombina de manera dosis-dependiente.** Dosis crecientes de trombina fueron adicionadas a un medio hiposmótico (210mOsm). Los datos se expresan en una curva de liberación neta de glutamato<sup>3</sup>H contra la concentración de trombina expresada en [nM] (1 a 1000) y con su equivalencia en U/mL (0.005 a 5). Cada punto representa el promedio  $\pm$  error estándar; entre las concentraciones superiores a 10nM no existe diferencia significativa  $p < 0.01$ ;  $n \geq 4$ .

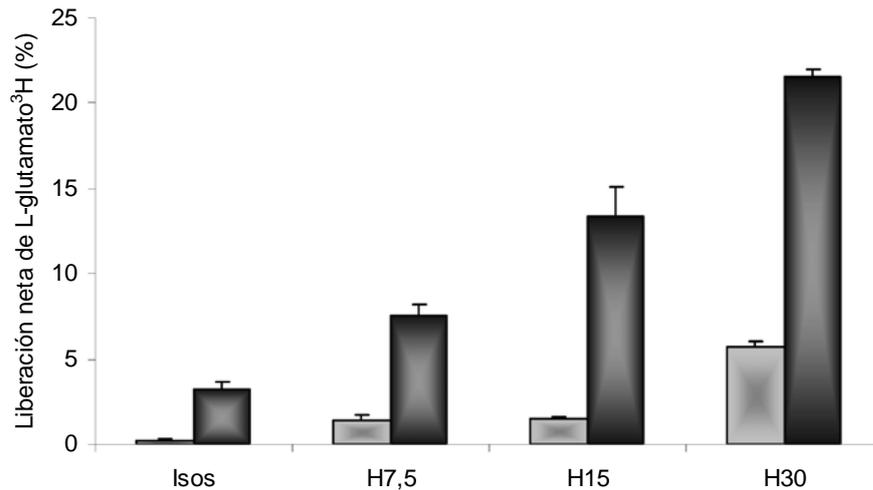


Figura 3. **La trombina potencia la liberación sensible a volumen de glutamato a diferentes osmolaridades.** Comparación entre la liberación neta de glutamato<sup>3</sup>H en distintas condiciones de osmolaridad (barras claras) y la liberación estimulada por la adición de 5U/mL de trombina (barras oscuras) en astrocitos de cerebelo. Las condiciones con trombina difieren significativamente de sus controles respectivos con  $p < 0.025$ . Los resultados se expresan como promedios  $\pm$  error estándar,  $n \geq 5$ .

Para asegurar que el efecto de la trombina sobre la liberación del trazador, se debiera precisamente al funcionamiento de dicha proteasa, se empleó un inhibidor de su actividad proteolítica conocido como PPACK (1 $\mu$ M). La presencia de este agente suprimió prácticamente todo el efecto potenciador de la trombina (Figura 4). La trombina actúa a través de PAR's, de los cuales hay 4 isoformas, todas presentes en el cerebro de rata (Wang *et al.*, 2002). Para investigar si alguno de estos receptores, es responsable del efecto potenciador de la liberación hiposmótica de osmolitos, se emplearon los péptidos activadores específicos a cada probable receptor de trombina implicado: SFLLRN que es específico para el PAR-1 y el GYPGKF específico para PAR-4. Se encontró que el SFLLRN (5 $\mu$ M), igualó el efecto logrado por la adición de trombina (22% de liberación neta), mientras que con el péptido GYPGKF (50 $\mu$ M) solo se logró una liberación de un 2.12%. Con estos resultados se determina que el efecto de trombina, en la potenciación de la liberación hiposmótica, está mediado por su función de proteasa, sobre el PAR-subtipo1 (PAR-1) principalmente (Figura 4).

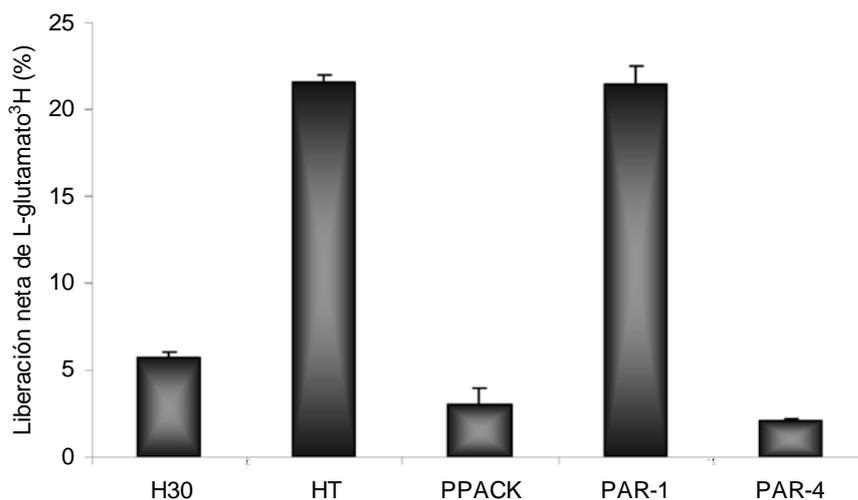


Figura 4. **La actividad potenciadora de la liberación de glutamato<sup>3</sup>H bajo condiciones de hiposmolaridad está mediada por la actividad de proteasa de la trombina sobre PAR-1.** Las barras representan el promedio  $\pm$  error estándar de la liberación neta de glutamato<sup>3</sup>H tras el estímulo de un medio a 210mOsm (H30), con la adición de 5U/mL de trombina más el inhibidor de proteasa PPACK (1 $\mu$ M), o con el péptido activador para PAR-4 (GYPGKF 50 $\mu$ M), difiriendo significativamente de la condición hiposmótica con trombina (HT), con  $p < 0.01$ ; PAR-1 (SFLLRN, 5 $\mu$ M) no difiere de HT;  $n \geq 4$ .

La cadena de señalización que se activa por el receptor PAR-1, involucra de manera prominente un incremento en el calcio citosólico  $[Ca^{2+}]_i$ . Además, trabajos previos han mostrado que la exposición de las células a una condición hiposmótica, provoca un pequeño incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$ , cuya magnitud varía en función del tipo celular (Pasantes-Morales y Morales-Mulia, 2000). Se midió el  $Ca^{2+}_i$  para evaluar su efecto, en la acción de la trombina en un medio hiposmótico; los resultados de la figura 5 muestran un aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$  en esa condición, desde 71.6nM en condiciones isosmóticas, hasta 110nM en la condición hiposmótica y 380nM en HT o en hiposmolaridad con el agonista de PAR-1 (Figura 5a). Dicha elevación se redujo mediante el empleo del agente quelante de calcio extracelular EGTA (209nM) y fue prácticamente eliminada por la omisión de calcio intracelular usando ionomicina, con la cual se registró una  $[Ca^{2+}]_i$  de 36nM; mientras que con EGTA-AM se midió una  $[Ca^{2+}]_i$  de 25nM; con ello se identificó a los almacenes intracelulares de calcio, como la fuente principal del incremento provocado por la trombina (Figura 5b). Esta elevación de calcio implica la participación de una vía que involucra a la fosfolipasa C (PLC), ya que al emplear el inhibidor U73122, se redujo la liberación hiposmótica de glutamato<sup>3</sup>H de 5.74% a 1.79%, mientras que la hiposmótica potenciada por trombina de 21.54% a 7.08%, lo que equivale a un

67.13% de efecto inhibitorio (Figura 6). El efecto de trombina sobre la liberación de glutamato<sup>3</sup>H fue dependiente de Ca<sup>2+</sup>, ya que hubo una reducción del 63.88% en la liberación neta, cuando se empleó un medio libre de Ca<sup>2+</sup> con EGTA-AM; cuando solo se queló el calcio extracelular, se redujo la liberación de glutamato<sup>3</sup>H en un 27.94% (Figura 6).

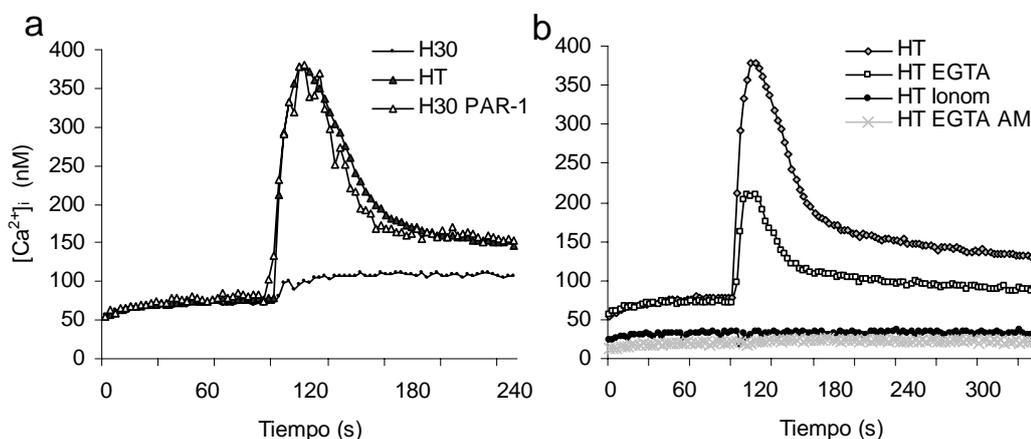


Figura 5. La trombina en un estímulo hiposmótico incrementa los niveles de calcio intracelulares a través de la activación de PAR-1. a) Aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$  en un estímulo hiposmótico (30%), en ausencia (H30) o presencia de 5U/mL de trombina (HT) o con 5 $\mu$ M de SFLLRN (H30 PAR-1). b) Disminución de la  $[Ca^{2+}]_i$  en presencia de 0.1mM de EGTA, 25 $\mu$ M de EGTA-AM (HT EGTA AM) o ionomicina 1 $\mu$ M (HT Ionom) comparado a su control HT. Resultados expresados como promedios, el error estándar fue menor al 5%,  $n \geq 4$ .

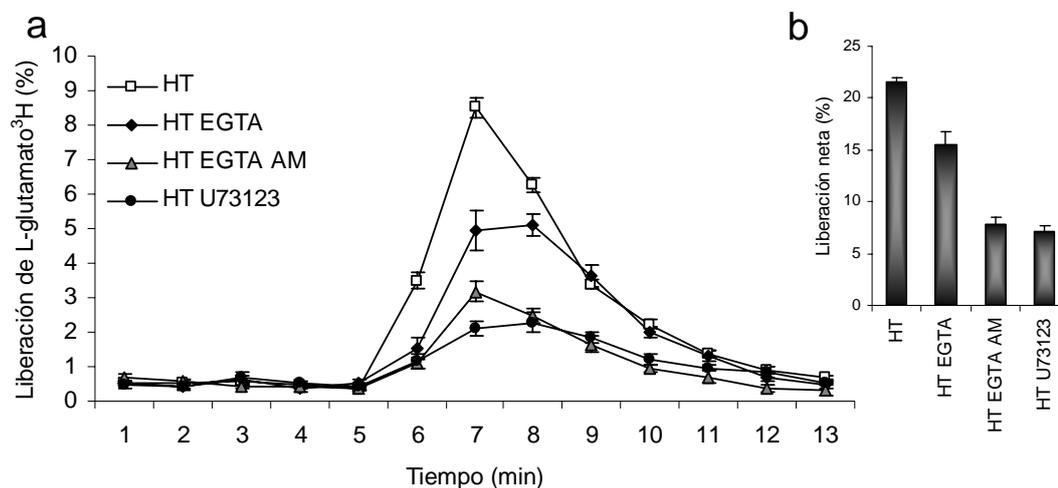


Figura 6. La trombina ejerce sus efectos potenciadores de la liberación hiposmótica a través de un mecanismo que implica la participación de PLC y es dependiente de calcio. Liberación de glutamato<sup>3</sup>H potenciada por trombina: a) curso-temporal y b) neta, con la adición de EGTA (0.1mM), EGTA-AM (25 $\mu$ M) y U73122 (5 $\mu$ M). Los resultados muestran datos promedio  $\pm$  error estándar, las reducciones alcanzadas por los agentes quelantes y del inhibidor difieren significativamente de HT a  $p < 0.05$ ,  $n \geq 6$ .

Hasta esta parte se concluyó que el calcio juega un papel muy importante, en la vía activada por trombina que conduce a un aumento en la salida de glutamato, por lo que posteriormente se analizó la posible implicación de las principales proteínas activadas en función de un aumento de calcio citosólico, como lo son la proteína cinasa C (PKC) y la calcio-calmodulina (CaM). Para este propósito se emplearon bloqueadores específicos de dichas proteínas, la queleritrina y el Gö6976, inhibidores de PKC y el W7 de CaM. El Gö6976 y la queleritrina, mostraron un efecto inhibitor de la liberación hiposmótica potenciada por trombina de un 15.5% y 19.34% respectivamente; en ausencia de trombina el uso de los bloqueadores de PKC redujo la liberación en 21% y 32%, respectivamente. Con la inhibición de la CaM, el efecto de trombina en la liberación hiposmótica neta se redujo 66.2% (Figura 7).

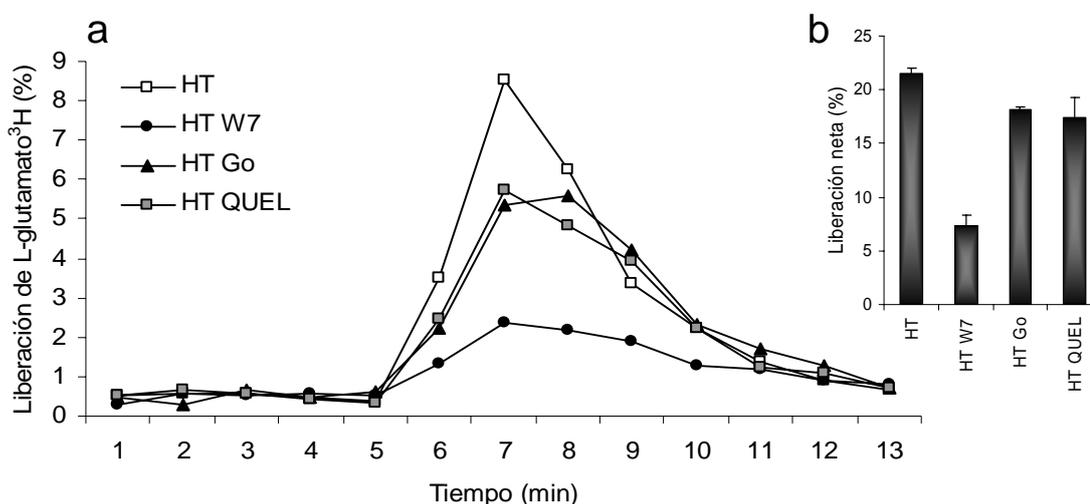


Figura 7. El efecto potenciador de la trombina en la salida de glutamato<sup>3</sup>H depende en menor medida de PKC e implica la participación de CaM en astrocitos de cerebelo. Inhibición de la liberación al emplear los bloqueadores de PKC: Gö6976 1 $\mu$ M (HT Go) o queleritrina 2.5 $\mu$ M (HT QUEL) y bloqueando a CaM con W7 50 $\mu$ M (HT W7). El efecto inhibitor de los bloqueadores W7 y Quel, fue significativamente diferente a su control HT con  $p < 0.025$ , mientras que Gö no fue significativo. Se presentan los promedios  $\pm$  error estándar,  $n \geq 4$ .

Investigaciones realizadas previamente, por Cardin y colaboradores (2003), reportaron que la salida de taurina en condiciones hiposmóticas, se reduce por bloqueadores de la actividad de la proteína cinasa 3 de inositol (PI3K), misma que es sensible a las variaciones de la  $[Ca^{2+}]_i$ . Además, la señalización desencadenada por trombina implica la activación de proteínas G, de los cuales la subunidad  $\beta\gamma$  de la proteína  $G_{12/13}$  ha sido asociada a la activación de PI3K (Brock *et*

*al.*, 2003). Con estos antecedentes se procedió a buscar la relevancia de esta cinasa, pero en la salida de glutamato, añadiendo el inhibidor wortmanina (100nM) al estímulo hiposmótico sólo o con trombina, encontrándose una reducción de la liberación neta de glutamato<sup>3</sup>H de alrededor del 50%, para ambas condiciones (Figura 8). Sabiendo previamente el papel del calcio en la liberación hiposmótica de glutamato<sup>3</sup>H potenciada por trombina, se analizó su relación con la actividad de la PI3K, para lo cual las células se trataron simultáneamente con un medio hiposmótico libre de calcio usando EGTA-AM y wortmanina, logrando con ello una inhibición del 93%, lo que evidencia el efecto aditivo de estos dos elementos (Figura 8), concluyendo que la vía por la cual participa PI3K, en el mecanismo potenciador evocado por la trombina en un estímulo hiposmótico, es totalmente independiente de calcio.

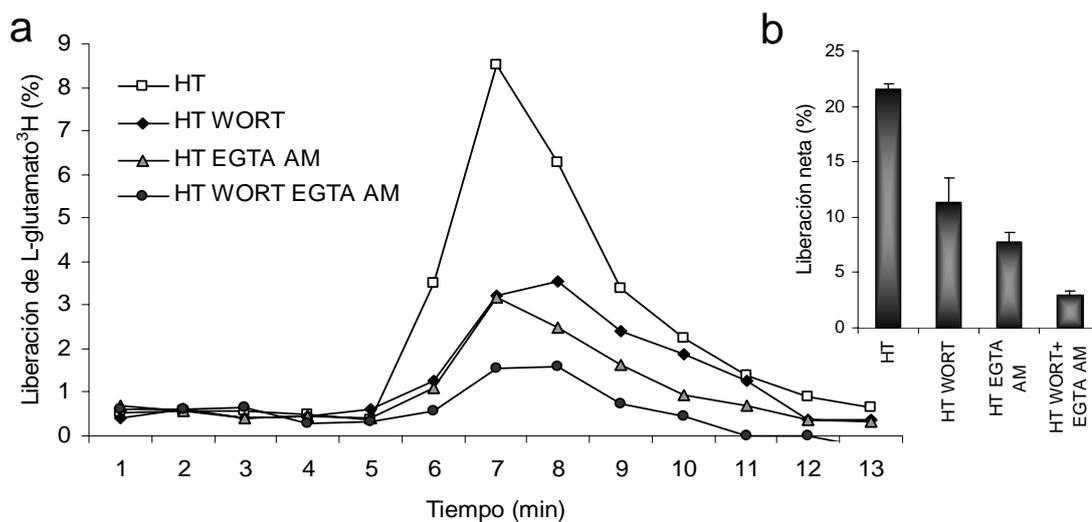


Figura 8. **La potenciación de la liberación de glutamato depende en gran medida de PI3K y su participación es independiente de calcio.** a) Liberación curso-temporal de la salida de glutamato<sup>3</sup>H potenciado por trombina (5U/mL), con la adición de wortmanina 100nM, en un medio libre de calcio con EGTA AM (25μM), o su efecto aditivo. b) Las barras expresan la liberación neta en las mismas condiciones. Los resultados se consideran como promedios ± error estándar y son significativamente diferentes a HT; p<0.01, n ≥ 4.

Se conoce que la movilización de osmolitos orgánicos durante el DRV, ocurre a través de una vía sensible a bloqueadores de canales de Cl<sup>-</sup> (Jackson y Strange, 1993; Estevez *et al.* 1998; Abdullaev *et al.*, 2006; Pasantes-Morales *et al.*, 2006b). Siendo el glutamato uno de los osmolitos que se movilizan durante el DRV,

tras una condición de edema, se indagó si la liberación que es potenciada con la trombina, también ocurre a través de esta vía. Se usaron tres típicos bloqueadores de canales de Cl<sup>-</sup>: NPPB (50μM), tamoxifen (10μM) y DCPIB (10μM), los cuales al añadirse al estímulo hiposmótico redujeron la liberación de glutamato<sup>3</sup>H en un 99.7%, 70% y 97.4%, respectivamente. Para el caso de la liberación hiposmótica potenciada por trombina, también se observó una reducción de la salida de glutamato<sup>3</sup>H que fue proporcional a la dosis de cada bloqueador (Figura 9). Se elaboraron curvas dosis-respuesta, que permitieron calcular el valor de IC<sub>50</sub> para cada bloqueador; se encontró que el bloqueador más efectivo fue el DCPIB con una IC<sub>50</sub> de 4.17μM, seguido por el tamoxifen (IC<sub>50</sub>=6.60 μM) y el NPPB (IC<sub>50</sub>=15.84 μM). Del mismo modo, la adición de estos bloqueadores, disminuyó la salida del trazador en una condición isosmótica con trombina.

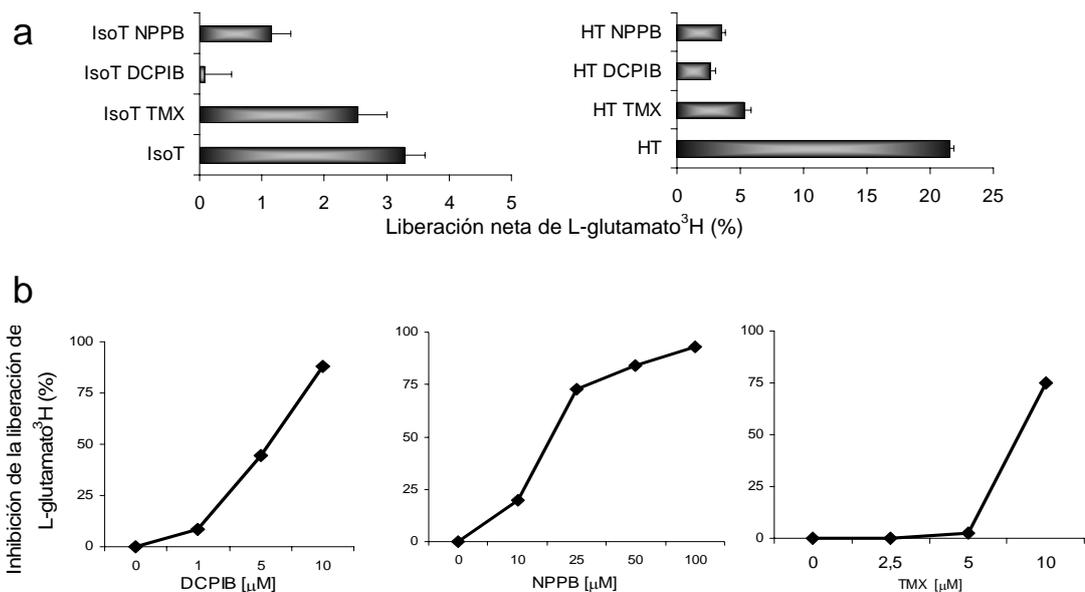


Figura 9. **Los bloqueadores de canales de Cl<sup>-</sup>, inhiben la liberación de glutamato<sup>3</sup>H potenciada por trombina.** a) Efecto de tamoxifen 10μM (TMX), DCPIB 10μM y NPPB 50μM sobre la condición isosmótica e hiposmótica 30% potenciada por trombina (IsoT e HT), los datos difieren significativamente respecto a sus controles, con p<0.01 (salvo IsoT TMX). b) Curvas contra concentración de los bloqueadores en un medio hiposmótico 30% en presencia de trombina. Los resultados se expresan en promedios ± error estándar, n ≥ 6.

Habiendo caracterizado la vía de salida de glutamato<sup>3</sup>H potenciada por trombina, durante una condición de edema hiposmótico en astrocitos de cerebelo, se

procedió a indagar si en una condición de isquemia, patología en la que ocurre un edema isosmótico, la trombina también incrementa la salida de glutamato. Para este propósito se emplearon dos modelos experimentales que simulan procesos que ocurren durante la isquemia a nivel celular.

Uno de estos modelos simula el proceso de despolarización celular que ocurre en células en isquemia, producto de la acumulación de potasio extracelular ( $[K^+]_e$ ) y del bloqueo del funcionamiento de la ATPasa  $Na^+/K^+$  mediante ouabaina (1mM). En esta condición se encontró un incremento en la liberación de glutamato $^3H$ , que fue proporcional al aumento de la  $[K^+]_e$  (Figura 10). Este incremento fue de un 136%, 226% y 440% para 40mM, 80mM y 100mM de  $[K^+]_e$ , con liberaciones netas de 0.99%, 3.47% y 9.32%, respectivamente. Sorprendentemente, la adición de trombina a las condiciones anteriores no potenció la liberación del osmolito (Figura 11), a la misma concentración a la cual provocaba un notable incremento de la salida de glutamato $^3H$  en la condición de edema hiposmótico (Figura 3).

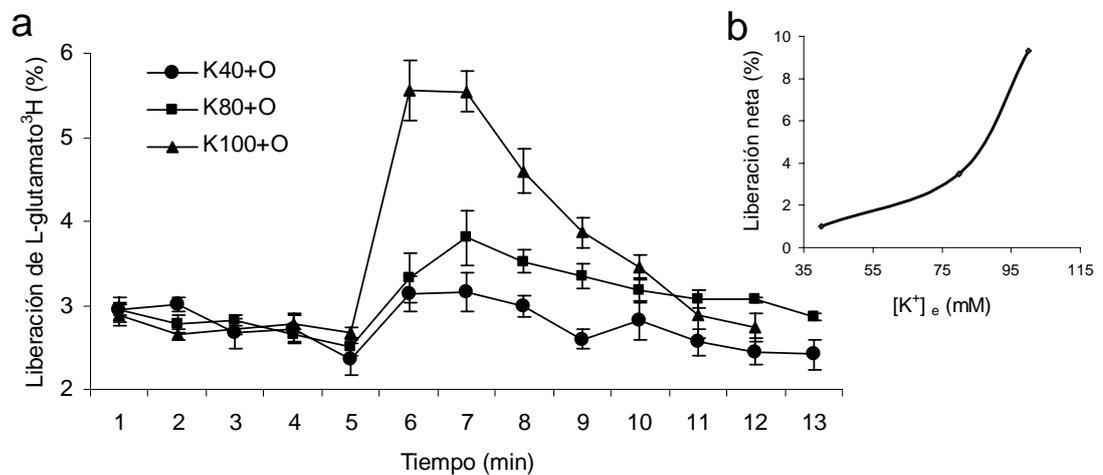


Figura 10. **Concentraciones altas de potasio extracelular ( $[K^+]_e$ ) junto al aumento intracelular de sodio ( $[Na^+]_i$ ) evocan un aumento en la salida de glutamato de astrocitos de cerebelo.** a) Salida curso-temporal de glutamato $^3H$  de astrocitos expuestos a medios isosmóticos (300mOsm) con distintas concentraciones de  $[K^+]_e$  (40mM, 80mM y 100mM) y ouabaina (O) 1mM. b) Curva contra concentración de  $K^+$  respecto a la liberación neta de glutamato $^3H$ . Los datos son promedios  $\pm$  error estándar de  $n \geq 6$ .

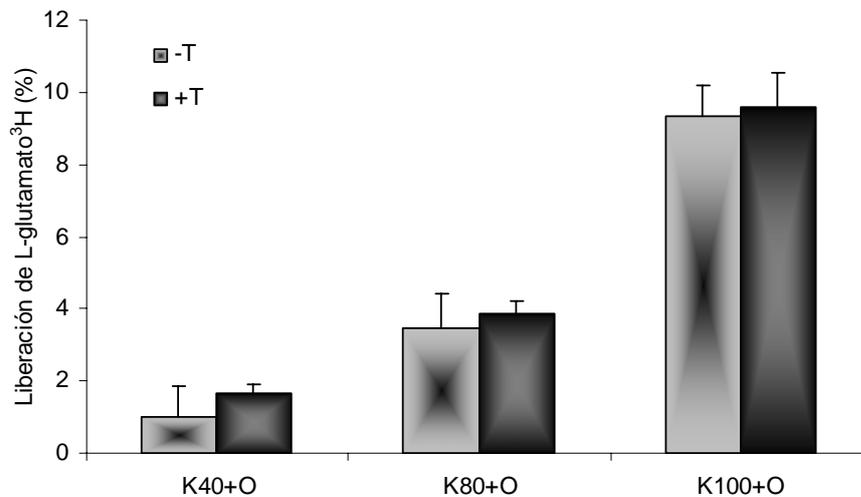


Figura 11. **La trombina en la condición de  $K^+$ /Ouabaina no incrementa la salida de glutamato de astrocitos de cerebelo.** Comparación entre el valor promedio  $\pm$  error estándar de la liberación neta de glutamato<sup>3</sup>H de astrocitos expuestos a altas  $[K^+]_e$  (40, 80 y 100 mM de KCl) más ouabaina (O) 1mM (barras claras) y las mismas condiciones en presencia de 5U/mL de trombina (barras oscuras);  $n \geq 6$ .

Como los efectos de una misma condición de isquemia difieren de acuerdo al tipo celular expuesto al daño, incluso dentro del mismo tejido nervioso (Dienel y Hertz, 2005), se probó el efecto de la trombina en astrocitos corticales expuestos a alta  $[K^+]_e$  y ouabaina, lo que provocó un aumento de la salida de glutamato desde un nivel basal de 2.7% hasta un 6%, sin registrarse de nueva cuenta potenciación con la adición de la proteasa (Figura 12).

El segundo modelo empleado fue la isquemia por inhibición glicolítica y respiratoria, que implica la adición de iodoacetato (IoA) y azida de sodio ( $NaN_3$ ) con la finalidad de bloquear la glicólisis y la cadena respiratoria de manera simultánea (Longuemare y Swanson, 1997; Cavallini *et al.*, 2005). Se encontró que la adición de un medio sin glucosa con IoA (5mM) y  $NaN_3$  (20mM), incrementa progresivamente la salida de aspartato<sup>3</sup>H desde un 2.52% hasta un 6.67%. Con la trombina en dicha condición, no se potencia la liberación del osmolito mencionado. El control de este experimento muestra que la movilización de aspartato<sup>3</sup>H, disminuye progresivamente en función del tiempo (Figura 13).

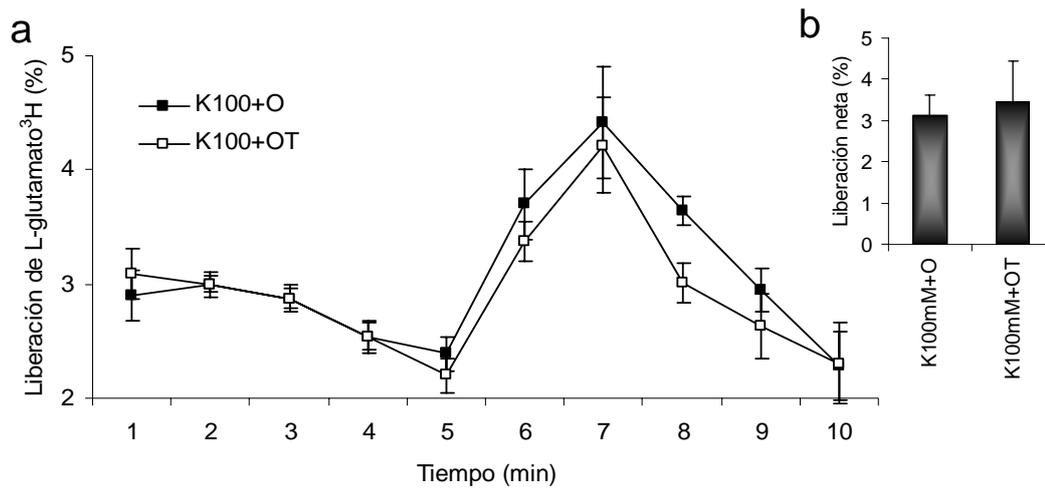


Figura 12. **La adición de trombina no potencia la liberación de glutamato de astrocitos corticales sometidos a la condición de  $K^+$ /Ouabaina.** a) Señala la liberación curso-temporal de glutamato<sup>3</sup>H de astrocitos expuestos a un medio isosmótico con 100mM de KCl y 1mM de ouabaina (O) con y sin trombina (5U/mL). b) Porcentaje de liberación neta de las mismas condiciones; n ≥ 6.

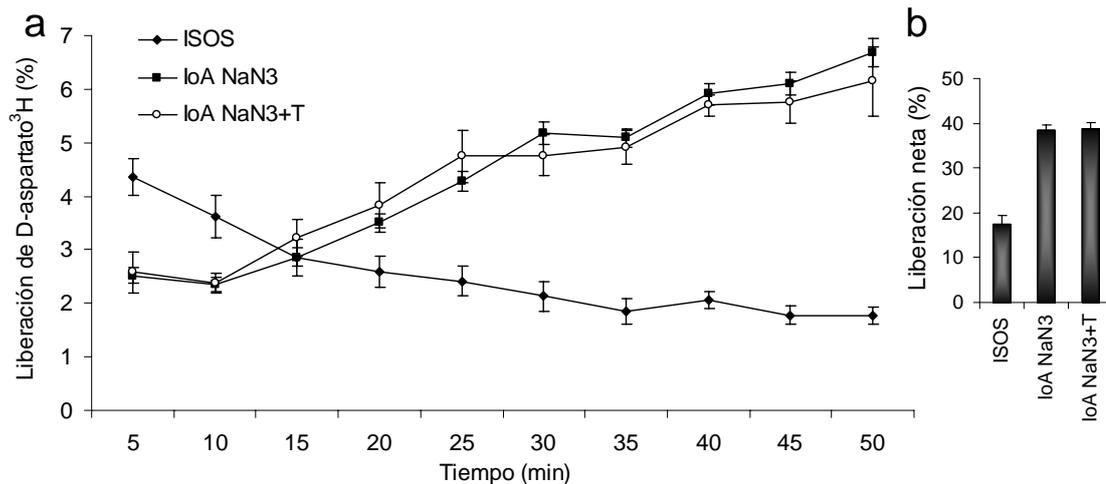


Figura 13. **La trombina no potencia la salida de aspartato en astrocitos corticales expuestos a isquemia química por inhibición glicolítica y respiratoria.** a) Efecto en la liberación curso temporal de aspartato<sup>3</sup>H durante el tratamiento con un medio isosmótico (300mOsm) con IoA 5mM más NaN<sub>3</sub> 20mM o bien adicionando 5U/mL de trombina, comparado con su control isosmótico libre de fármacos. b) Barras que representan la liberación neta de aspartato<sup>3</sup>H de las condiciones anteriores. Los datos representan promedios ± error estándar, la condición isosmótica difiere significativamente del modelo de isquemia (p<0.025), n ≥ 12.

El nulo efecto de la trombina bajo los modelos de  $K^+$ /Ouabaina y de isquemia química presentados, conduce a indagar si ocurre hinchamiento en los astrocitos. Gran parte de los trabajos realizados en el laboratorio, han demostrado

que la taurina, es un osmolito que puede evidenciar un evento de hinchamiento celular (Schousboe y Pasantes-Morales, 1992; Jentsch *et al.*, 2002), por ello se registró la salida de taurina<sup>3</sup>H bajo las condiciones trabajadas. Se encontró que la liberación de taurina se potencia durante el estímulo de K<sup>+</sup>/Ouabaina, desde un nivel basal neto en condiciones isosmóticas de 1.1% hasta 2.3% en el estímulo, además la adición de trombina en esta condición potenció la salida neta de taurina en astrocitos de cerebelo hasta 5.7%, lo que equivale a una potenciación mayor al 100%. También se incrementa la liberación de taurina<sup>3</sup>H en astrocitos corticales, durante isquemia por inhibición glicolítica y respiratoria (de 9.38% a 33.96%), sin embargo, no se potenció significativamente con la trombina (Figura 14).

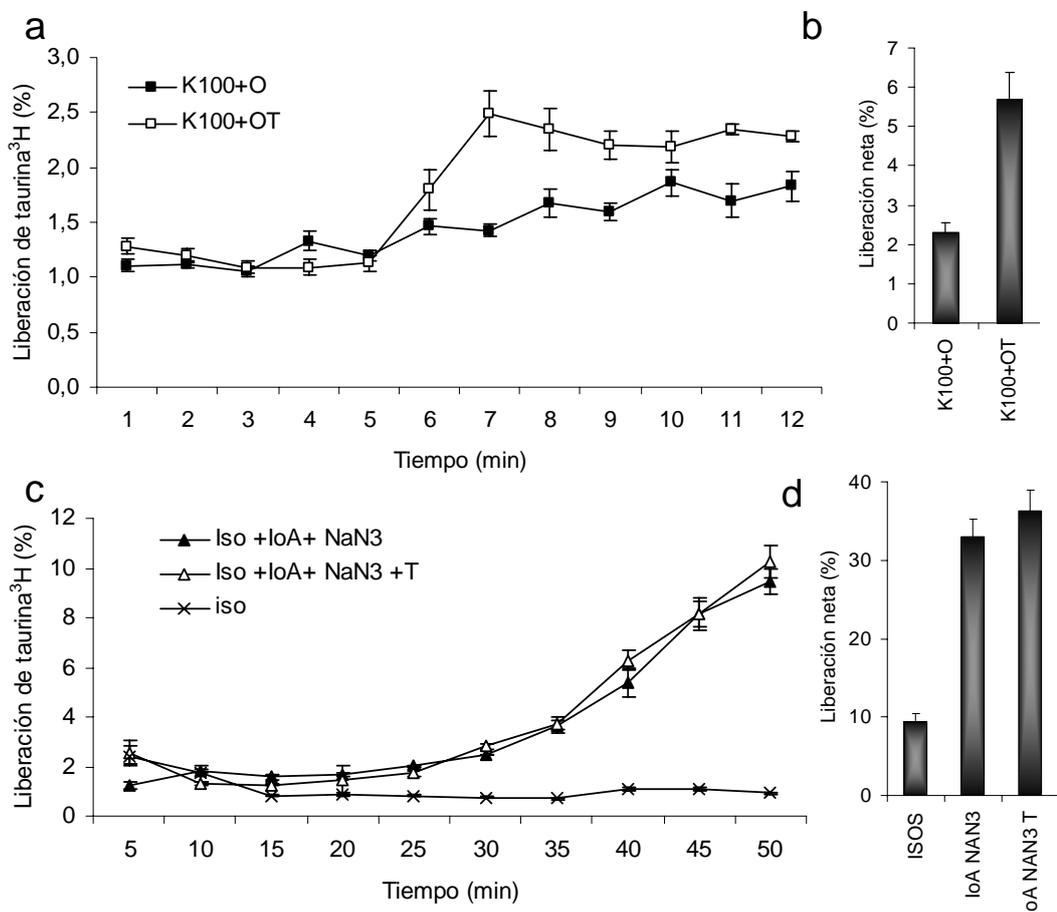


Figura 14. **La trombina potencia la liberación de taurina de astrocitos expuestos al modelo de K<sup>+</sup>/Ouabaina, pero no durante un proceso de inhibición glicolítica y respiratoria.** a) Efecto de la adición de un medio isosmótico con 100mM de KCl y ouabaina 1mM, con y sin trombina (5U/mL) en la salida de taurina<sup>3</sup>H. b) Representación en barras de la salida neta bajo las mismas condiciones, los valores difieren significativamente a p<0.05. c) Salida curso-temporal de taurina<sup>3</sup>H en un medio isosmótico con IoA (5mM) y azida de sodio (NaN<sub>3</sub>) con y sin trombina comparado con la liberación evocada por una condición libre de isquemia. d) Liberación neta de taurina<sup>3</sup>H donde la condición isquémica no es afectada por la trombina. Los valores son promedios ± error estándar, n ≥ 6.

Por otra parte, como se evidenció en los resultados iniciales (Figura 9), agregando DCPIB a una condición de hiposmolaridad, se anula por completo la salida de osmolitos potenciada por trombina, misma que ocurre por la vía de VSOAC, de tal manera que para indagar si la salida de glutamato<sup>3</sup>H o aspartato<sup>3</sup>H observada durante el modelo de K<sup>+</sup>/Ouabaina o de isquemia química (Figura 10-Figura 13) también se moviliza por esta vía, se añadió el bloqueador mencionado. En los resultados de la figura 15, se observa que el empleo del DCPIB (10µM), disminuye la salida de glutamato<sup>3</sup>H en el modelo de K<sup>+</sup>/Ouabaina solo un 53.69%; mientras que la liberación neta en el modelo de isquemia por inhibición glicolítica y respiratoria se inhibió un 18% la salida de aspartato<sup>3</sup>H.

Los datos hasta ahora presentados, sugieren que la vía principal de salida de osmolitos orgánicos, ya sea durante un proceso de isquemia o cuando se induce despolarización por K<sup>+</sup>/Ouabaina, es distinta a la vía de liberación sensible a volumen que típicamente se activa bajo una condición hiposmótica. Los efectos que suceden bajo un periodo isquémico, implican la acumulación de ácido glutámico extracelular, que en parte se debe al funcionamiento reverso de su transportador (Rutledge y Kimelberg, 1996), por ello se empleó un bloqueador del transportador de glutamato, el ácido treo-β-hidroxiaspártico (TBHA), el cual inhibió en un 99% la liberación de glutamato bajo la condición de alta [K<sup>+</sup>]<sub>e</sub> más ouabaina y redujo en un 85% la salida de aspartato en la condición de IoA más NaN<sub>3</sub> (Figura 16). La adición de TBHA no afectó la movilización de aspartato<sup>3</sup>H en el control isosmótico, en cambio la adición del DCPIB redujo la salida desde un 17.5% hasta un 11.5% (Figura 15), lo cual refleja que en ausencia de una condición de isquemia la vía sensible a volumen es funcional. Por lo tanto se concluye que la salida de osmolitos orgánicos en el modelo K<sup>+</sup>/Ouabaina o durante isquemia química, depende principalmente del funcionamiento en reversa del transportador de glutamato y en menor medida depende de la vía sensible a volumen, que se presenta bajo una condición de edema celular hiposmótico y sobre la cual la trombina evidencia su efecto.

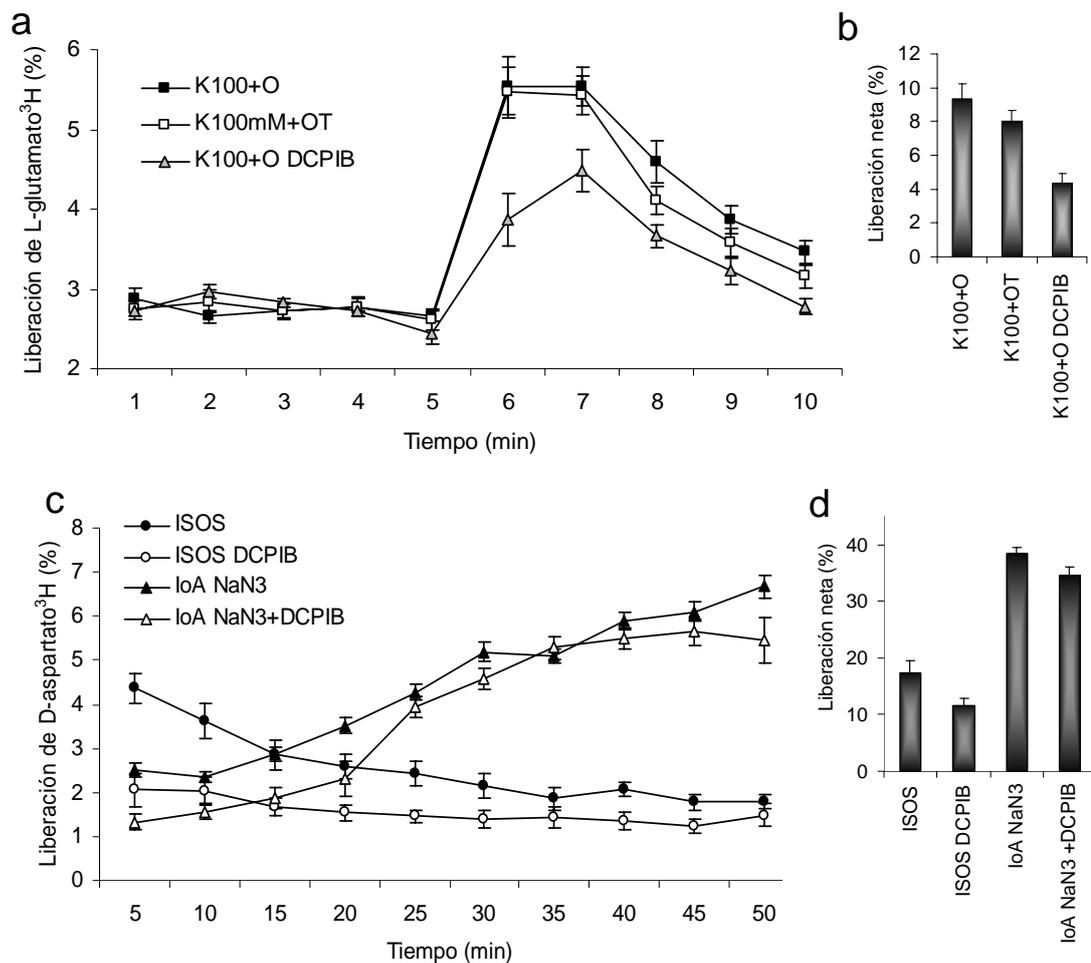


Figura 15. La salida de glutamato o aspartato, en condiciones de hinchamiento isosmótico inducido durante la condición de  $K^+$ /Ouabaina o durante la isquemia química, ocurre en menor medida por la vía VSOAC. a) Salida curso-temporal de glutamato<sup>3</sup>H durante la condición de alta  $[K^+]_e$  más ouabaina inhibida por 10 $\mu$ M de DCPIB, en b) su correspondiente valor neto de liberación. c) Salida curso-temporal de aspartato<sup>3</sup>H con adición de DCPIB (10 $\mu$ M) durante una condición isosmótica sin fármacos y mientras se induce isquemia por inhibición glicolítica y respiratoria, mostrándose los valores netos en d). Las condiciones con DCPIB no difieren de sus controles respectivos en la condición de isquemia, pero si en el modelo de  $K^+$ /Ouabaina, con  $p < 0.025$ . Resultados expresados como promedios  $\pm$  error estándar,  $n \geq 8$ .

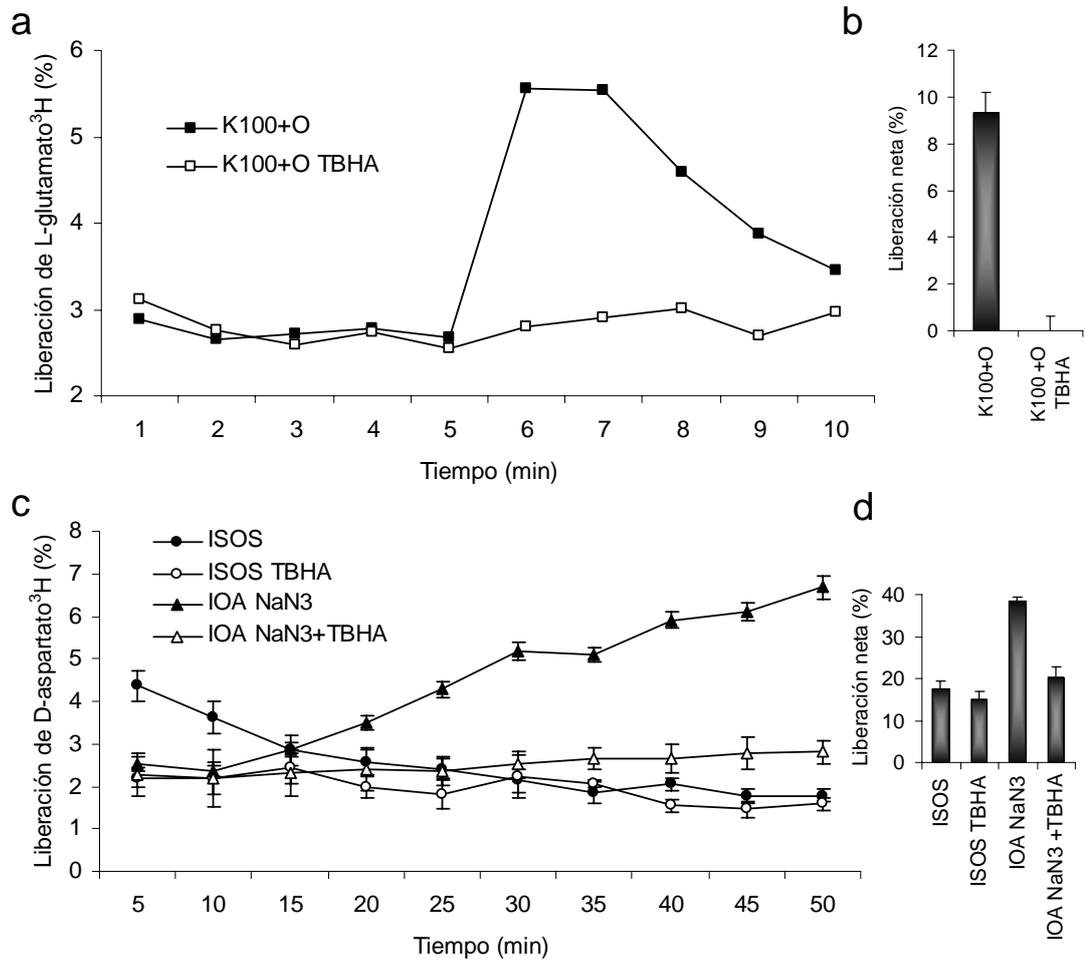


Figura 16. **La liberación de glutamato o aspartato de astrocytes expuestos a  $K^+$ /Ouabaina o a isquemia química, depende en mayor medida del funcionamiento en reversa del transportador de glutamato.** a) y b) Liberación curso-temporal y neta respectivamente, de glutamato cuando se añade TBHA ( $50\mu M$ ) al estímulo alta  $[K^+]_o$  más ouabaina. La inhibición del mismo fármaco bajo el estímulo de isquemia por inhibición glicolítica y respiratoria se muestra en c) de manera curso-temporal y en d) como liberación neta de aspartato. Los resultados son promedios  $\pm$  error estándar de  $n \geq 8$ ; con diferencia significativa entre los estímulos de  $K^+$ /Ouabaina e isquemia con TBHA y sus controles respectivos,  $p < 0.01$ .

## DISCUSIÓN

Las células animales activan mecanismos de liberación de osmolitos orgánicos, tras ser sometidas a condiciones que incrementan su volumen. Los osmolitos orgánicos son un grupo variado de moléculas, que presentan diferencias respecto a su abundancia relativa y a la cinética de su liberación en los distintos tipos celulares. Los aminoácidos examinados en este trabajo, la taurina y el glutamato o aspartato, funcionan como osmolitos universales, de éstos, la taurina tiene una inercia metabólica que le permite movilizarse sin afectar el funcionamiento celular; no así en el caso del glutamato, que en el cerebro funciona como el neurotransmisor excitador más importante.

En el cerebro de mamíferos, los astrocitos son el tipo celular más susceptible a cambios drásticos en su volumen, debido a su función amortiguadora de los cambios en el espacio extracelular, dirigida a la protección del volumen de las neuronas (Mongin *et al.*, 1999; Panickar y Norenberg, 2005). Ante un incremento en el volumen, los astrocitos iniciarán el proceso de DRV liberando osmolitos, entre ellos el glutamato. En células nerviosas, esta respuesta adaptativa puede incrementar los niveles de glutamato y si éstos exceden la capacidad del transportador, podría existir el riesgo de daño por excitotoxicidad debido a la sobreactivación de los receptores neuronales de tipo NMDA.

En los resultados iniciales se mostró que la salida de glutamato, se incrementa significativamente en función del aumento en la hiposmolaridad del medio (Figura 1), a consecuencia del mecanismo del DRV, contribuyendo con ello, a aumentar los niveles de glutamato extracelulares en el tejido cerebral ante un episodio de edema. Bajo condiciones normales, cualquier aumento en los niveles del glutamato extracelular, es amortiguado por su captura a través de los transportadores especializados de los astrocitos; no obstante, como fue mencionado, la capacidad del transportador puede ser rebasada o bien, bajo condiciones patológicas como la isquemia, la falla energética causa la disipación de los gradientes iónicos transmembranales y lleva a que los transportadores operen en reversa, contribuyendo al aumento de glutamato extracelular (Anderson y Swanson, 2000; Camacho y Massieu, 2006; Maragakis y Rothstein, 2004). Este estado patológico, puede ser agravado por la ruptura de la barrera hematoencefálica, lo que daría paso a diversas

moléculas de actividad proteolítica y/o proinflamatoria, que están presentes en el torrente sanguíneo, como la trombina, agente activador de los GPCR's del tipo PAR, lo que podría incrementar aún más los niveles de glutamato extracelular.

Existen antecedentes que muestran que la activación de algunos GPCR's, se asocia con un incremento en la liberación sensible a volumen de osmolitos orgánicos. Este es el caso de receptores purinérgicos, histamínicos, muscarínicos colinérgicos y prostanoideos (Mongin y Kimelberg, 2002; Loveday *et al.*, 2003; Falktoft y Lambert, 2004; Heacock *et al.*, 2004; Mongin y Kimelberg, 2005; Heacock *et al.*, 2006; Heacock *et al.*, 2006 b); lo cual denota una regulación de los VSOAC a través de GPCR's. En el caso de la trombina, existen reportes previos acerca de la potenciación de la liberación de osmolitos sensible a volumen en células de neuroblastoma (Cheema *et al.*, 2007) y fibroblastos (Vázquez-Juárez *et al.*, 2007). Existen receptores a trombina en un gran número en células cerebrales (Weinstein *et al.*, 1995; Junge *et al.*, 2004), lo que puede implicar que esta molécula tenga un papel en la regulación de eventos de sobrevivencia o muerte celular durante el daño cerebral, pues la trombina a concentraciones nanomolares está asociada a protección celular; sin embargo, a concentraciones altas como las que ocurren en circunstancias patológicas, incluyendo la isquemia y el trauma craneoencefálico, la trombina causa un daño celular evidente (Striggow *et al.*, 2000; Wang y Reiser, 2003; Xi *et al.*, 2003). Por ello en este trabajo, se exploró una concentración de trombina equivalente a la que puede llegar a ocurrir en estas circunstancias.

En el presente estudio, a través del marcado efecto potenciador de la trombina en la liberación de glutamato, se demostró su papel como modulador del mecanismo de activación de los VSOAC bajo condiciones de edema hiposmótico en astrocitos de cerebelo. Esta acción se llevó acabo a través de la actividad proteolítica de la trombina, esencialmente a través de la isoforma PAR-1, ya que el agonista de este receptor, logró mimetizar completamente el efecto potenciador de la trombina, a diferencia del agonista del PAR-4. No fue explorado el efecto de las otras isoformas, que aunque están presentes en los astrocitos, se activan por otras proteasas y no por trombina.

Una observación interesante fue el encontrar que la trombina potencia la liberación de glutamato bajo condiciones isosmóticas (Figura 3), lo que puede estar evidenciando un papel regulador de esta proteasa en las células del SNC, indicando

que la vía a través de la cual se sale el glutamato (VSOAC), está parcialmente abierta incluso en ausencia de un cambio osmolar.

En este trabajo se demostró que la trombina potencia la salida de glutamato sensible a volumen, a través de un incremento en el calcio intracelular, corroborando su aumento en astrocitos expuestos a un medio hiposmótico, como fue señalado por estudios previos (Morales-Mulia *et al.*, 1998; Cardin *et al.*, 2003) y se encontró un notable incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  en presencia de trombina, que fue mediado por PAR-1. Se demostró también que este incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$ , proviene mayormente de fuentes intracelulares, posiblemente del retículo endoplásmico, a través de una reacción mediada por PLC. Las fosfolipasas actuando sobre los lípidos de la membrana celular, generan segundos mensajeros como el inositol-3-fosfato (IP3), que conduce a la liberación de calcio del retículo endoplásmico y el diacilglicerol (DAG); este último en presencia de  $Ca^{2+}$  es capaz de activar a PKC, una cinasa que coordina múltiples respuestas a nivel celular. La salida de glutamato responde en paralelo a estas manipulaciones, ya que se inhibe por prevenir el incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  y la actividad de la PLC. Esta fosfolipasa participa en la potenciación de la liberación osmosensible de osmolitos mediada por GPCRs en varios tipos celulares (Bender *et al.*, 1993; Heacock *et al.*, 2004; Cheema *et al.*, 2005; Mongin y Kimelberg, 2005; Chema *et al.*, 2007), aunque en otros es independiente de PLC (Heacock *et al.*, 2006).

El incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  inducido por hiposmolaridad más trombina, puede activar a las cinasas de la familia PKC. Estas cinasas están involucradas en el DRV en ciertos tipos celulares (Chou *et al.*, 1998; Estevez *et al.*, 1999; Heacock *et al.*, 2006) y podrían estar vinculadas con la potenciación por trombina en la salida de glutamato. Los resultados de este estudio muestran que dicha cinasa, no tienen una participación importante en este proceso. La vía de la CaM mostró tener una influencia mayor, ya que su inhibición redujo considerablemente la liberación de glutamato potenciada por trombina. Esta vía también participa en la liberación sensible a volumen de taurina en distintos tipos celulares (Kirk y Kirk, 1994; Huang *et al.*, 2001) incluidos los astrocitos (Bender *et al.*, 1992; Li *et al.*, 2002).

La cinasa PI3K está involucrada en la liberación de taurina activada por hiposmolaridad en células gliales del núcleo supraóptico (Deleuze *et al.*, 2000), en neuronas granulares (Morales-Mulia *et al.*, 2001) y en astrocitos (Cardin *et al.*, 2003). El presente estudio mostró que la PI3K contribuye asimismo a la salida de

glutamato potenciada por trombina. El mecanismo por el cual la hiposmolaridad y la trombina pueden activar a PI3K, no se conoce con exactitud. Entre las posibilidades consideradas están un efecto a través de la subunidad G $\beta\gamma$  (Leopoldt *et al.*, 1998; Brock *et al.*, 2003), mediante la transactivación de EGFR (Vázquez-Juárez *et al.*, 2007), o por algún otro mecanismo dependiente de calcio (Cardin *et al.*, 2003). Esta última posibilidad parece estar descartada en nuestras condiciones ya que la prevención del incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  y la inhibición de PI3K tuvieron un efecto aditivo.

La liberación de glutamato potenciada por trombina ocurrió a través de la vía sensible a volumen que moviliza a los osmolitos orgánicos en la mayor parte de las células (Kimmelberg *et al.*, 1990; Sánchez-Olea *et al.*, 1996; Estevez *et al.*, 1998), ya que los bloqueadores de esta vía redujeron prácticamente en su totalidad la salida de glutamato. En conjunto, los resultados hasta esta parte, establecen la influencia de la activación de PAR-1 mediada por trombina en la modulación de la vía VSOAC durante un modelo de edema hiposmótico.

En este trabajo también se examinó el efecto de la trombina sobre la liberación del glutamato en edema isosmótico, simulando condiciones de isquemia. Los modelos empleados fueron el de un incremento en  $[K^+]_e$  junto con el bloqueo de la ATPasa  $Na^+/K^+$  ( $K^+_e$ /Ouabaina) y el de isquemia por inhibición glicolítica y respiratoria. El uso de dichos modelos, se justifica porque en cerebros con isquemia se alcanzan niveles de  $[K^+]_e$  superiores a 80mM (Somjen, 1979); asimismo se ha demostrado que el uso del iodoacetato como inhibidor de la glicólisis, ofrece un buen modelo para la inducción de isquemia química, en el que los niveles de captura de glutamato, se inhiben alrededor de un 90% (Gemba *et al.*, 1994) y es reportado el uso de  $NaN_3$  como una toxina mitocondrial, capaz de inducir un fallo energético reversible, generando episodios de isquemia química en modelos *in vitro* (Longuemare y Swanson, 1995; Longuemare y Swanson, 1997; Cavallini *et al.*, 2005).

Está bien documentado el hecho de que en condiciones de isquemia, se incrementan notablemente los niveles de glutamato extracelular, pero existe una controversia acerca de los mecanismos responsables de este incremento. Se consideran como posibilidades por una parte, la operación del transportador en reversa (Szatkowski *et al.*, 1990; Gemba *et al.*, 1994; Kimmelberg *et al.*, 1995; Rossi *et al.*, 2000) y por otra la activación de la vía sensible a volumen (Kimmelberg y

Mongin, 1998; Phillis *et al.*, 1997; Feustel y Kimelberg, 2004; Kimelberg *et al.*, 2004), ya que se ha reportado un incremento temprano en el volumen celular en esta condición. Existen estudios que usan inhibidores de la vía VSOAC o de los transportadores, señalando que ambos mecanismos contribuyen en igual medida a la liberación de aminoácidos excitadores durante la isquemia (Kimelberg *et al.*, 2004). Por otra parte, hay estudios que confirman el incremento en la liberación de ácido glutámico bajo condiciones de isquemia a través de la activación de receptores purinérgicos (Sperlágh *et al.*, 2007), que al igual que los PAR's, son GPCR's. La importancia de este tema radica en la posible muerte por excitotoxicidad en las células sobrevivientes alrededor del foco isquémico. Sin embargo, una de las conclusiones de este trabajo, es que si bien la trombina incrementa notablemente a salida de glutamato en astrocitos sometidos a edema hiposmótico, no lo hace bajo la condición de isquemia química o en el modelo  $K^+$ /Ouabaina.

En este estudio se mostró que la vía de salida de glutamato<sup>3</sup>H, en astrocitos de cerebelo y corticales expuestos a  $K^+$ /Ouabaina, no ocurre mayormente como consecuencia de un incremento en volumen, ya que se reduce en menor medida por el bloqueador altamente selectivo DCPIB y de acuerdo a los experimentos más recientes del laboratorio persiste en condiciones hiperosmóticas. A este respecto existen resultados contradictorios pues algunos bloqueadores menos selectivos de la vía VSOAC, como el tamoxifen o el NPPB, inducen una reducción de la liberación de aspartato, glutamato y taurina (Rutledge *et al.*, 1998; Nelson *et al.*, 2003; Feustel *et al.*, 2004) en modelos similares, en tanto que hay reportes del nulo efecto de otros bloqueadores como el L644711 (Jaubaudon *et al.*, 2000; Rossi *et al.*, 2000). Estas diferencias podrían deberse a las variaciones en el modelo experimental utilizado *in vitro*. En nuestras condiciones, la mayor parte de la salida de glutamato ocurre a través del transportador operando en reversa, ya que la liberación se eliminó en presencia del inhibidor del transportador (TBHA). Con estos experimentos se concluye la predominancia del transportador sobre la vía VSOAC, como mecanismo de liberación del glutamato en el modelo  $K^+$ /Ouabaina. En el modelo de isquemia por inhibición glicolítica y respiratoria, la liberación de aspartato no se afectó en absoluto por el DCPIB y por el contrario, se eliminó en presencia del bloqueador del transportador, por lo que se concluye igualmente, que el mecanismo de salida del aspartato es la operación reversa del transportador.

El abordaje experimental usado para investigar si la vía VSOAC está activada en los modelos de isquemia, fue seguir la liberación de taurina, que consistentemente responde a condiciones de incremento en el volumen (Jentsch *et al.*, 2002). Los resultados sugieren un incremento en el volumen en el modelo de  $K^+$ /Ouabaina, mientras que no parece ser el caso en la condición de isquemia química.

Los resultados sobre un posible efecto de potenciación de la liberación del glutamato por trombina en las condiciones de isquemia probadas en este estudio llevaron a las siguientes consideraciones: la trombina potencia la liberación de taurina en el modelo  $K^+$ /Ouabaina, en el que la salida de taurina ocurre a través del mecanismo sensible a volumen, pero no lo hace en el modelo de isquemia química cuando la salida de taurina no parece ocurrir a través de esta vía. En este último caso puede ocurrir que los astrocitos expuestos a ese modelo de isquemia, no experimenten hinchamiento celular y que la salida de taurina ocurra fundamentalmente por el funcionamiento en reversa de su transportador; o bien que la vía esté inoperante debido a la caída de los niveles de ATP, pues se ha documentado sólidamente que la operación de la vía VSOAC requiere de una acción alostérica de ATP, sin que sea necesaria su hidrólisis (Strange *et al.*, 1996), además existen reportes que señalan una disminución drástica del ATP intracelular con el uso de los agentes iodoacetato y  $NaN_3$  (Gemba *et al.*, 1994; Longuemare *et al.*, 1999). Por lo tanto, se puede comprender que con este modelo de isquemia, la salida de taurina y de glutamato, no se hayan visto afectadas por la trombina.

En el caso del glutamato, su liberación en los dos modelos tiene lugar esencialmente por la operación reversa del transportador, ya que tuvo un reducido o nulo efecto el uso del DCPIB, lo que implicaría que no hay participación la vía VSOAC, sobre la cual la trombina ejerce su efecto potenciador. En cambio, los resultados sobre el efecto de trombina en condiciones hiposmóticas, mostraron que la liberación del glutamato estimulada por hiposmolaridad y potenciada por trombina ocurre por completo a través del VSOAC, que no es el caso para su movilización en los modelos de isquemia.

En el modelo de  $K^+$ /Ouabaina el incremento en volumen ocurre debido a que la  $ATPase Na^+/K^+$  es inoperante, pero los niveles de ATP permanecen sin ser alterados a corto plazo (Silver y Erecinska, 1997); sin embargo, la salida de glutamato parece ocurrir enteramente a través del bloqueo del transportador, (aunque no puede descartarse una participación tal vez temprana del VSOAC, con base en la

inhibición parcial por DCPIB), un mecanismo sobre el cual la trombina no ejerce ninguna influencia.

inhibición parcial por DCPIB), un mecanismo sobre el cual la trombina no ejerce ninguna influencia.

## CONCLUSIONES

En conjunto, los resultados permiten obtener las siguientes conclusiones:

1. La trombina provoca un incremento considerable en la salida de glutamato de astrocitos expuestos a edema hiposmótico. El glutamato se desplaza por la vía de movilización de osmolitos orgánicos sensible a volumen (VSOAC).
2. El efecto potenciador de la trombina, en la liberación de glutamato en condiciones hiposmóticas, es resultado de su actividad proteolítica sobre la isoforma 1 del el Receptor Activado por Proteasas (PAR-1).
3. La trombina ocasiona un aumento notable de los niveles de  $[Ca^{2+}]_i$ , en los astrocitos expuestos a hiposmolaridad. Este incremento se origina principalmente de pozas intracelulares y es dependiente de la activación de un mecanismo que implica a la PLC. El incremento en  $[Ca^{2+}]_i$ , activa a la proteína CaM y en menor medida a la PKC.
4. La cinasa PI3K, participa en el mecanismo potenciador de la trombina, en la salida de glutamato sensible a volumen. La contribución de PI3K es independiente de la vía de señalización mediada por PLC- $Ca^{2+}$ . Se sugiere que PI3K puede ser activada a través de un mecanismo dependiente de proteínas G, de manera directa desde PAR-1.
5. El glutamato se libera en dos modelos de edema isosmótico que simulan una condición isquémica: un incremento en  $[K^+]_e$  a niveles que se alcanzan en la isquemia, junto con el bloqueo de la ATPasa  $Na^+/K^+$  por ouabaina; así como en la isquemia por inhibición glicolítica y respiratoria.

6. La salida de glutamato en estas dos condiciones tiene lugar por la operación reversa del transportador y no se potencia por trombina. Se concluye que en el modelo de  $K^+$ /Ouabaina, el detonador de la salida es la despolarización causada por la disipación de los gradientes iónicos y no el incremento en el volumen. En el caso de la isquemia química, la falta de hinchamiento o bien, el déficit de ATP generado en esta condición, impide la operación de la vía VSOAC que requiere ATP alostérico para su activación.
7. No se descarta la posibilidad de que la trombina potencie la liberación de glutamato, en las células del área adyacente al foco isquémico, en las que persiste la condición de hinchamiento pero en las que los niveles de ATP intracelular permitan todavía la operación de la VSOAC.

Con el desarrollo de esta investigación se espera contribuir a la comprensión de los mecanismos moleculares y celulares, que subyacen a condiciones de edema e isquemia cerebral, lo que permitirá identificar los blancos terapéuticos para contrarrestar estas patologías.

## GLOSARIO

<b>Azida de sodio</b>	Inhibe la función de la citocromo oxidasa por unión irreversible al cofactor hemo, en un proceso similar al realizado por el monóxido de carbono. Sus efectos dependen de la cantidad y tiempo de exposición.
<b>DCPIB</b>	Bloqueador altamente selectivo de la vía de canales de aniones y osmolitos orgánicos sensible a volumen.
<b>EGTA</b>	Agente quelante del calcio extracelular.
<b>EGTA-AM</b>	Agente quelante del calcio intracelular.
<b>Fura2-AM</b>	Identificador químico fluorescente del calcio intracelular.
<b>Gö 6976</b>	Inhibidor de la actividad de la proteína cinasa C.
<b>GYPGKF</b>	Péptido agonista de la isoforma 4 del receptor activado por proteasas.
<b>Iodoacetato</b>	Fármaco que reacciona con los grupos cisteína (-SH) para formar una proteína carboximetilada, afectando a enzimas importantes para la glicólisis. También es conocido como ácido iodoacético.
<b>Ionomicina</b>	Agente ionóforo, derivado de microorganismos, que permite la movilización del calcio a través de la membrana celular.
<b>NPPB</b>	Bloqueador general de canales de cloro.
<b>Ouabaina</b>	Bloqueador de la ATPasa Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> .
<b>Osmolaridad</b>	Número de moles de partículas de un soluto por kilogramo de agua, sin considerar la masa, tamaño, diversidad o actividad iónica de dichas partículas.
<b>PPACK</b>	Inhibidor de la actividad catalítica de la trombina.
<b>Quelerritina</b>	Inhibidor de la actividad de la proteína cinasa C.
<b>SFFLRN</b>	Péptido agonista de la isoforma 1 del receptor activado por proteasas.
<b>Tamoxifen</b>	Bloqueador de canales de cloro. Modulador selectivo de los receptores a estrógeno, muy empleado en el tratamiento contra el cáncer.
<b>TBHA</b>	Inhibidor competitivo del transportador de glutamato presente en el sistema nervioso.
<b>Trombina</b>	Proteasa de serina presente en el torrente sanguíneo, importante en los procesos de coagulación y modulador nivel celular al actuar sobre receptores de tipo GPCR.
<b>U73122</b>	Inhibidor selectivo de la proteína cinasa-3 de inositol.
<b>W7</b>	Inhibidor de la proteína calcio-calmodulina.
<b>Wortmanina</b>	Inhibidor de la proteína cinasa 3 de inositol (PI3K) de la vía AKT.

## REFERENCIAS

- Abdullaev IF., Rudkouskaya A., Schools GP., Kimelberg HK. y AA. Mongin. 2006. "Pharmacological comparison of swelling-activated excitatory amino acid release and Cl<sup>-</sup> currents in cultured rat astrocytes". **J. Physiol.** 572: 677-689.
- Almeida A., Delgado-Esteban M., Bolanos JP. y JM. Medina. 2002. "Oxygen and glucose deprivation induces mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurones but not in astrocytes in primary culture". **J. Neurochem.** 81: 207-217.
- Anderson CM. y RA. Swanson. 2000. "Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation and physiological functions". **Glia** 32: 1-14.
- Arudine M. y M. Tymianski. 2004. "Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury". **Cell Mol. Life Sci.** 61: 657-668.
- Beal MF. 1992. "Mechanisms of excitotoxicity in neurologic diseases". **FASEB J.** 6: 3388-3344.
- Bender AS., Neary JT., Blicharska J., Norenberg LO. y MD. Norenberg. 1992. "Role of calmodulin and protein kinase C in astrocytic cell volume regulation". **J. Neurochem.** 58: 1874-1882.
- Bender AS., Neary JT. y MD. Norenberg. 1993. "Role of phosphoinositide hydrolysis in astrocyte volume regulation". **J. Neurochem.** 61: 1506-1514.
- Benveniste H., Drejer J., Schousboe A. y NH. Diemer. 1984. "Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis". **J. Neurochem.** 43: 1369-1374.
- Bittigau P. y C. Ikonomidou. 1997. "Glutamate in neurologic diseases". **Child Neurol.** 12: 471-485.
- Brock C., Schaefer M., Reusch HP., Chupalla C., Michalke M., Spicher K., Schultz G. y B. Nurberg. 2003. "Roles of G $\beta\gamma$  in membrana recruitment and activation of p110/p101 phosphoinositide 3-kinase  $\gamma$ ". **J. Cell Biol.** 160: 89-99.
- Brown A. y IV. Simpson. 1972. "Water relations of sugar-tolerance yeasts: the role of intracellular polyols". **J. Gen. Microbiol.** 72: 589-591.
- Budd SL. 1998. "Mechanisms of neuronal damage in brain hypoxia/ischemia: focus on the role of mitochondrial calcium accumulation". **Pharmacol. Ther.** 80: 203-229.
- Camacho A. y L. Massieu. 2006. "Role of glutamate transporters in the clearance and release of glutamate during ischemia and its relation to neuronal death". **Arch. Med. Res.** 37: 11-18.
- Cardin V., Lezama R., Torres-Márquez ME. y H. Pasantes-Morales. 2003. "Potentiation of osmosensitive taurine release and cell volume regulation by Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> rise in cultured cerebella astrocytes". **Glia** 44: 119-128.
- Cavallini S., Marti M., Marino S., Selvatici R., Beani L., Bianchi C. y A. Siniscalchi. 2005. "Effects of chemical ischemia in cerebral cortex slices. Focus on nitric oxide". **Neurochem. Int.** 47: 482-490.

- Cheema TA., Ward CE. y SK. Fisher. 2005. "Subnanomolar concentrations of thrombin enhance the volume-sensitive efflux of taurine from human 1321N1 astrocytoma cells". **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 315: 755-763.
- Cheema TA., Pettigrew VA. y SK. Fisher. 2007. "Receptor regulation of volume-sensitive efflux of taurine and iodide from Human SH-SY5Y neuroblastoma cells: differential requirements for  $Ca^{2+}$  and protein kinase C". **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 320: 1068-1077.
- Chou CY., Shen MR., Hsu KS., Huang HY. y HC. Lin. 1998. "Involvement of PKC $\alpha$  in regulatory volume decrease responses and activation of volume-sensitive chloride channels in human cervical cancer HT-3 cells". **J. Physiol.** 512: 435-448.
- Cholewinski AJ. y GP. Wilkin. 1988. "Peptide receptors on astrocytes: evidence for regional heterogeneity". **Biochem. Soc. Trans.** 16: 429-432.
- Cohen DM. 2005. "SRC family kinases in cell volume regulation". **Am. J. Physiol. Cell Physiol.** 288: C483-C493.
- Cottrell GS., Coelho AM. y N. Bunnett. 2002. "Protease-activated receptors: the role of cell-surface proteolysis in signalling". **Essays Biochem.** 38: 169-183.
- De Castro Ribeiro M., Badaut J., Price M., Meins M., Bogousslavsky J., Monard D. y L. Hirt. 2006. "Thrombin in ischemic neuronal death". **Exp. Neurol.** 198:199-203.
- Deleuze C., Duvoid A., Moos FC. y N. Hussy. 2000. "Tyrosine phosphorylation modulates the osmosensitivity of volume-dependent taurine efflux from glial cells in the rat supraoptic nucleus". **J. Physiol.** 523: 291-299.
- Dhar-Chowdhury P., Malester B., Rajacic P. y WA. Coetzee. 2007. "The regulation of ion channels and transporters by glycolytically derived ATP". **Cell Mol. Life Sci.** 21: 1-15.
- Dienel G. y L. Hertz. 2005. "Astrocytic contributions to bioenergetics of cerebral ischemia". **Glia** 50: 362-388.
- Dihanich M., Kaser M., Reinhard E., Cunningham D. y D. Monard. 1991. "Prothrombin mRNA is expressed by cells of the nervous system". **Neuron** 6: 575-581.
- Doble A. 1999. "The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease". **Pharm. Ther.** 81: 163-221.
- Dringen R. 2000. "Metabolism and functions of glutathione in brain". **Prog. Neurobiol.** 62: 649-671.
- Dugan LL. y Choi. 1999. "Hypoxic-Ischemic Brain Injury and Oxidative Stress" (cap. 34) *In: Siegel GJ., Agranoff BW., Fisher SK., Albers RW. y MD. Uhler (eds.) Basic Neurochemistry Molecular, Cellular and Medical Aspects.* Sexta edición, Ed. American Society for Neurochemistry.
- Erecinska M. y IA. Silver. 1990. "Metabolism and role of glutamate in mammalian brain". **Prog. Neurobiol.** 35: 245-296.
- Estevez AY., O'Reagan MH., Song D. y JW. Phillis. 1998. "Effects on anion channel blockers on hyposmotically induced amino acid release from the in vivo rat cerebral cortex". **Neurochem. Res.** 24:447-452.

- Estevez AY., O'Regan MH., Song D. y JW. Phillis. 1999. "Hyposmotically induced amino acid release from the rat cerebral cortex: role of phospholipases and protein kinases". **Brain Res.** 844: 1-9.
- Falktoft B. y IH. Lambert. 2004. "Ca<sup>2+</sup>-mediated potentiation of the swelling-induced taurine efflux from HeLa cells: on the role of calmodulin and novel protein kinase C isoforms". **J. Membr. Biol.** 201: 59-75.
- Feustel PJ., Jin Y. y HK. Kimelberg. 2004. "Volume-regulated anion channels are predominant contributors to release of excitatory amino acids in the ischemic cortical penumbra". **Stroke** 35: 1164-1168.
- Fonnum F. 1984. "Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain". **J. Neurochem. Res.** 9: 1689-1698.
- Franco R., Lezama R., Ordaz B. y H. Pasantes-Morales. 2004. "Epidermal growth factor receptor is activated by hyposmolarity an early signal modulating osmolyte efflux pathways in Swiss 3T3 fibroblast". **Pflug. Arch. Eur. J. Physiol.** 447: 830-839.
- Friedrich B., Matskevich I. y F. Lang. 2006. "Cell volume regulatory mechanisms". *In: Lang F. (ed) Mechanisms and Significance of Cell Volume Regulation.* Vol. 152. pp. 1-8.
- Furukawa K., Fu W. y Y. Li. 1997. "The actin-severing protein gelsolin modulates calcium channel and NMDA receptor activities and vulnerability to excitotoxicity in hippocampal neurons". **J. Neurosci.** 17: 8178-8186.
- García JH., Kalimo H., Kamijyo Y. y BF Trump. 1977. "Cellular events during partial cerebral ischemia. I. Electron microscopy of feline cerebral cortex after middle cerebral artery occlusion". **Virchows Arch. B.** 25: 191-206.
- Gemba T., Oshima T. y M. Ninomiya. 1994. "Glutamate efflux via the reversal of the sodium-dependent glutamate transporter caused by glycolytic inhibition in rat cultured astrocytes". **Neuroscience** 63: 789-795.
- Haddad J. y C. Jiang. 1997. "O<sub>2</sub>-sensing mechanisms in excitable cells: Role of plasma membrane K<sup>+</sup> channels". **Annu. Rev. Physiol.** 59: 23-43.
- Heacock AM., Kerley D., Grzegorz TG., Van Troostenberghe AT. y SK. Fisher. 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: 1097-1104.
- Heacock AM., Dodd MS. y SK. Fisher. 2006. "Regulation of volume-sensitive osmolyte efflux from human SH-SY5Y neuroblastoma cells following activation of lysophospholipid receptors". **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 317: 685-693.
- Heacock AM., Foster DJ. y SK. Fisher. 2006b. "Prostanoid receptors regulate the volume-sensitive efflux of osmolytes from murine fibroblasts via a cyclic AMP-dependent mechanism". **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 319: 963-971.
- Hertz L. y HR. Zielke. 2004. "Regulation of glutamatergic activities: astrocytes as the Star a of the show". **Trends Neurosci.** 27 :735-743.

- Hossmann KA. 1998. "Thresholds of ischemic injury". In: Ginsberg MD. y J. Bogousslavsky (eds.). *Cerebrovascular Disease. Pathophysiology, Diagnosis and Treatment*. Vol. 1 Blackwell Science. pp. 193-204.
- Huang CC., Chang CB., Liu JY., Basavappa S. y PH. Lim. 2001. "Effects of calcium, calmodulin, protein kinase C and protein tyrosine kinases on volume-activated taurine efflux in human erythroleukemia cells". **J. Cell Physiol.** 189: 316-322.
- Hugon J., Vallat JM. y M. Dumas. 1996. "Role of glutamate and excitotoxicity in neurologic diseases". **Rev. Neurol.** 152: 239-48.
- Huntington JA. 2005. "Molecular recognition mechanisms of thrombin". **J. Thromb. Haemost.** 3: 1861-1872.
- Iadecola C. 1997. "Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury". **Trends Neurosci.** 20: 132-139.
- Jabaudon D., Scanziani M., Gahwiler BH. y U. Gerber. 2000. "Acute decrease in net glutamate uptake during energy deprivation". **Proc. Natl. Acad. Sci.** 97: 5610-5615.
- Jackson PS. y K. Strange. 1993. "Volume-sensitive anion channel mediate swelling-activated inositol and taurine efflux". **Am. J. Physiol.** 265: C1489-C1500.
- Jentsch TJ., Stein V., Weinreich F. y AA. Zdebik. 2002. "Molecular structure and physiological function of chloride channels". **Physiol. Rev.** 82: 503-568.
- Junge CE., Lee CJ., Hubbard KB., Zhang Z., Olson JJ., Hepler JR., Brat DJ. y SF. Traynelis. 2004. "Protease-activated receptor-1 in human brain: localization and functional expression in astrocytes". **Exp. Neurol.** 188: 94-103.
- Kimelberg HK., Goderie SK., Higman S., Pang S. y RA. Waniewski. 1990. "Swelling-induced release of glutamate, aspartate and taurine from astrocyte cultures". **J. Neurosci.** 10: 1583-1591.
- Kimelberg HK. y AA. Mongin. 1998. "Swelling-activated release of excitatory amino acids in the brain: relevance for pathophysiology". **Contrib. Nephrol.** 123: 240-257.
- Kimelberg HK., Rutledge E., Goderie S. y C. Charniaga. 1995. "Astrocytic swelling due to hypotonic or high K<sup>+</sup> medium causes inhibition of glutamate and aspartate uptake and increases their release". **Cereb. Blood Flow Metab.** 15: 409-416.
- Kimelberg HK., Nestor NB. y PJ. Feustel. 2004. "Inhibition of release of taurine and excitatory amino acids in ischemia and neuroprotection". **Neurochem. Res.** 29: 267-274.
- Kimelberg HK. 2005. "Astrocytic swelling in cerebral ischemia as a possible cause of injury and target for therapy". **Glia** 50: 389-397.
- Kintner DB., Su G., Lenart B., Ballard AJ., Meyer JW., Ng LL., Shull GE. y D. Sun. 2004. "Increased tolerance to oxygen and glucose deprivation in astrocytes from Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform 1 null mice". **Am. J. Physiol.** 287: 12-21.
- Kirk J. y K. Kirk. 1994. "Inhibition of volume-activated I- and taurine efflux from HeLa cells by P-glycoprotein blockers correlates with calmodulin inhibition". **J. Biol. Chem.** 269: 29389-29394.

- Klatzo I. 1967. "Neuropathological aspects of brain edema". **J. Neuropathol. Exp. Neurol.** 26: 1-14.
- Kristian T. y BK. Siesjo. 1997. "Changes in ionic fluxes during cerebral ischaemia". **Int. Rev. Neurobiol.** 40: 27-45.
- Lambert IH. 2004. "Regulation of the cellular content of the organic osmolyte taurine in mammalian cells". **Neurochem. Res.** 29: 27-63.
- Lang F., Stehle T. y D. Haussinger. 1989. "Water, K<sup>+</sup>, H<sup>+</sup>, lactate and glucose fluxes during cell volume regulation in perfused rat liver". **Pflugers Arch.** 413: 209-216.
- Lang F., Busch GL., Ritter M., Volkl H., Waldegger S., Gulbins E. y D. Haussinger. 1998. "Functional significance of cell volume regulatory mechanisms". **Physiol. Rev.** 78: 247-306.
- Leopoldt D., Hanck T., Exner U., Maier RW. y B. Nürnberg. 1998. "Gβγ stimulates phosphoinositide 3-kinase by direct interaction with two domains of the catalytic p110 subunit". **J. Biol. Chem.** 273: 7024-7029.
- Li G., Liu Y. y JE. Olson. 2002. "Calcium/calmodulin-modulated chloride and taurine conductances in cultured rat astrocytes". **Brain Res.** 925: 1-8.
- Liang D., Batha S., Gerzanich V. y JM. Simard. 2007. "Cytotoxic edema: mechanisms of pathological cell swelling". **Neurosurg. Focus** 22: 1-9.
- Liu H., Tashmukhamedov BA., Inoue H., Okada Y. y RZ. Sabirov. 2006. "Roles of two types of anion channels in glutamate release from mouse astrocytes under ischemic or osmotic stress". **Glia** 54: 343-357.
- Longuemare MC. y RA. Swanson. 1995. "Excitatory amino acid release from astrocytes during energy failure by reversal of sodium-dependent uptake". **J. Neurosci. Res.** 40: 379-386.
- Longuemare MC. y RA. Swanson. 1997. "Net glutamate release from astrocytes is not induced by extracellular potassium concentrations attainable in brain". **J. Neurochem.** 69: 879-882.
- Longuemare MC., Rose CR., Farrell K., Ransom BR., Waxman SG. y RA. Swanson. 1999. "K<sup>+</sup>-induced reversal of astrocyte glutamate uptake is limited by compensatory changes in intracellular Na<sup>+</sup>". **Neuroscience** 93: 285-292.
- Loveday D., Heacock AM. y SK. Fisher. 2003. "Activation of muscarinic cholinergic receptors enhances the volume-sensitive efflux of myo-inositol from SH-SY5Y neuroblastoma cells". **J. Neurochem.** 87: 476-486.
- Mackie EJ., Pagel CN., Smith R., De Niese MR., Song SJ. y RN. Pike. 2002. "Protease activated receptors: a means of converting extracellular proteolysis into intracellular signals". **IUBMB Life** 53 :277-281.
- Maragakis NJ. y JD. Rothstein. 2004. "Glutamate transporters: animal models to neurologic disease." **Neurobiol. Dis.** 15: 461-73.
- Molchanova SV., Oja SS. y P. Saransaari. 2006. "Taurine attenuates D-[<sup>3</sup>H]aspartate release evoked by depolarization in ischemic corticostriatal slices". **Brain Res.** 1009: 64-72.

- Mongin AA., Reddi JM., Charniga C. y HK. Kimelberg. 1999. “[<sup>3</sup>H]taurine and D-[<sup>3</sup>H]aspartate release from astrocyte cultures are differently regulated by tyrosine kinases”. **Am. J. Physiol.** 276: C1226-C1230.
- Mongin AA. y HK. Kimelberg. 2002. “ATP potently modulates anion channel-mediated excitatory amino acid release from cultured astrocytes”. **Am. J. Physiol.** 283: C569-C578.
- Mongin AA. y HK. Kimelberg. 2005. “ATP regulates anion channel-mediates organic osmolyte release from cultured rat astrocytes via multiple Ca<sup>2+</sup>-sensitive mechanisms”. **Am. J. Physiol.** 288: C204-C213.
- Morales-Mulia S., Vaca L., Hernández-Cruz A. y H. Pasantes-Morales. 1998. “Osmotic swelling-induced changes in cytosolic calcium do not affect regulatory volume decrease in rat cultured suspended cerebellar astrocytes”. **J. Neurochem.** 71: 2330-2338.
- Morales-Mulia S., Cardin V., Crevenna A., Torres-Márquez ME. y H. Pasantes-Morales. 2001. “Influence of protein kinases on the osmosensitive release of taurine from cerebellar granule neurons”. **Neurochem. Int.** 38: 153-161.
- Nelson RM., Lambert DG., Green AR. y AH. Hainsworth. 2003. “Pharmacology of ischemia-induced glutamate efflux from rat cerebral cortex in vivo”. **Brain Res.** 964: 1-8.
- Nicholls D. y D. Attwell. 1990. “The release and uptake of excitatory aminoacids”. **Trends Pharmacol. Sci.** 11:462-468.
- Norenberg MD. 1998. “Astrocytes in ischemic injury”. In: Ginsberg Md., Bogousslavsky J. (eds.). “*Cerebrovascular disease: pathophysiology, diagnosis and management*”. Vol. 1. Ed. Blackwell Science. pp. 113-128.
- Onley JW., Sharpe LG. y RD. Feigin. 1972. "Glutamate-induced brain damage in infant primates". **J. Neuropathol. Exp. Neurol.** 31: 464-488.
- Ordaz B., Tuz K., Ochoa LD., Lezama R., Peña-Segura C. y R. Franco. 2004. “Osmolytes and mechanisms involved in regulatory volume decrease under conditions of sudden or gradual osmolarity decrease”. **Neurochem. Res.** 29: 65-72.
- Panickar K. y M. Norenberg. 2005. “Astrocytes in cerebral ischemic injury: morphological and general considerations”. **Glia** 50: 287-298.
- Pasantes-Morales H. 1989. “Taurine in the nervous system: overview and perspectives”. **J. Biochem.** 38.
- Pasantes-Morales H., Morán J. y R. Sánchez-Olea. 1992. “Volume regulatory fluxes in glial and renal cells”. **Adv. Exp. Med. Biol.** 315: 361-368.
- Pasantes-Morales H. 1996. “Volume regulation in brain cells: cellular and molecular mechanisms”. **Metab. Brain Dis.** 11: 187-204.
- Pasantes-Morales H., Franco R., Torres-Márquez ME., Hernández-Fonseca K. y A. Ortega. 2000. “Amino acid osmolytes in regulatory volume decrease and isovolumetric regulation in brain cells: contribution and mechanisms”. **Cell Physiol Biochem** 10: 361-370.
- Pasantes-Morales H. y S. Morales-Mulia. 2000. “Influence of calcium on regulatory volume decrease: role of potassium channels”. **Nephron** 86: 414-427.

- Pasantes-Morales H. y R. Franco. 2004. "Astrocyte cellular swelling: mechanisms and relevante to brain edema". In: Aschner M. y L. Costa (eds.) *The role of Glia in Neurotoxicity*. Segunda edición. CRC Press. pp. 173-190.
- Pasantes-Morales H. 2006. "Aminoacids and brain volume regulation: contribution and mechanisms". In: Oja S., Schousboe A. y P. Saransaari (eds). *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*. Tercera edición. Ed. Springer. pp. 225-248.
- Pasantes-Morales H., Lezama RA. y G. Ramos-Mandujano. 2006b. "Tyrosine kinases and osmolyte fluxes during hyposmotic swelling". **Acta Physiol.** 187: 93-102.
- Pasantes-Morales H., Lezama RA., Ramos-Mandujano G. y KL. Tuz. 2006c. "Mechanisms of cell volume regulation in Hypo-osmolality". **Am. J. Med.** 119: S4-S11.
- Phillis JW., Song D. y MH. O'Reagan. 1997. "Inhibition by anion channel blockers of ischemia-evoked release of excitotoxic and other amino acids from rat cerebral cortex". **Brain Res.** 758: 9-16.
- Rothstein JD., Martin L., Levey AI., Dykes-Hoberg M., Jin L., Wu D., Nash D. y RW. Kunci. 1994. "Localization of neuronal and glial glutamate transporters". **Neuron.** 13: 713-725.
- Rossi DJ., Oshima T. y D. Attwell. 2000. "Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake". **Nature** 404: 316-321.
- Rutledge EM. y HK. Kimelberg. 1996. "Release of [<sup>3</sup>H]-D-Aspartate from primary astrocyte cultures in response to raised external potassium". **J. Neurosci.** 16: 7803-7811.
- Rutledge EM., Aschner M. y HK. Kimelberg. 1998. "Pharmacological characterization of swelling-induced D-[<sup>3</sup>H]aspartate release from primary astrocyte cultures". **Am. Physiol. Soc.** 274: C1511-C1520.
- Rutledge EM., Mongin AA. y HK. Kimelberg. 1999. "Intracellular ATP depletion inhibits swelling-induced D-[<sup>3</sup>H]aspartate release from primary astrocyte cultures". **Brain Res.** 842: 39-45.
- Sánchez-Olea R., M. Morales O., García H. y H. Pasantes-Morales. 1996. "Cl<sup>-</sup> channel blockers inhibit the volume-activated efflux of Cl<sup>-</sup> and taurine in cultured neurons". **Am. J. Physiol.** 270: C1703-C1708.
- Schmidlin F. y NW. Bunnett. 2001. "Protease-activated receptors: how proteases signal to cells". **Curr. Opin. Pharm.** 1: 575-582.
- Schousboe A. y H. Pasantes-Morales. 1992. "Role of taurine in neural cell volume regulation". **J. Physiol. Pharmacol.** 70: S356-S361.
- Schuller-Levis GB. y E. Park. 2003. "Taurine: new implications for an old amino acid" **FEMS Microbiol. Letters** 206: 195-202.
- Scott RM., Seatter MJ., Kanke T., Hunter GD. y R. Plevin. 2001. "Proteinase-activated receptors". **Pharmacol. Rev.** 53: 245-282.
- Sheehan JJ. y SE. Tsirka. 2005. "Fibrin-modifying serine proteases thrombin, tPA, and plasmin in ischemic stroke: a review". **Glia** 50: 340-350.
- Silver IA. y M. Erecińska. 1997. "Energetic demands of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase in mammalian astrocytes". **Glia** 21 :35-45.

- Somjen GG. 1979. "Extracellular potassium in the mammalian central nervous system". **Annu. Rev. Physiol.** 41: 159-177.
- Sperlágh B., Zsilla G., Baranyi M., Illes P. y ES. Vizi. 2007. "Purinergic modulation of glutamate release under ischemic-like conditions in the hippocampus". **Neuroscience** (en proceso): 1-13.
- Strange K., Emma F. y PS. Jackson. 1996. "Cellular and molecular physiology of volume-sensitive anion channels". **Am. J. Physiol.** 270: C711-C730.
- Striggow F., Riek M., Breder J., Henrich-Noack P., Reymann KG. y G. Rieser. 2000. "The protease thrombin is an endogenous mediator of hippocampal neuroprotection against ischemia at low concentrations but causes degeneration at high concentrations". **Proc. Natl. Acad. Sci.** 97: 2264-2269.
- Sturman JA. 1987. "Sulfur amino acids in brain development". **Curr. Top. Nutr. Dis.** 16: 245-254.
- Suo Z., Citron BA. y BW. Festoff. 2004. "Thrombin: a potential proinflammatory mediator in neurotrauma and neurodegenerative disorders". **Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy** 3:105-114.
- Suresh LM., Namratta M. y R. Ram. 2006. "Molecular Targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics". **Brain Res. Rev.** 54: 34-65.
- Szatkowski M., Barbour B. y D. Attwell. 1990. "Nonvesicular release of glutamate from glial cells by reversed electrogenic glutamate uptake". **Nature** 348: 443-446.
- Takahashi A., Camacho P., Lechleiter JD. y B. Herman. 1999. "Measurement of intracellular calcium". **Physiol. Rev.** 79: 1089-1122.
- Trotti BL., Rizzini BL. y D. Rossi. 1997. "Neuronal and glial glutamate transporters possess an SH-based redox regulatory mechanism". **Eur. J. Neurosci.** 9: 1236-1243.
- Upadhyay A., Bertrand LJ. y NE. Madias. 2006. "Incidence and prevalence of hyponatremia". **Am. J. Med.** 119: S30-S35.
- Vázquez-Juárez E., Ramos-Mandujano G., Lezama RA., Cruz-Rangel S., Islas LD. y H. Pasantes-Morales. 2007. "Thrombin increases hyposmotic taurine efflux and accelerates  $I_{Cl^{-}}$ -swell and RVD in 3T3 fibroblast by a src-dependent EGFR transactivation". **Eur. J. Physiol.** Sep27:1-14
- Verkhatsky A. y EC. Toescu. 2006. "Neuronal-glia networks as substrate for CNS integration". **J. Cell Mol. Med.** 10 :826-36.
- Vu TK., Hung DT., Wheaton VI. y SR. Coughlin. 1991. "Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation". **Cell** 64: 1057-1068.
- Wang H., Uhl JJ. y G. Reiser. 2002. "Four subtypes of protease-activated receptors, co-expressed in rat astrocytes, evoke different physiological signalling". **Glia** 37: 53-63.
- Wang H. y G. Reiser. 2003. "Thrombin signaling in the brain: the role of protease-activated receptors". **Biol. Chem.** 384: 193-202.

- Wehner F., Olsen H., Tinel H., Kinne-Saffran E. y RKH. Kinne. 2003. "Cell volume regulation: osmolytes, osmolyte transport, and signal transduction". **Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.** 148: 1-80.
- Weinstein JR., Gold SJ., Cunningham DD. y CM. Gall. 1995. "Cellular localization of thrombin receptor mRNA in rat brain: expression by mesencephalic dopaminergic neurons and codistribution with prothrombin mRNA". **J. Neurosci.** 15: 2906-2919.
- Wilkin GP., Marriott DR. y AJ. Cholewinski. 1990. "Astrocyte heterogeneity". **Trends Neurosci.** 13: 43-46.
- Won SJ., Kim DY. y BJ. Gwag. 2002. "Cellular and molecular pathways of ischemic neuronal death". **J. Biochem. Mol. Biol.** 35: 67-86.
- Xi G., Reiser G. y RF. Keep. 2003. "The role of thrombin and thrombin receptors in ischemic, hemorrhagic and traumatic brain injury: deleterious or protective?". **J. Neurochem.** 84: 3-9.
- Xu H., Zhao H., Tian W., Yoshida K., Roullet J-B. y DM. Cohen. 2003. "Regulation of a transient receptor potential (TRP) channel by tyrosine phosphorylation: Src family kinase-dependent tyrosine phosphorylation of TRPV4 on TYR-253 mediates its response to hypotonic stress". **J. Biol. Chem.** 278: 11520-11527.
- Yancey PH. 2005. "Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and others stresses". **J. Exp. Biol.** 208: 2819-2830.
- Yu AC. y L. Hertz. 1983. "Metabolic sources of energy in astrocytes". *In: Hertz L., Kvamme E., McGeer EG. y A. Schousboe (eds.). Glutamine, glutamate and GABAA in the central nervous system.* Ed. Alan R.Liss. pp. 431-438.
- Zar JH. 1984. *Biostatistical Analysis*, Segunda edición, Ed. Prentice Hall. 717 p.