



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**CARACTERIZACIÓN DEL DECREMENTO REGULADOR DE
VOLUMEN EN CÉLULAS PRECURSORAS NEURALES**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

ADRIANA ESTELA SEDEÑO CORTÉS



**DIRECTORA DE TESIS:
BIOL. REYNA HERNÁNDEZ BENÍTEZ
México D.F., 2012**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Datos de la alumna

Sedeño
Cortés
Adriana Estela
5622 5608
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
303065070

2. Datos del Tutor

Bióloga
Reyna
Hernández
Benítez

3. Datos del Sinodal 1

Doctora
Herminia
Pasantes
Ordóñez

4. Datos del Sinodal 2

Doctor
René de Jesús
Cárdenas
Vázquez

5. Datos del Sinodal 3

Doctora
Carolina
Barriga
Montoya

6. Datos del Sinodal 4

Doctor
Gerardo
Ramos
Mandujano

7. Datos del trabajo escrito

Caracterización del decremento regulador de volumen en células precursoras neurales
69 p
2012

"El mundo está en manos de aquellos que
tienen el coraje de soñar y
de correr el riesgo de vivir sus sueños".

Paulo Coelho.

"The important thing is not to stop questioning.
Curiosity has its own reason for existing".

Albert Einstein.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Fisiología Celular en su División de Neurociencias de la Universidad Nacional Autónoma de México, en donde se elaboró la presente tesis que para obtener el título de Bióloga de la alumna Sedeño Cortés Adriana Estela, bajo el título “Caracterización del decremento regulador de volumen en células precursoras neurales”.

A la Dra. Pasantes-Morales H., titular del Laboratorio BL-301 del departamento de Neurodesarrollo y Fisiología.

A la Biol. Hernández-Benítez R., a cargo de la dirección de la tesis.

A los doctores, Ramos-Mandujano G., Barriga-Montoya C. y Cárdenas-Vázquez R. por su participación como sinodales.

A los MVZ. Pinzón-Estrada E. y Torres-Saldaña I., de la Facultad de Medicina, UNAM por su contribución para la realización del presente proyecto.

A la Biol. Cruz-Rangel S. por su asesoría en los experimentos relacionados con la concentración de Cl^- intracelular.

Para realizar la investigación se contó con el apoyo de PAPIIT IN203410-DGAPA (UNAM) y CONACyT 98952, que financiaron el proyecto.

La realización de este trabajo y fue apoyada por una beca del proyecto PAPIIT IN203410-DGAPA (UNAM) a través de la Dra. Herminia Pasantes Ordóñez, durante el período 2011.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, que me ha provisto de la oportunidad de interactuar en un ambiente científico apasionante.

A mis sinodales, por su disposición a ser parte de mi comité, su tiempo y sugerencias para enriquecer este trabajo.

A mis padres, que sin su amor, apoyo, cuidados, enseñanzas y esfuerzo diario, no sería posible avanzar.

A mi familia, a los que están y los que partieron, por todo el amor que me han dado. Siempre los tengo presentes.

A mi tutora, Reyna Hernández Benítez y al Dr. Gerardo Ramos Mandujano, quienes fueron mi guía y me brindaron tiempo, dedicación, paciencia y un importante apoyo técnico durante el desarrollo de la investigación, así como valiosas sugerencias que enriquecieron el proyecto y mi formación académica.

A mis maestros, quienes han sido una gran inspiración para aprender cada día algo nuevo y no perder la capacidad de asombro.

A mis compañeras de laboratorio, Erika, Martha, Silvia por todas sus enseñanzas, ideas, sugerencias, apoyo y atenciones.

A Víctor, mi compañía, mi motivación. Gracias por todo el apoyo, cariño, comprensión, cuidados y felicidad que me has dado, por tu paciencia, por llenarme de energías para seguir, por todo ese esfuerzo que haces, por esas metas que tú y yo habremos de alcanzar.

A Abraham, una de las personas más nobles que he conocido, por todo el apoyo y cariño que me has dado en todo este tiempo. Sin ti no hubiera sido posible. Gracias por impulsarme a seguir adelante.

A Celeste, una excelente persona, amiga y compañera de trabajo, por su gran ayuda en el terreno académico, y tal vez más importante, fuera de él.

A Paulina, gracias por tantos años de amistad incondicional. Te quiero!

A mis amigos y compañeros que me han acompañado a lo largo de tantos años, por todos y cada uno de esos momentos que se quedan en la memoria, pues compartir con ustedes risas, llantos, experiencias y vivencias a lo largo del camino... no tiene precio.

A los ratoncitos que fueron sacrificados para la realización de la tesis.

Adriana, 2011.

CONTENIDO

	Página
AGRADECIMIENTOS.....	5
ÍNDICE DE FIGURAS	8
RESUMEN.....	9
ABREVIATURAS.....	10
SÍMBOLOS.....	11
1. INTRODUCCIÓN	
1.1. El volumen celular	
1.1.1. Ósmosis y presión osmótica.....	12
1.1.2. Osmolitos.....	13
1.2. Taurina: Generalidades.....	14
1.2.1. La taurina como osmolito.....	15
1.2.2. La taurina en el desarrollo del cerebro.....	15
1.2.3. Movilización de taurina en las células.	
1.2.3.1. Sistema de transporte TauT.....	16
1.2.3.2. Sistema de transporte por una vía difusional.....	16
1.3. Regulación del volumen celular	
1.3.1. Regulación en ambientes isosmóticos.....	17
1.3.2. Regulación en ambientes anisosmóticos.....	18
1.3.3. Decremento regulador de volumen (DRV).....	19
1.3.4. Regulación del volumen en el cerebro.....	20
1.4. Células troncales	
1.4.1. Generalidades.....	22
1.4.2. Células precursoras neurales (CPN)	23
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	25
3. JUSTIFICACIÓN.....	26
4. OBJETIVOS.....	27
5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	
5.1. MATERIALES	
5.1.1. Compuestos.....	28
5.1.2. Soluciones.....	29
5.2. MÉTODOS	
5.2.1. Cultivo de células precursoras neurales.....	31
5.2.2. Medición de volumen celular.....	34
5.2.3. Medición del contenido de aminoácidos.....	35
5.2.4. Liberación de ³ H-taurina por hiposmolaridad.....	35
5.2.5. Liberación de Cl ⁻ intracelular por hiposmolaridad.....	36
5.2.6. Análisis estadístico.....	36
6. RESULTADOS	
6.1. Cambios en el volumen de CPN embrionarias y adultas en respuesta a un estímulo hiposmótico.....	38
6.2. Cuantificación de la concentración de aminoácidos en el tejido de origen de las CPN.....	42
6.3. Movilización de osmolitos	
6.3.1. Liberación de taurina.....	43
6.3.2. Reducción en la concentración de Cl ⁻ intracelular ante la disminución de la osmolaridad externa.....	47
6.4. Efecto de los inhibidores generales de canales de Cl ⁻ sobre el DRV y la liberación osmosensible de taurina.	49
7. DISCUSIÓN.....	53
8. CONCLUSIONES	60
9. PERSPECTIVAS.....	61
10. BIBLIOGRAFÍA.....	62

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	Página
Figura 1.1. Mecanismos involucrados en la movilización de taurina en respuesta a cambios en el volumen celular.....	20
Figura 1.2. Localización de las CPN en la zona subventricular del cerebro adulto.....	23
Figura 1.3. Estructura y potencialidad de las neuroesferas.....	24
Figura 5.1. Esquema representativo de la extracción de ratones CD1 en etapa embrionaria.....	32
Figura 5.2. Disección del mesencéfalo.....	32
Figura 5.3. Disección de la zona subventricular.....	33
Figura 6.1. Morfología de las CPN.....	37
Figura 6.2. Hinchamiento y regulación del volumen de CPN embrionarias expuestas a hiposmolaridad.....	39
Figura 6.3. Hinchamiento y regulación del volumen de CPN adultas expuestas a hiposmolaridad.....	41
Tabla 6.4. Concentración de aminoácidos en el mesencéfalo de ratón en etapa embrionaria y en la zona subventricular de ratón en etapa adulta.....	42
Figura 6.5. Liberación de ³ H-taurina de CPN embrionarias expuestas a hiposmolaridad.	44
Figura 6.6. Liberación de ³ H-taurina de CPN adultas expuestas a hiposmolaridad.....	46
Figura 6.7. Liberación de Cl ⁻ intracelular en CPN adultas expuestas a hiposmolaridad	48
Figura 6.8. Hinchamiento y regulación de CPN adultas expuestas a bloqueadores de canales aniónicos.....	50
Figura 6.9. Liberación de ³ H-taurina de CPN adultas expuestas a bloqueadores de canales aniónicos.....	52

RESUMEN

La regulación del volumen celular es fundamental para la homeostasis de las células y se encuentra estrechamente relacionado a diversos procesos fisiológicos. Cuando hay alteraciones en el ambiente externo, en las células se activan mecanismos de regulación del volumen, que consisten básicamente en la movilización de solutos y de los consecuentes flujos de agua en la dirección necesaria para recuperar el equilibrio osmótico. Los solutos involucrados son: los iones Na^+ , K^+ y Cl^- y un grupo de moléculas orgánicas de estructura molecular diversa, incluyendo aminoácidos, polialcoholes y aminas, a los que en conjunto se le denominan osmolitos.

Las células precursoras neurales (CPN), son células troncales y células progenitoras multipotentes aisladas de tejido neural que durante largos periodos de tiempo mantienen su capacidad de auto-renovación y proliferación. Estas células son abundantes durante el desarrollo del sistema nervioso y algunas de ellas persisten en el cerebro adulto, en donde parecen participar en procesos fisiológicos de renovación de tejidos neurales.

En este estudio se investigó la respuesta celular en CPN ante disminuciones de la osmolaridad externa: el hinchamiento celular y el subsecuente proceso denominado decremento regulador de volumen (DRV). Se emplearon CPN cultivadas como neuroesferas del mesencéfalo de ratón embrionario (13.5 días) y de la zona subventricular de ratones adultos. Los resultados mostraron que las CPN tienen la capacidad de regular activamente su volumen, aproximadamente con la misma eficiencia, aunque con una diferencia en la magnitud del hinchamiento de 2.5 veces mayor en las CPN embrionarias.

Se investigó la movilización de dos tipos de osmolitos representativos: el Cl^- como osmolito inorgánico y la taurina como osmolito orgánico. Se midieron las concentraciones de aminoácidos con posibilidades de funcionar como osmolitos en los tejidos de los que se extrajeron las CPN y se encontró que los niveles de aminoácidos encontrados en la zona subventricular eran considerablemente menores a los encontrados en el mesencéfalo, con excepción de GABA.

En las CPN tanto embrionarias como adultas, la disminución de osmolaridad externa indujo la movilización de ^3H -taurina en forma dependiente de la reducción. La movilización muestra las características típicas de la vía difusional a través de la cual permea este osmolito en las células cerebrales. El Cl^- intracelular también se movilizó en respuesta al decremento en osmolaridad externa.

Los bloqueadores generales de canales aniónicos, que también actúan sobre la vía de permeación de los osmolitos orgánicos inhibieron la regulación del volumen y la movilización de taurina. Se encontró que en ambos procesos, el DCPIB fue el inhibidor más potente reduciendo tanto la regulación de volumen como la liberación de taurina, seguido por el NPPB; mientras que el DIDS y SITS tuvieron un efecto menor.

Los resultados de este trabajo son de interés en razón de la evidencia que señala un papel del volumen celular en la proliferación.

ABREVIATURAS

³H-tau	Taurina tritiada
AQP	Acuaporina
ANOVA	Análisis de varianza
CaCl₂	Cloruro de calcio
Clca1	Proteína reguladora de conductancia de cloro sensible a calcio
Clcn2	Canal de cloro 2
CPN	Células precursoras neurales
DCPIB	Ácido 4-(2-butyl-6,7-dicloro-2-ciclopentilindan-1-on-5-il) oxibutírico
D-Glucosa	Dextrosa anhidra
DIDS	Ácido 4,4'-diisotiocianostilben-2,2'-disulfónico
DiH-MEQ	Ioduro de 6-metoxi-N-etilquinolinio
DMEM/F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DRV	Decremento regulador de volumen
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
FeSO₄	Sulfato ferroso
FGFb	Factor de crecimiento fibroblástico
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
H15	Medio hiposmótico al 15%
H30	Medio hiposmótico al 30%
H40	Medio hiposmótico al 40%
H50	Medio hiposmótico al 50%
I¹²⁵	Radioisótopo de yodo
ICln	Proteína reguladora de conductancia de cloro
IRV	Incremento regulador de volumen
KCl	Cloruro de potasio
KH₂PO₄	Fosfato de potasio monobásico
MgSO₄	Sulfato de magnesio
NaBH₄	Borohidruro de sodio
Na₂O₃Se	Selenita de sodio
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NPPB	Ácido 5-nitro-2-(3-fenilpropilamino)benzóico
OPA	o-ftaldehído
PBS	Solución salina de fosfatos
Pen/step	Penicilina/estreptomina
PPO	2,5-difenil oxazol
Progesterona	Pregn-4-ene-3,20-diona
Putrescina	Butano-1,4-diamina
RP-HPLC	Cromatografía en fase reversa de alta eficiencia
SITS	Di sodio 4 acetamido-4'-isothiocianato-stilben-2,2'-disulfonato
SNC	Sistema nervioso central
Tau	Taurina
TauT	Transportador de taurina
Tritón X-100	t-oxtilfenoxipolietoxietanol
VRAC	Canal aniónico regulado por volumen (Volume regulated anion channel)
VSOAC	Canal sensible a volumen de aniones y osmolitos orgánicos (Volume sensitive organic osmolyte-anion channel)
ZSV	Zona subventricular

SÍMBOLOS

Compuesto	Abreviatura	Símbolo
Medio isosmótico	Isosmótico	
Medio hiposmótico al 15%	H15	
Medio hiposmótico al 30%	H30	
Medio hiposmótico al 30% + Ácido 4,4'-diisotiocianostilben-2,2'-disulfónico	H30+DIDS	
Medio hiposmótico al 30% + Disodio 4 acetamido-4'-isothiocianato-stilben-2,2'-disulfonato	H30+SITS	
Medio hiposmótico al 30% + Ácido 5-nitro-2-(3-fenilpropilamino)benzoico	H30+NPPB	
Medio hiposmótico al 30% + Ácido 4-(2-butil-6,7-dicloro-2-ciclopentilindan-1-on-5-il)oxibutírico	H30+DCPIB	
Medio hiposmótico al 40%	H40	
Medio hiposmótico al 50%	H50	

CARACTERIZACIÓN DEL DECREMENTO REGULADOR DE VOLUMEN EN CÉLULAS PRECURSORAS NEURALES

1. INTRODUCCIÓN

La regulación del volumen es un proceso conservado evolutivamente en todas las especies para mantener el estado homeostático celular, aunque los osmolitos y los mecanismos involucrados en la regulación varían considerablemente entre los distintos organismos. Una gran variedad de células han sido empleadas para la identificación y caracterización a nivel celular y molecular de los osmolitos, sus sistemas de transporte y las señales intracelulares que regulan su movimiento a través de la membrana plasmática. Actualmente, el estudio fisiológico del volumen durante todo el ciclo de vida de una célula ha cobrado gran importancia, pues se ha evidenciado que el volumen es un factor muy importante, no sólo para definir el tamaño de la célula, sino también para regular diversas funciones celulares como: el pH, la excitabilidad, la proliferación, la migración, el crecimiento y la muerte celular, procesos que suelen acompañarse por diferencias osmóticas en el ambiente interno o externo (Lang *et al.*, 1998).

1.1. El volumen celular

1.1.1. Ósmosis y presión osmótica

El movimiento de agua entre las soluciones acuosas que son separadas por una membrana semipermeable, se lleva a cabo por diferencias en la concentración de partículas de soluto. Este proceso, conocido como **ósmosis**, es de importancia fundamental para todos los organismos biológicos. El flujo osmótico del agua ocurre por difusión pasiva a través de la bicapa lipídica o por medio de acuaporinas, desde la solución con menor concentración de osmolitos hacia la solución con mayor concentración. La **presión osmótica**, es la cantidad de presión necesaria para evitar el flujo neto del agua a través de una membrana semipermeable, la cual es proporcional a la concentración de partículas efectivas de una solución, independientemente de su tamaño o naturaleza química (Strange, 2004). El **osmol** es la medida de la concentración utilizada para medir el número total de partículas de soluto en una solución con una presión

osmótica de 22.4 atm a 0°C. La concentración osmolar de una solución recibe el nombre de **osmolalidad** cuando la concentración se expresa en osmoles por kilogramo de agua y de **osmolaridad** cuando se expresa en osmoles por litro de solución. Se distingue de la molaridad porque algunos compuestos pueden disociarse en solución, mientras que otros no. Por ejemplo, una solución 1M de un soluto no disociable es 1 Osmolar. En cambio, una solución 1M de una sal disociable es n Osmolar, donde n será el número de iones producidos por molécula. Aunque dos soluciones tengan la misma osmolaridad, su **tonicidad (coeficiente de reflexión o presión osmótica efectiva)** es distinta para una u otra célula; una solución hipotónica para una célula puede ser isotónica o hipertónica para otra, dependiendo de la permeabilidad relativa de su membrana y de la concentración celular de solutos osmóticamente activos, sean o no permeables. Además, existe un porcentaje del volumen celular total que es **osmóticamente inactivo** (Álvarez y Reuss, 1996).

1.1.2. *Osmolitos*

Un **osmolito** se define como toda molécula capaz de crear osmolaridad. Los **osmolitos inorgánicos** contribuyen con la osmolaridad celular total en aproximadamente el 70%, siendo los más importantes el K^+ en el espacio citosólico y el Na^+ y Cl^- en el espacio extracelular. Se conocen también como “osmolitos no compatibles” pues, cuando ocurren grandes cambios en sus concentraciones, interfieren con diversos procesos celulares como: la alteración del potencial de membrana en reposo, la modificación de las tasas de reacciones catalíticas, el transporte de solutos acoplado a gradientes iónicos o la desnaturalización y precipitación de macromoléculas (Lang *et al.*, 1998).

El término “osmolito compatible” designa a los **osmolitos orgánicos**, que conforman del 23 al 29% restante del contenido total de osmolitos. De manera general, pueden ser agrupados en 3 clases: polioles (glicerol, sorbitol, mio-inositol), aminoácidos y derivados (taurina, alanina, prolina, glicina, glutamato) y metilaminas (betaína, glicerofosforilcolina) (Lang *et al.*, 1998; Pasantes-Morales *et al.*, 2002a). La generación de estos osmolitos es un proceso relativamente lento; son acumulados en altas concentraciones (10 a 100 mM) en el citosol, mediante el incremento de su síntesis, disminución de su degradación o eliminación y/o por transporte a

través de la membrana. Su distribución varía dependiendo del tejido y de los estados del desarrollo, crecimiento y diferenciación (Miller *et al.*, 2000). Además, a diferencia de los osmolitos inorgánicos, no afectan la estructura de las macromoléculas, aunque algunos de ellos como el glutamato, la glicina y el GABA, sí participan en reacciones metabólicas y, en particular en el sistema nervioso, tienen una función muy importante como neurotransmisores (Lang *et al.*, 1998; Pasantes-Morales *et al.*, 2002a; Schousboe *et al.*, 1992).

1.2. Taurina: Generalidades

La taurina (ácido 2-amino-etano-sulfónico) es un aminoácido, producto final del metabolismo de los aminoácidos azufrados metionina y cisteína, formando el ácido cisteín sulfínico y la hipotaurina como moléculas intermedias. La taurina posee una estructura similar a otras sustancias endógenas, como son la glicina y GABA (Jacobsen y Smith, 1968). La mayor parte de esta molécula permanece libre como zwitterion polar en el citoplasma y no se incorpora a proteínas ni participa en reacciones metabólicas a nivel celular, salvo su papel en la formación de ácidos biliares (Huxtable, 1992). En algunos casos, puede formar parte del extremo carboxilo terminal de algunos péptidos sinápticos de bajo peso molecular como la γ -L-glutamil-taurina e incorporarse a lípidos de membrana en forma de taurolípidos (Kaya y Sano, 1991; Marnela *et al.*, 1985).

La mayor parte de los mamíferos son capaces de sintetizar taurina en el hígado. En el cerebro adulto de algunas especies, también ocurre su síntesis en células gliales (Brand *et al.*, 1998; Dominy *et al.*, 2004). En el humano fundamentalmente se obtiene de la dieta; y durante el desarrollo, requieren del suministro vía la placenta y a través de la leche materna en recién nacidos para su obtención (Gaul, 1989; Huxtable, 1992).

La taurina se encuentra presente en altas concentraciones en tejidos que consumen gran cantidad de energía, como el sistema nervioso, la retina, el corazón, los riñones y el músculo oxidativo en general (Jacobsen y Smith, 1968; Huxtable, 1992). Como funciones para la taurina se han propuesto: la conjugación de ácido biliar, la desintoxicación, la osmoregulación y la modulación de calcio intracelular (El Edrissi y Trenkner, 1999; Jacobsen y Smith, 1968; Schaffer

et al., 2000; Xu *et al.*, 2006). Además, se ha demostrado su capacidad citoprotectora en una variedad amplia de tipos celulares, incluyendo cardiomiocitos, fotorreceptores, linfocitos y hepatocitos, entre otras, a través de mecanismos todavía no muy claros pero que pueden involucrar acciones como antioxidante o estabilizadora de membranas (Oliveira *et al.*, 2010; Timbrell *et al.*, 1995; Yancey, 2005).

1.2.1. *La taurina como osmolito*

La taurina posee varias propiedades que la hacen particularmente adecuada para una función de osmolito, como son: una alta solubilidad en agua, poca permeabilidad a través de las membranas celulares y la presencia de poros difusionales para movilizarse a través de la membrana celular. A través de ellos pueden movilizarse grandes cantidades de taurina en forma de zwitterion electroneutro sin alterar el potencial de membrana o modificar la función celular (Guizouarn *et al.*, 2000; Huxtable, 1992). Además, es el osmolito más sensible a la perturbación osmótica, con el umbral más bajo de liberación y el que se libera en mayor cantidad respecto a otros en las células de mamífero (Pasantés-Morales *et al.*, 2000b; Law, 1991). Estas características la han postulado como una molécula representativa en los mecanismos de liberación de osmolitos orgánicos para ajustar la presión osmótica y el volumen intracelular tras una perturbación osmótica, especialmente en el decremento regulador de volumen (DRV) (Huxtable, 2000).

1.2.2. *La taurina en el desarrollo del cerebro*

La taurina juega un papel muy importante en el desarrollo del cerebro. Su concentración durante la etapa embrionaria es alta y disminuye gradualmente en etapas posteriores (Miller *et al.*, 2000; Sturman *et al.*, 1980). La deficiencia de taurina genera un retraso en la maduración y la migración de neuronas en las regiones en las que se ha estudiado, que son el cerebelo y la corteza visual (Maar *et al.*, 1995; Palackal *et al.*, 1986). Esta deficiencia produce ataxia y déficit visual (Hayes *et al.*, 1975; Sturman *et al.*, 1985). Estos estudios se han realizado en gatos y en primates alimentados con fórmulas que, a diferencia de la leche materna, no contenían taurina. Recientemente se ha implicado en la proliferación de células precursoras neurales (Chen *et al.*,

1998; Hernández-Benítez *et al.*, 2010b). Sin embargo, aún falta esclarecer su mecanismo de acción en el desarrollo cerebral y sus posibles roles en la biología de células precursoras neurales.

1.2.3. *Movilización de taurina en las células*

1.2.3.1. *Sistema de transporte TauT*

El empleo de técnicas de biología molecular como la clonación, Western Blots y la generación de ratones transgénicos *knock-out*, han permitido demostrar la presencia de un transportador de taurina (TauT) en diversos tipos celulares (Han *et al.*, 2006; Lambert, 2004). Parte del contenido celular de taurina se regula mediante la captura activa de taurina por el TauT, que es un transportador, como el de la mayor parte de los aminoácidos, dependiente de la energía derivada de los gradientes transmembranales de Na^+ y Cl^- . Comparte una secuencia homóloga con los transportadores de creatina, GABA, norepinefrina, dopamina y serotonina; es regulado tanto a nivel transcripcional como a nivel de expresión tras un estrés osmótico (Han *et al.*, 2006; Hernández-Benítez *et al.*, 2010a; Pow *et al.*, 2002). El sistema de transporte dependiente de energía es un sistema de baja capacidad y tiene a su cargo la acumulación de la taurina circulante al interior de las células en condiciones isotónicas. En el ratón con el transportador genéticamente inactivo, los niveles celulares de taurina se reducen considerablemente, provocando ceguera y distintas cardiopatías (Warskulat *et al.*, 2007).

1.2.3.2. *Sistema de transporte por vía difusional*

El transportador TauT no participa en la movilización masiva de la taurina en respuesta a un estímulo hiposmótico. El mecanismo por el que se libera en esas condiciones es una vía difusional, que mueve al aminoácido en función de su gradiente de concentración (Sánchez-Olea *et al.*, 1991; Schousboe *et al.*, 1991). Se trata de un proceso no saturable e independiente de la energía derivada de los gradientes de Na^+ . Entre sus propiedades funcionales más sobresalientes está el hecho de que se inhibe por bloqueadores generales de los canales de Cl^- , tales como DIDS, NPPB, tamoxifen y ácidos grasos poliinsaturados (Sánchez-Olea *et al.*, 1996). Es

interesante señalar que las vías de movilización de otros osmolitos orgánicos, en particular del mio-inositol, tienen las mismas características, aunque es poco probable que se trate de la misma vía, dadas las grandes diferencias en la estructura de estas dos moléculas (Strange y Jackson, 1995). La identidad molecular de esta(s) vía(s) no se conoce. Se han propuesto algunos candidatos como el ICln que es permeable a la taurina, pero su localización citosólica y no membranal sugiere más bien su participación en otras funciones celulares (Krapivinsky *et al.*, 1994; Strange *et al.*, 1996). Se ha propuesto también al fosfolema, que es un canal pequeño de membrana con una permeabilidad mucho mayor por la taurina que por el Cl^- y cuya sobreexpresión potencia la liberación osmosensible de taurina, mientras que una reducción en la expresión la reduce (Morán *et al.*, 2001).

1.3. Regulación del volumen celular

1.3.1. Regulación en ambientes isosmóticos

Las membranas plasmáticas son impermeables a las proteínas, permeables al agua y parcialmente permeables a solutos de bajo peso molecular. Permiten que la célula mantenga niveles constantes de agua y osmolitos al interior, a través de mecanismos de transporte pasivo (difusión simple y facilitada por canal iónico o por transportador (uniporte)) y activo (bombas y cotransportadores (simporte, antiporte)). La operación concertada de estos mecanismos, conocida como la teoría de la bomba y fuga, explica que el volumen celular se mantiene a través de un balance de la actividad de la bomba $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPasa}$ (expulsando 3 Na^+ en contra de su gradiente electroquímico e ingresando 2 K^+) y la difusión a través de la membrana de iones Na^+ y K^+ , de manera que se mantenga una concentración intracelular baja y una extracelular alta de Na^+ , a fin de conservar la homeostasis celular (Tosteson y Hoffmann, 1960). Sin embargo, los mecanismos de mantenimiento del volumen varían de célula a célula e involucran sistemas de transporte de iones y de osmolitos orgánicos, adicionales a los considerados en dicha hipótesis.

1.3.2. Regulación en ambientes anisomóticos

De manera general, las células animales están dotadas de mecanismos que les permiten regular su volumen en medios anisomóticos donde se producen cambios en el ambiente externo. Lambert y col. (2008) señalan que el proceso de regulación del volumen celular esencialmente requiere de cuatro etapas:

- Percepción de la señal de cambio del volumen celular (cambios mecánicos o químicos, receptores, proteínas de adhesión celular, fosfolipasas, cinasas, proteínas G)
- Transducción de señales (mensajeros lipídicos, calcio, calmodulina, ROS, cinasas)
- La activación de efectores (sistemas de transporte, reorganización del citoesqueleto, factores de transcripción)
- La respuesta adaptativa de las células (cambios en el volumen celular)

Los mecanismos sensores del volumen no se han identificado y pudiera ser que fueran no uno sino varios, con distinta predominancia en los diversos tipos celulares (Strange, 2004).

Los flujos de los solutos reguladores de volumen ocurren a través de proteínas de transporte membranales como son los canales iónicos de Na^+ , Cl^- y K^+ , intercambiadores, cotransportadores, poros difusionales y acuaporinas. La actividad de estas proteínas está a su vez sujeta al control apropiado de las señales de osmotransducción. Los flujos de efectores se mantienen activados hasta que se alcanza el equilibrio en la presión osmótica e hídrica (Lang *et al.*, 1998).

De acuerdo con la dirección de la perturbación inicial del volumen, se han descrito dos tipos de respuestas. En respuesta al hinchamiento, las células liberan solutos y agua en un proceso denominado decremento regulador de volumen (DRV). En respuesta al encogimiento, las células capturan solutos y agua en un proceso denominado incremento regulador de volumen (IRV). En ambos casos, la respuesta es desactivada tras la restauración del volumen al nivel basal (Lang *et al.*, 1998). Los mecanismos de activación de IRV y DRV no han sido esclarecidos en su totalidad.

En caso de que los mecanismos de regulación del volumen no funcionen adecuadamente, pueden generarse profundas alteraciones en la homeostasis celular (Lang, 2007).

1.3.3. *Decremento regulador de volumen (DRV)*

Cuando las células están expuestas a una osmolaridad externa reducida (ambiente hipotónico), hay un incremento en el volumen celular o hinchamiento celular hiposmótico. En la mayor parte de las células este incremento es transitorio y es seguido por el DRV (Lang *et al.*, 1998).

El DRV es un proceso activo que involucra la liberación de cationes como K^+ y aniones como Cl^- ya sea por la activación de canales independientes, por activación del cotransportador K^+/Cl^- y/o por los intercambiadores K^+/H^+ y Cl^-/HCO_3^- . El hinchamiento osmótico celular también induce una liberación rápida de osmolitos orgánicos como la taurina, glutamato, aspartato, alanina e inositol, que ocurre, como se mencionó, a través de poros difusionales de identidad y especificidad aún desconocida. La movilización de los iones y los osmolitos orgánicos genera un flujo de agua hacia el interior de la célula, restaurando el volumen original y estableciendo un nuevo equilibrio osmótico (Chamberlin *et al.*, 1989).

En particular, la identidad molecular del canal de Cl^- activado por volumen no se ha establecido. A pesar de que se han clonado numerosos miembros de la familia de canales de Cl^- y que algunos de ellos se activan por hiposmolaridad, ninguno de ellos satisface todos los requerimientos para funcionar como un canal de Cl^- osmosensible universal. En cuanto a los osmolitos orgánicos, se han observado discrepancias marcadas entre los cursos temporales para inactivación y activación de I^{125} (usado como marcador para el Cl^-) y la liberación de aminoácidos, que no sustentan la hipótesis de un canal único compartido con el Cl^- (Lambert y Hoffmann, 1994; Morán *et al.*, 1997; Shennan *et al.*, 1994; Stutzin *et al.*, 1999), por lo que se ha planteado la posible existencia de rutas de permeabilidad separadas para los osmolitos dependiendo de la célula o tejido examinado. De hecho, el curso temporal de liberación de osmolitos orgánicos sigue cercanamente al cambio en el volumen celular, en contraste con los flujos de Cl^- y K^+ que son más rápidos (Cl^-) o más lentos (K^+) (Pasantes-Morales, 1996).

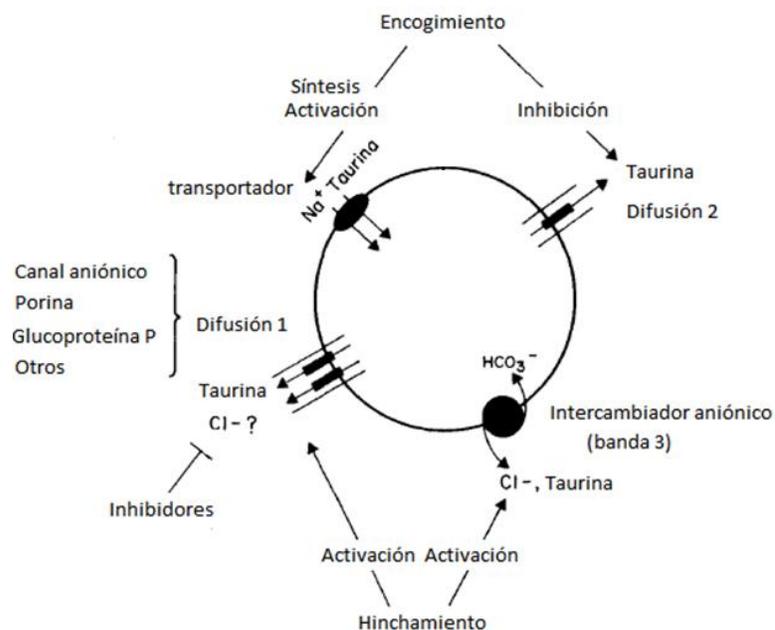


Figura 1.1. Mecanismos involucrados en la movilización de taurina en respuesta a cambios en el volumen celular. Durante el hinchamiento se activa una vía difusional cuya identidad molecular no ha sido determinada, aunque se han propuesto como candidatos al canal aniónico, la porina, la glucoproteína 3 y el intercambiador banda 3. Durante el encogimiento, la entrada de taurina se lleva a cabo a través de la síntesis y activación del transportador dependiente de sodio (TauT). Adaptado de: Pasantes-Morales y Schousboe, 1997.

1.3.4. Regulación del volumen en el cerebro

Las células cerebrales de los vertebrados se encuentran limitadas espacialmente por un cráneo rígido, razón por la cuál es crítico el funcionamiento adecuado de los mecanismos de regulación de volumen, ya que una expansión del tejido encefálico podría llevar a una compresión vascular llevando al rompimiento de vasos, y ocasionando embolias, anoxia, isquemia, excitotoxicidad y muerte neuronal (Pasantes-Morales *et al.*, 2006).

En condiciones isotónicas y fisiológicas existen fluctuaciones pequeñas y transitorias en el volumen de las células nerviosas, ya que los flujos iónicos transmembranales pueden cambiar en milisegundos y alterar el volumen celular. Por ejemplo, las células nerviosas pueden hincharse durante la generación de un potencial de acción y la actividad neuronal resultante, puede llevar a cambios en las concentraciones de K^+ , Na^+ , Cl^- y Ca^{2+} . Esta condición debe mantenerse dentro de límites controlados a través de los mecanismos de regulación del volumen celular (Tasaki, 1999; Tuz *et al.*, 2001).

Los cambios anisotónicos se observan en una amplia variedad de condiciones patológicas (Strange, 1992). La hiponatremia ocurre asociada a una variedad de patologías incluyendo: fallas cardíacas, hepáticas y renales, hipotiroidismo, una inapropiada secreción de la hormona antidiurética (vasopresina) o desórdenes psiquiátricos como la polidipsia psicótica (Massieu *et al.*, 2004). El desequilibrio en el balance de electrolitos, principalmente de Na^+ , característico de la hiponatremia, genera un ingreso rápido de agua al cerebro, llevando a un hinchamiento hiposmótico y a una cascada de respuestas neurológicas (Pasantes-Morales *et al.*, 2002b). Por ejemplo, los cambios en la osmolaridad y el consecuente incremento en el volumen celular pueden tener efectos en la señalización célula-célula por la relación espacial que existe entre neuronas y células gliales, debido a que el espacio extracelular se ve comprometido por el hinchamiento. Esto puede tener consecuencias en la difusión de neurotransmisores, la excitabilidad sináptica o el pH. Igualmente puede propiciar la transmisión eféptica (a través de las membranas) y la sincronización de la actividad neuronal (Andrew *et al.*, 1989; Pasantes-Morales y Tuz, 2006; Saly y Andrew, 1993; Schwartzkroin *et al.*, 1998).

Debido a la complejidad del SNC en la diversidad de sus tipos celulares y regionalización, se ha requerido el desarrollo e investigación de cultivos celulares *in vitro* para estudiar estos mecanismos de regulación. Se ha estudiado la regulación de volumen tras un estímulo hipotónico en cultivos de astrocitos y neuronas, mostrando el papel de K^+ , Cl^- , mio-inositol, glutamato, GABA, alanina, aspartato y taurina en el DRV (Pasantes-Morales *et al.* 2002b), siendo mayor la contribución de los aminoácidos libres en el proceso de regulación de volumen en astrocitos que en otros tipos celulares (Pasantes-Morales *et al.*, 1993). En experimentos *in vivo* se han observado decrementos moderados para los osmolitos inorgánicos y significativos para osmolitos orgánicos en el tejido neural, sobre todo a largo plazo (Lien *et al.*, 1991; Massieu *et al.*, 2004). El tiempo o tasa necesarios para recuperar el volumen celular varían dependiendo de los diferentes tipos celulares. En los astrocitos en cultivo, el DRV ocurre rápidamente con un 70 a 80% de la recuperación alcanzada a los 16 minutos (Cardin *et al.*, 1999; Hussy *et al.*, 2000).

Existen otras neuropatologías que llevan a un incremento en el volumen celular, pero en condiciones isosmóticas. Entre ellas una de las más frecuentes es la isquemia cerebral, en la que la osmolaridad externa no cambia pero el volumen celular aumenta debido a una redistribución

iónica y a la movilización de osmolitos orgánicos como el glutamato, que a su vez, pueden llevar a cuadros de muerte neuronal por excitotoxicidad (Camacho y Massieu, 2006; Pasantés-Morales *et al.*, 2000b).

En conjunto, estas observaciones evidencian la importancia de conocer los mecanismos que generan un incremento en el volumen celular y la capacidad de las células para contrarrestarlos en forma activa.

1.4. Células troncales

1.4.1. Generalidades

Las células troncales se caracterizan por su potencial de auto-renovación por división asimétrica, su potencial de proliferación durante largos periodos de tiempo y su capacidad de diferenciación a células de múltiples linajes (Baizabal *et al.*, 2003; Weissman, 2000). Se han aislado de casi todos los tejidos; sin embargo, su definición y clasificación es funcional y no morfológica, siendo identificadas de acuerdo al tejido del cual se han purificado o los tipos celulares en los cuales se pueden diferenciar (Reynolds y Rietze, 2005).

El potencial de diferenciación que presentan permite la distinción entre las células **totipotentes**, capaces de formar todos los tipos celulares de un organismo; las **pluripotentes**, capaces de formar células de diferentes linajes; las **multipotentes**, capaces de formar células de un linaje restringido y las **unipotentes**, capaces de generar solamente un tipo celular (Baizabal *et al.*, 2003; Temple, 2001). Dicha capacidad de diferenciación es regulada por señales extracelulares como: citocinas, neurotransmisores, uniones GAP, quimiocinas, moléculas de matriz extracelular y la interacción con receptores membranales que activan rutas de señalización (Ip, 1998; Lin y Bertics, 1995; Ma *et al.*, 2000; Reiss *et al.*, 2002; Rozental *et al.*, 1998). El aislamiento y caracterización de las células troncales de diferentes regiones muestran características que sugieren un patrón regional específico de crecimiento y diferenciación que las distinguen. Las células troncales mantienen su patrón de expresión regional específico de genes, aunque no mantienen autónomamente estas características, ya que si se combinan con

cultivos de otra región, se inducen cambios en la expresión de los marcadores regionales. Estas observaciones sugieren que el estado celular troncal posee un perfil único modulado por su nicho, es decir, el ambiente en el cual reside (Lin, 2002; Dietrich y Easterday, 2002). Este contexto ambiental regula la respuesta celular a un factor particular y no depende sólo de la expresión de la ruta de señalización adecuada, sino del estado completo de la célula que integra la información de una variedad de rutas de señalización competentes (Sommer y Rao, 2002).

1.4.2. Células precursoras neurales (CPN)

Las CPN son células troncales y progenitoras¹, cuyo potencial de diferenciación se limita a tres subtipos de células neurales: neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. Es posible aislarlas de diversas regiones del cerebro en desarrollo o bien, de la región subventricular y la capa subgranular del giro dentado del hipocampo en los organismos adultos (Baizabal *et al.*, 2003; Temple, 2001).

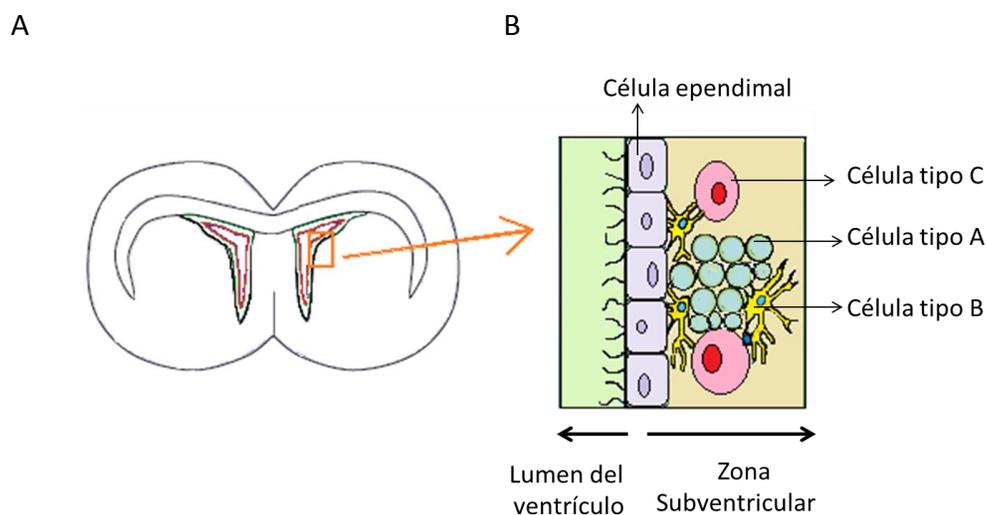


Figura 1.2. Localización de las CPN en la zona subventricular del cerebro adulto. **A.** Sección transversal del cerebro. **B.** Amplificación del recuadro seleccionado en A. La concentración de las células precursoras neurales es mayor en la zona subventricular, la cual contiene 4 tipos de células identificadas por su morfología y marcadores moleculares. Esta zona se encuentra físicamente aislada del lumen del ventrículo lateral por una capa de células endodiales ciliadas. Las células tipo B son astrocitos y precursores primarios de la zona subventricular, los cuales dan lugar a las células tipo C (precursores secundarios altamente proliferativos) y éstas a su vez dan lugar a las células tipo A (neuroblastos migratorios). Adaptado de: Conti y Cattaneo, 2005.

¹ Las células progenitoras poseen un potencial troncal más restringido.

Para aislar las CPN de un tejido heterogéneo, es necesario cultivarlas en presencia de factores de crecimiento como EGF y FGFb, los cuales permiten su proliferación y propagación para formar agregados conocidos como neuroesferas (Baizabal *et al.*, 2003; Rietze y Reynolds, 2006). Éstas pueden disociarse y subcultivarse dando lugar a nuevas neuroesferas o bien, pueden diferenciarse y generar diferentes poblaciones de células neurales (Chojnacki y Weiss, 2008; Rietze y Reynolds, 2006). El potencial de las CPN se basa en sus futuras aplicaciones en terapias de reemplazo y regeneración en condiciones patológicas en donde el ambiente celular ha sido alterado (Baizabal *et al.*, 2003).

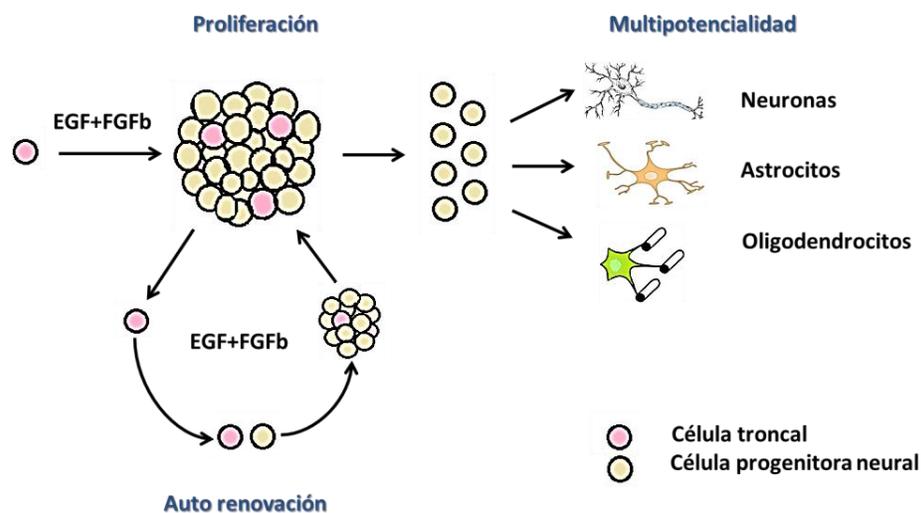


Figura 1.3. Estructura y potencialidad de las neuroesferas. Las neuroesferas están conformadas por células troncales (rosa) y progenitoras (beige), que en conjunto se denominan células precursoras neurales (CPN). Se describen los procesos de auto renovación y proliferación en presencia de factores de crecimiento, así como el potencial de diferenciación de las CPN. Adaptado de: Ahmed, 2009.

A pesar de que no expresan marcadores de linaje específicos, existen algunos marcadores que se han empleado para su identificación, entre los que se encuentran: Nestina, CD133, Nanog, GFAP y Aldefluor (Pevny y Rao, 2003). Así mismo, se han reportado que poseen un potencial de membrana en reposo ligeramente más positivo comparado con el de neuronas maduras. Además, se han identificado respuestas de receptores de acetilcolina (nicotínicos y muscarínicos) y la presencia de receptores colinérgicos, canales activados por voltaje (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}), canales iónicos y transportadores de Cl^- (Clca1 y Clcn2), involucrados en procesos de excitabilidad, comunicación, proliferación y diferenciación celular (Cai *et al.*, 2004).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El mantenimiento de un volumen celular constante es un requerimiento básico de las células animales, y es aún más crítico en las células nerviosas. Los cambios en el volumen pueden ser también señales de proliferación y supervivencia celular. Actualmente el estudio de las CPN está enfocado en comprender los mecanismos fisiológicos que regulan su potencialidad de proliferación y diferenciación, pues poseen propiedades fisiológicas y funcionales diferentes a sus derivadas diferenciadas. El identificar su respuesta ante cambios en el volumen es un aspecto importante en el conocimiento de su fisiología y a la fecha no se ha realizado una investigación sobre el control del volumen en este tipo celular. El caracterizar los mecanismos de control del volumen puede ampliar entonces el conocimiento de su homeostasis, de manera que se puedan integrar sus múltiples propiedades en un panorama funcional significativo para futuras aplicaciones en terapias de reemplazo y regeneración en condiciones patológicas en donde el ambiente celular ha sido alterado.

3. JUSTIFICACIÓN

Estudios previos del laboratorio en el que se realizó esta investigación reportaron los mecanismos de regulación de volumen en células diferenciadas del cerebro, como astrocitos y neuronas, encontrando algunas diferencias entre los distintos tipos celulares. Igualmente se reportaron efectos muy notables de la taurina sobre la proliferación de las CPN y su diferenciación en neuronas. En virtud de que la taurina es un osmolito involucrado en la respuesta adaptativa a cambios en el volumen, es de interés el conocer si en las CPN participa de manera prominente en la regulación del volumen. Igualmente, se considera de interés el conocer si las CPN poseen los mecanismos de regulación de volumen similares a los observados en otros tipos celulares diferenciados.

Se plantea por lo tanto, investigar la presencia de mecanismos de regulación del volumen celular en las CPN, así como posibles semejanzas o diferencias con respecto a otras células nerviosas diferenciadas. Este conocimiento es relevante para procesos característicos de las CPN como son la proliferación, la migración y la diferenciación.

4. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el decremento regulador de volumen en células precursoras neurales.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener cultivos de células precursoras neurales aisladas de mesencéfalo de ratones CD1 en etapa embrionaria (13.5 días) y de la zona subventricular de ratones adultos CD1 (8 semanas).
- Cuantificar la concentración de aminoácidos con función de osmolitos en el mesencéfalo y la zona subventricular.
- Caracterizar los cambios en el volumen celular ante la disminución de osmolaridad externa mediante el sistema de dispersión de luz. Identificar la presencia del incremento en volumen y de una respuesta activa de regulación.
- Determinar el efecto de inhibidores de las vías sensibles a volumen (DCPIB, NPPB, DIDS, SITS) en los cambios de volumen celular ante la reducción de osmolaridad externa.
- Caracterizar la liberación de taurina como osmolito orgánico representativo ante estímulos hiposmóticos, incluyendo el efecto de inhibidores de las vías sensibles a volumen (DCPIB, NPPB, DIDS, SITS).
- Determinar la reducción en la concentración de Cl^- intracelular ante la disminución de la osmolaridad externa.

5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

5.1. Materiales

5.1.1. Compuestos

Compañía	Compuesto	No. Catálogo
American Radiolabeled Chemicals, Inc.	³ H-aurina	Art 0300-1mCi
Calbiochem	Fibronectina plasma humano	341635
GIBCO, Invitrogen	Dulbecco's Modified Eagle Medium	11330-032
	Factor de crecimiento epidérmico	PHG-0021
	Factor de crecimiento fibroblástico	PHG-0311L
	Glutamax	35050-079
	Inhibidor de tripsina	17075
	Insulina humana	12585-014
In vitro, s.a.	Penicilina/estreptomicina	15140-148
	Solución tripsina 0.05%/verseno 0.05%	EN-005
	1,2-Etanodiol	9300-03
	Cloruro de calcio	1313
J.T. Baker	Cloruro de potasio	3040-01
	Dextrosa anhidra	1916-01
	Fosfato de potasio monobásico	3246-01
	Acetato de potasio a.c.s.	PQ11841
	Hidróxido de sodio	3722-01
Molecular Probes	Sulfato de magnesio	2500-01
	Ioduro de 6-metoxi-N-etilquinolinio	M-6886
Reactivos Química Meyer	Butano-1,4-diamina	D-13208
	Etanol (Alcohol etílico absoluto)	B1110574,
	Xileno	W0709261
	Poli-L-lisina	P-1274
	Progesterona (Pregn-4-ene-3,20-diona)	P-6149
	Selenita de sodio	214485
	2,5-difenil oxazol	D-4630
	Ácido 4-(2-butil-6,7-dicloro-2-ciclopentilindan-1-on-5-il)oxibutírico	D-4068
	Ácido 4,4'-diisotiocianostilben-2,2'-disulfónico	D-3514
	Alcohol metílico	UN-1230
Sigma Aldrich	Ácido 5-nitro-2-(3-fenilpropilamino)benzóico	N-4779
	Azul tripano	T-8154
	Cloruro de sodio	S-7653
	Solución salina de fosfatos	P-4417
	Sulfato ferroso	F-8048
	Tritosol (t-oxtilfenoxipolietoxietanol)	T-9284
	Transferrina humana	T-3309,773176
	Disodio 4 acetamido-4'-isotiocianato-stilben-2,2'-disulfonato	A-0554
	Taurina	B-6329
	OPA (o-tftaldehído)	P-0657
	Tripsina de páncreas bovino	T-9935
	Borohidruro de sodio	422882
	Reactivo Bradford	B-6916
Cloroformo	C-2432	

5.1.2. Soluciones

³H-aurina: Actividad específica de stock empleado: 29 Ci/mmol. Concentración: 1mCi/mL. ($3.44 \cdot 10^{-5}$ M). Preparación con 40 μ L del stock + 760 μ L de agua Milli-Q ($1.72 \cdot 10^{-6}$ M).[◊]

DCPIB: Stock 10 mM. Disolver en DMSO.[◊]

DIDS: Stock 100 mM. Disolver en DMSO. Almacenar a temperatura ambiente.

DiH-MEQ: Disolver 5 mg de MEQ en 0.1 mL de dH₂O en un tubo de ensaye. Proteger de la luz. Preparar 20 μ L de una solución acuosa de borohidruro de sodio al 12% (120 mg/mL). Exponer la solución de MEQ a gas nitrógeno por 1 minuto. Añadir 10 μ L (32 μ mol) de la solución de borohidruro de sodio a la solución MEQ con una exposición continua al gas nitrógeno. La solución primero se debe colorear de rojo y posteriormente a amarillo. DiH-MEQ se separará de la solución como un aceite amarillo después de 30 minutos. Se extrae el DiH-MEQ de la mezcla con cloroformo (fase inferior). Diluir la mezcla con 0.5 mL de agua y 0.5 mL de solvente. Agitar con vórtex 30 segundos. Permitir que las fases se separen y tomar la fase inferior con una pipeta y colocarla en un tubo de vidrio limpio. Repetir la extracción usando otros 0.5 mL de solvente y combinar los extractos orgánicos. Secar la fase orgánica con 100 mg de sulfato de sodio anhidro por 5 minutos. Transferir la fase orgánica a un contenedor de vidrio estéril que pueda ser altamente sellado. Volver a exponer la solución a gas nitrógeno para evaporar el cloroformo y reducir el MEQ (aproximadamente 5 minutos). El DiH-MEQ debe ser almacenado en la oscuridad a -70°C.

EGF: Stock inicial: 1mg/mL. Preparar viales: 2500 ng/500 μ L de medio definido.[◊]

FGFb: Stock inicial: 1mg/mL. Preparar viales: 2500 ng/500 μ L de medio definido.[◊]

Fibronectina: 1 μ g/mL. Disolver en PBS.[◊]

Inhibidor de tripsina: 0.7mg/mL. Disolver en medio definido. Esterilizar por filtración en campana de extracción.[◊]

[◊] Almacenar a 4°C.

Medio definido: DMEM/F12 con rojo fenol, glutamax 100x, 25 µg/mL insulina, 100 µg/mL transferrina humana, 20 nM progesterona, 60 µM putresina, 30 nM selenita de sodio, 50 U/mL penicilina y 50 µg/mL estreptomicina. Esterilizar por filtración en campana de extracción y almacenar a 4 °C. 300 mOsm.

Medio hiposmótico para células adultas H30 (217 mOsm); H40 (186 mOsm); H50 (155 mOsm): KCl 4.7 mM; CaCl₂ 1 mM; glucosa 5 mM; MgSO₄ 1.17 mM Ajustar la osmolaridad reduciendo la cantidad de NaCl y añadiendo dH₂O. ♦

Medio hiposmótico para células embrionarias H30 (210 mOsm); H40 (180 mOsm); H50 (150 mOsm): KCl 4.7 mM; CaCl₂ 1 mM; glucosa 5 mM; MgSO₄ 1.17 mM. Ajustar la osmolaridad reduciendo la cantidad de NaCl y añadiendo dH₂O. ♦

Medio isosmótico para células adultas (310 mOsm, pH 7.4): NaCl 135 mM; KCl 4.7 mM; CaCl₂ 1 mM; glucosa 5 mM; MgSO₄ 1.17 mM. ♦

Medio isosmótico para células embrionarias (300 mOsm, pH 7.4): NaCl 135 mM; KCl 4.7 mM; CaCl₂ 1 mM; glucosa 5 mM; MgSO₄ 1.17 mM. ♦

NPPB: 50 mM. Disolver en DMSO. ♦

PBS: Disolver 1 tableta en 200 mL de agua destilada. ♦

PBS+ Glucosa: Disolver glucosa (40 mg/100 mL) en PBS. Esterilizar por filtración en campana de extracción. ♦

Poli-L-lisina: Preparar a dos concentraciones: 0.25 mg/mL ó 0.01 mg/mL. Disolver en PBS. ♦

SITS: 100 mM. Disolver en DMSO. ♦

Tritosol (1 gal). PP0 10.5 g, etanol 371 mL, etilenglicol 129 mL, xileno 2.1 L, tritón 945 mL. Almacenar a temperatura ambiente.

♦ Ajustar el pH a 7.4 con NaOH 2M. La osmolaridad de las soluciones se registró con un osmómetro de punto de congelación 5002 OSMETTE™ Precision Systems., Inc.

♦ Almacenar a 4°C.

Los plásticos empleados fueron de Corning, Inc.

5.2. Métodos

5.2.1. *Cultivo de células precursoras neurales (CPN)*

El aislamiento y cultivo primario de CPN embrionarias se llevó a cabo empleando ratones de la cepa CD1 de 13.5 días de gestación (el día del tapón vaginal se consideró día 0). El procedimiento se realizó siguiendo la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Tras dislocación cervical de la madre, los fetos se extrajeron rápidamente del útero (Figura 5.1), se colocaron en cajas de Petri con glucosa + PBS frío, donde se removieron las meninges, se realizó la disección del cerebro y se aisló el mesencéfalo (Figura 5.2). En condiciones de esterilidad, el tejido obtenido se disgregó en 2 mL de medio definido y se dejó reposar por 2 minutos. Posteriormente se procedió a coleccionar el medio con las células en suspensión empleando una micropipeta, cuidando de no tomar el tejido sedimentado. Se centrifugó (1800 rpm/5 min) y el pellet se resuspendió en 3 mL medio definido. Posteriormente se determinó la viabilidad por exclusión con azul tripano (0.4%) en cámara de Neubauer (Marienfeld, 0.0025 mm²) y las células se sembraron en 3 mL de medio definido, EGF y FGFb (12 µL cada uno) en placas de 6 pozos (5x10⁵ células por pozo). Los cultivos se incubaron a 37°C en cámaras con 95% aire y 5% CO₂ durante 5 días.

Para el cultivo secundario, las neuroesferas generadas del cultivo primario se coleccionaron, centrifugaron, disgregaron en medio definido y se determinó la viabilidad. Posteriormente se sembraron (2.5x10⁵ células por pozo) con EGF únicamente, en condiciones similares a las del cultivo primario, durante 4 ó 5 días.

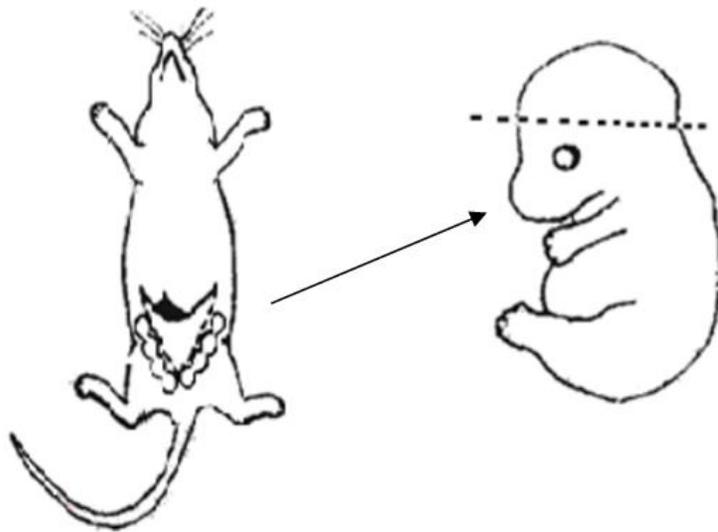


Figura 5.1. Esquema representativo de la extracción de ratones CD1 en etapa embrionaria. La línea punteada indica el primer corte a realizar en la disección del tejido encefálico.

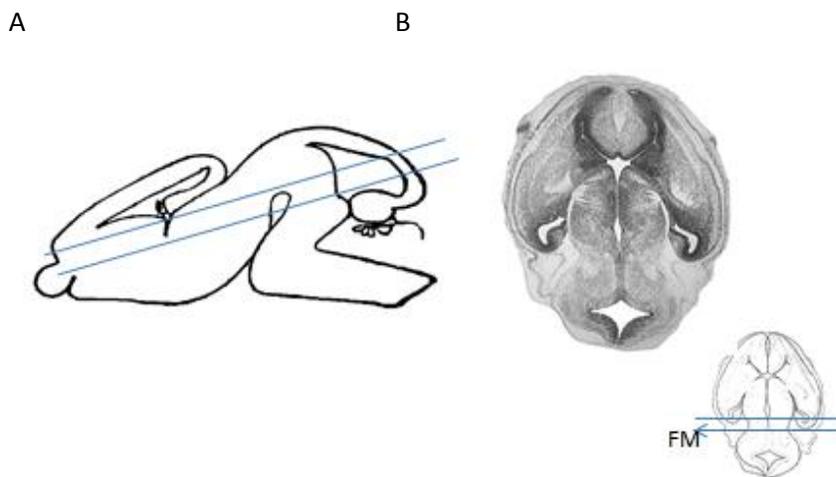


Figura 5.2. Disección del mesencéfalo. **A.** Esquema del corte en el plano coronal. **B.** Microfotografía (59x) representativa del tejido y un esquema del corte en el plano horizontal. FM: Flexo mesencefálico. Modificado de: Schambra *et al.*, 1992.

El aislamiento y cultivo primario de CPN adultas se llevó a cabo empleando ratones de la cepa CD1 de 6 a 8 semanas de edad. Tras dislocación cervical, se extrajo el cerebro y se colocó en cajas de Petri, se removió el cráneo, meninges, se realizó la disección del cerebro y se aisló la zona subventricular (ZSV) (**Figura 5.3**), se disgregó mecánicamente en 2 mL de medio definido, se centrifugó y el pellet se resuspendió en 1 mL de medio definido. Posteriormente se determinó la viabilidad por exclusión con azul tripano (0.4%) en cámara de Neubauer y las células se sembraron en 3 mL de medio definido con EGF y FGFb (20 ng/mL cada uno) en placas de 6 pozos (4×10^4 células por pozo). Los cultivos se incubaron a 37°C en cámaras con 95% aire y 5% CO₂. A las 48 horas se reemplazó la mitad del medio presente en la placa con medio nuevo y se agregaron factores de crecimiento. Posteriormente cada 48 horas se agregó EGF. El cultivo se mantuvo durante 11 días.

Para el cultivo secundario, las neuroesferas generadas del cultivo primario se colectaron, centrifugaron, disgregaron en medio definido y se determinó la viabilidad. Posteriormente se sembraron (2.5×10^5 células por pozo) con EGF y FGFb en condiciones similares a las del cultivo primario, durante 4 ó 5 días.

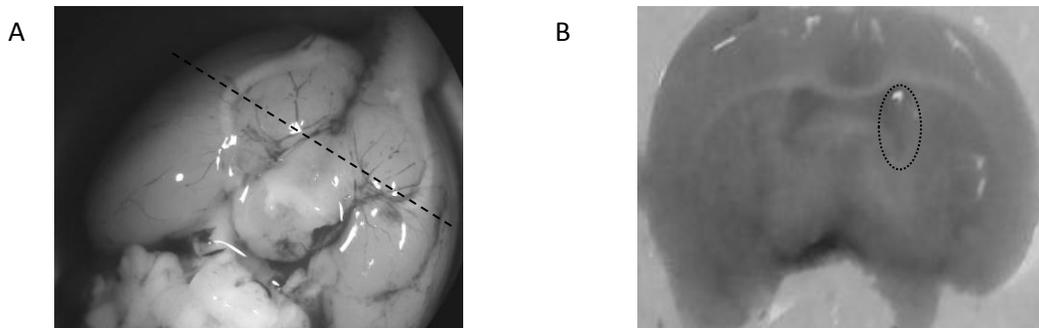


Figura 5.3. Disección de la zona subventricular. **A.** Vista ventral de cerebro en donde se realiza el corte coronal para obtener la región periventricular rostral de los ventrículos laterales. **B.** Sección coronal resultante cuando el cerebro se corta en la línea punteada de A. El círculo muestra la región periventricular que se disecciona tras remover el septum. Fotografías tomadas en un microscopio estereoscópico Olympus 3100 SZ60.

5.2.2. *Medición de volumen celular*

Las neuroesferas de cultivos secundarios se colectaron, centrifugaron (1800 rpm/5 min), se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 1 mL de tripsina, dejando reposar por 1.5 min. Posteriormente se agregó 1 mL de inhibidor de tripsina, se resuspendió y centrifugó. Nuevamente se descartó el sobrenadante, el pellet se resuspendió en 3 mL de medio definido y se determinó la viabilidad. Se centrifugaron las células, se descartó el sobrenadante y se sembraron 2×10^5 células en cada cubreobjetos (8x36 mm) previamente tratados con poli-L-lisina (0.01%, 24 horas). Se incubaron los cubreobjetos con células dentro de cajas Petri a 37°C en cámaras con 95% aire y 5% CO₂ durante 1.5 horas. Posteriormente, se cubrieron los cubreobjetos con medio definido y factores de crecimiento a 37°C y se dejaron en la incubadora 4 días. Tras ese tiempo, los cubreobjetos que requerían exponerse a inhibidores se colocaron en cajas Petri con medio definido e inhibidor y se incubaron 5 minutos a 37°C. Posteriormente, los cubreobjetos se colocaron verticalmente en celdas para espectrofluorómetro con el medio (con inhibidor en los casos en los que se requería) en un ángulo de 50° respecto a la luz de excitación (585 nm, lámpara de Argón-arc). La emisión se detectó a la misma longitud de onda (apertura 3nm). Se procedió entonces a registrar la regulación del volumen celular empleando el espectrofluorómetro Fluoromax-3® Horiba y el software Instrument Control Center versión 2.2.13, Datamax ©2004 Jobin Yvon, Inc. Se registró el volumen durante 600 segundos, empleando los primeros 100 a 200 para medir la intensidad de emisión basal en medio isosmótico; posteriormente se agregó la cantidad necesaria de agua destilada (con el inhibidor en los casos en los que se requería) a la celda con una jeringa para volver hiposmótico el medio circundante y poder registrar los cambios en el volumen. El volumen se expresó como volumen relativo, i.e., el promedio de la intensidad de señal registrado en medio isosmótico con respecto al cambio de volumen registrado en el tiempo t ($I_o/I_t, V_o=1$).³

³ Los experimentos se realizaron en cubreobjetos que mostraron una confluencia celular del 70-90%.

5.2.3. *Medición del contenido de aminoácidos*

Para determinar los niveles de los aminoácidos taurina, glutamato, alanina, glicina y GABA, se colectaron muestras de tejido del mesencéfalo de embriones de 13.5 días y en el tejido de los laterales de los ventrículos. Las muestras de tejido se lavaron tres veces con PBS, después se resuspendieron en 150 μ L de PBS y se sonicaron durante 30 segundos (empleando un Branson Sonifier-250). El contenido de proteína en las muestras se determinó por el análisis de Bradford. Las muestras se almacenaron a 0°C hasta su procesamiento por HPLC.

Para determinar la concentración de los aminoácidos por HPLC de fase reversa, se colectaron muestras de 15 μ L y se trataron con 105 μ L de etanol absoluto, durante 20 minutos. Posteriormente las muestras se centrifugaron y el sobrenadante se filtró a través de una membrana estéril de 0.22 μ m. Del filtrado, se tomaron 10 μ L que se derivatizaron con el mismo volumen de OPA, y se inyectaron a un sistema de cromatografía líquida (Beckman). Se empleó una columna ODAS de un diámetro interno de 4.6 x 250 mm. El efluente se monitoreó con un detector de fluorescencia (emisión 460 nm, excitación 330 nm). La fase móvil se preparó con una solución de metanol (grado HPLC) más acetato de potasio (0.1 M, pH 5.5) y se corrió a una tasa de 1.5 mL/min, durante 15 minutos.

5.2.4. *Liberación de ³H-aurina por hiposmolaridad*

Las células obtenidas de cultivos secundarios se sembraron en 1.5 mL medio definido en placas de 12 pozos (1x 10⁶ células/pozo) previamente tratadas con poli-L-lisina (0.25 mg/mL, 24 h) durante 1 hora. Posteriormente se añadió ³H-aurina (0.5 μ Ci/mL, 17 nM) y se incubó 1 hora. Tras la incubación, se realizaron 5 lavados rápidos con medio isosmótico (con el inhibidor en el caso respectivo), posteriormente se perfundieron las células con 1 mL de medio isosmótico (con inhibidor en el caso respectivo), el cual se colectó en viales cada minuto durante 5 minutos, determinando la liberación de ³H-aurina basal. Subsecuentemente se perfundieron las células con medio hiposmótico (con inhibidor en el caso respectivo), el cual se colectó cada minuto durante 13 minutos. Al finalizar, se colectaron las células adheridas en 2 mL de medio. Las soluciones se mantuvieron a 37°C. Al final del experimento, las colectas de cada fracción se

mezclaron con solución de tritosol (1.5 mL) y se analizaron en un espectrofotómetro de centelleo líquido. Los resultados se expresaron como porcentaje de radioactividad liberada en cada colecta con respecto a la total incorporada, que es la suma de las colectas y el lisado celular. Para comparar la liberación de cada condición se sumó la radioactividad acumulada en las 10 fracciones ante condición hiposmótica.

5.2.5. Liberación de CF intracelular por hiposmolaridad

Las células obtenidas de cultivos secundarios se sembraron en 1.5 mL de medio definido en cajas Petri con fondo de vidrio (1×10^5 células/pozo) previamente tratadas con poli-L-lisina (0.25 mg/mL, 24 h) durante 1 hora. Se incubaron las células con DiH-MEQ (50 μ M) por 15 minutos. Se realizaron cuatro lavados con medio isosmótico y se incubaron a 37°C por 15 minutos para permitir que se dispersara el fluoróforo de manera homogénea. Se visualizó la fluorescencia en un microscopio óptico con luz ultravioleta (excitación 344 nm, emisión 440 nm), con una cámara adaptada. Se empleó el programa QCapturePro® para capturar imágenes cada minuto por 15 minutos. Los primeros 5 minutos se registraron las células en medio isosmótico. Posteriormente se dio un estímulo hiposmótico al 40% y se registraron los cambios en la intensidad de señal por 10 minutos. Posteriormente las imágenes se convirtieron a escala de grises y se evaluaron con el programa ImageJ®, en donde se seleccionó el área de la célula y se midió la densidad integrada (la cantidad total de luz, que se traduce como la suma de los valores de píxeles dentro del área).

5.2.6. Análisis estadístico

Los resultados muestran la media y el error estándar de los diversos experimentos. La significancia estadística se determinó para comparaciones pareadas con una prueba de *t de Student* y para comparaciones múltiples con un ANOVA de una vía, así como de una prueba *post hoc* de Tukey empleando el programa GraphPad Prism® versión 5.0 para Windows.

6. RESULTADOS

La morfología de las neuroesferas fue similar en los cultivos derivados de cerebro embrionario o adulto. Las CPN obtenidas de la disgregación de las neuroesferas mostraron un tamaño celular aproximado de $10\ \mu\text{m}$ (**Figura 6.1 A, B**). Los experimentos se llevaron a cabo en células disgregadas y adheridas a cajas o cubreobjetos en las condiciones indicadas en los Métodos (**Figura 6.1 C**).

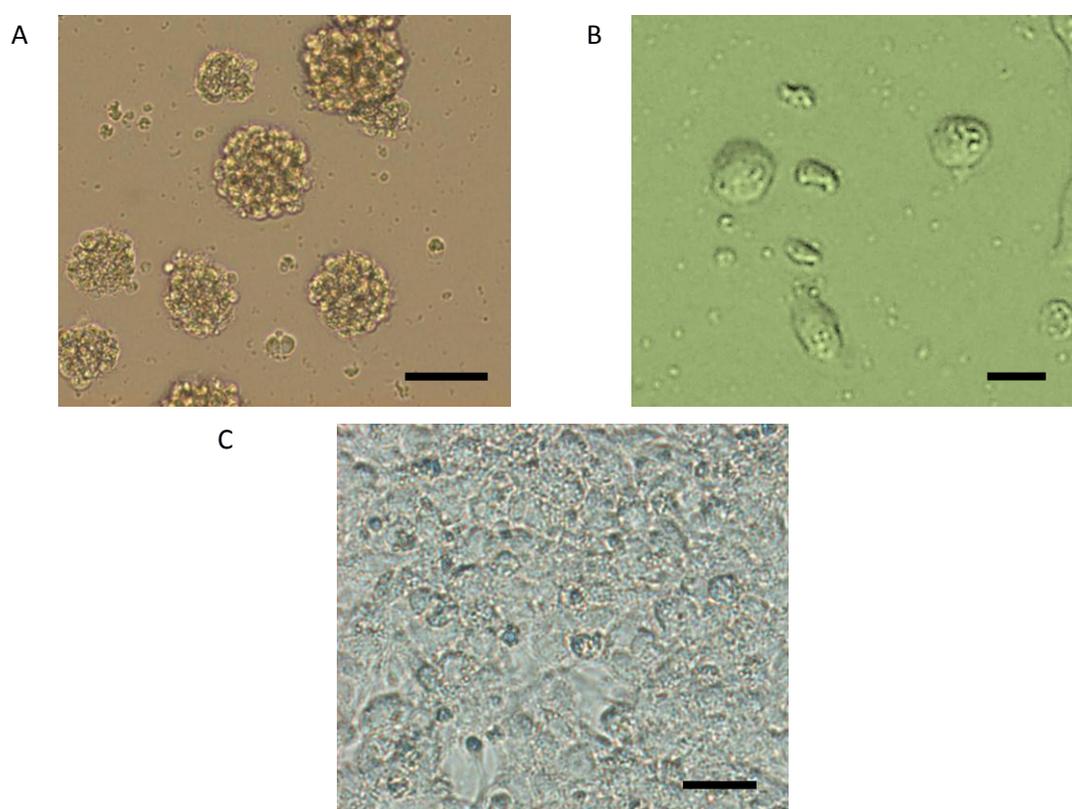


Figura 6.1. Morfología de las CPN. **A.** Fotomicrografía representativa de las neuroesferas tras 4 días en cultivo. Barra de escala= $60\ \mu\text{m}$. **B.** Morfología y tamaño de CPN disgregadas de neuroesferas. Barra de escala= $10\ \mu\text{m}$. **C.** Morfología de las células plaqueadas en monocapa. Barra de escala= $30\ \mu\text{m}$. Las fotomicrografías fueron capturadas con un objetivo 20x y en **C** hay un aumento adicional de 1.6x.

6.1. *Cambios en el volumen de CPN embrionarias y adultas en respuesta a un estímulo hiposmótico*

En respuesta a las condiciones hiposmóticas se observó un incremento rápido en el volumen celular con respecto al original, de $28.8 \pm 2.2\%$, $37.2 \pm 0.3\%$ y $37.2 \pm 2.4\%$ ante reducciones de osmolaridad del 30%, 40% y 50%, respectivamente (**Figura 6.2 A**). El pico máximo de hinchamiento se alcanzó en menos de un minuto después del estímulo (**Figura 6.2 B**) y a continuación, las células iniciaron el proceso activo de regulación del volumen (DRV). Al término del experimento, a los 7 min de haber aplicado el estímulo osmótico, la regulación observada con fue de $47.7 \pm 4.9\%$, $39.1 \pm 4.3\%$ y $32.2 \pm 6.3\%$ con respecto al volumen inicial, a reducciones en la osmolaridad del 30%, 40% y 50%, respectivamente (**Figura 6.2 C**). Se observa entonces, una tendencia a una mayor eficiencia en la regulación en condiciones de un decremento menor en la osmolaridad.

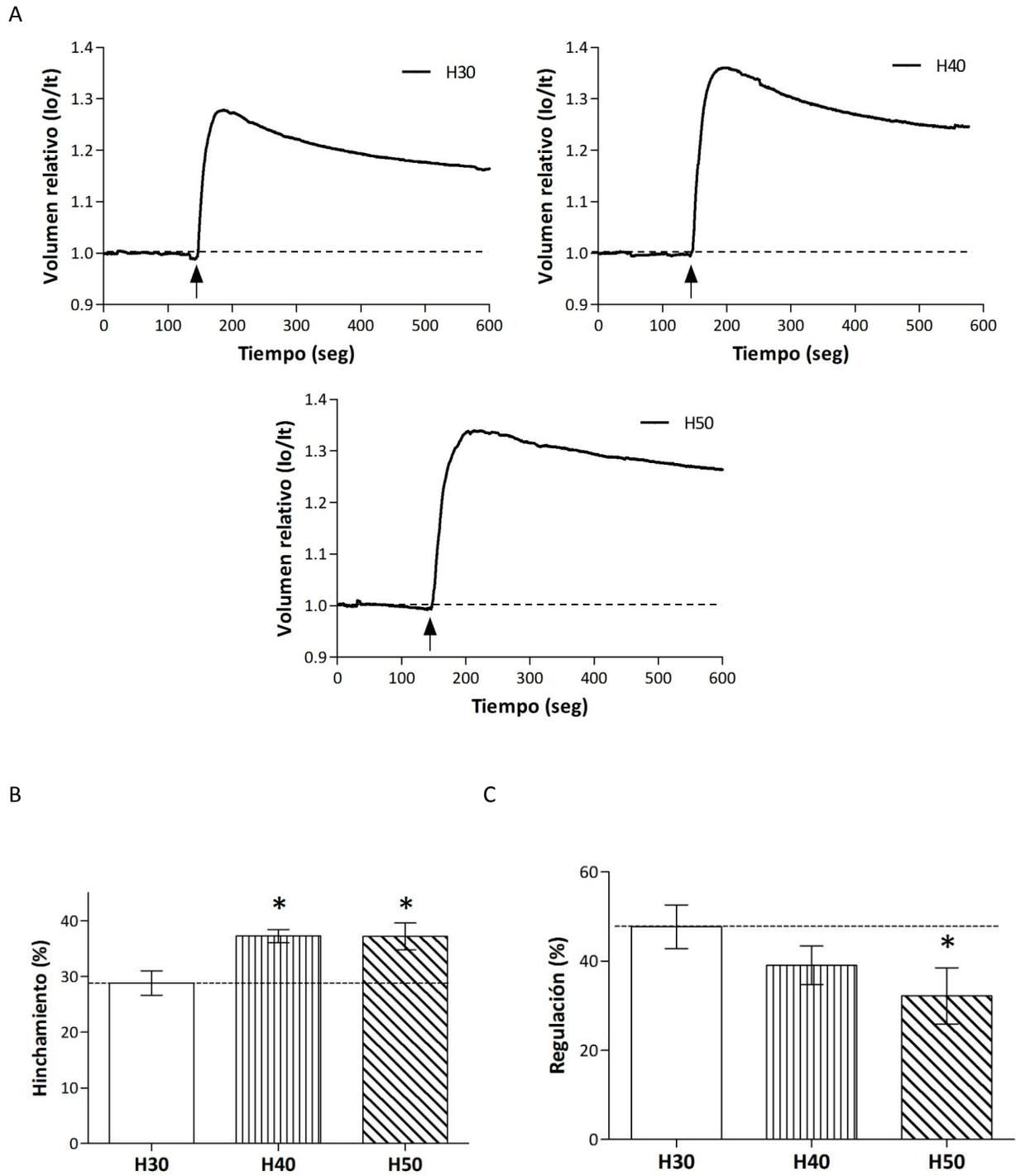


Figura 6.2. Hinchamiento y regulación del volumen de CPN embrionarias expuestas a hiposmolaridad. **A.** Trazos representativos de los cambios de volumen inducidos por hiposmolaridad al 30%, 40% y 50%. La flecha indica el momento en el cual se inicia el estímulo. **B.** Porcentaje de hinchamiento máximo alcanzado tras el estímulo. **C.** Porcentaje de regulación (alcanzado a los 600s) respecto al total de hinchamiento obtenido para cada condición. Los resultados se expresan como media \pm error estándar de 9-16 experimentos. Diferencias estadísticamente significativas con respecto a H30 * $P < 0.05$.

En las CPN adultas obtenidas de la ZSV se observó igualmente un incremento rápido en el volumen en respuesta al estímulo hiposmótico, seguido del proceso activo de regulación (**Figura 6.3 A**).

En promedio, las células se hincharon $12.0 \pm 0.8\%$, $13.3 \pm 1.3\%$ y $15.8 \pm 2.1\%$ con respecto a su volumen original en respuesta a una reducción en la osmolaridad de 30%, 40% y 50%, respectivamente (**Figura 6.3 B**). Por otra parte, las células alcanzaron un $40.3 \pm 3.6\%$, $43.6 \pm 3.8\%$ y $32.4 \pm 4.7\%$ de recuperación de volumen con respecto a su volumen original, respectivamente (**Figura 6.3 C**). Contrario a lo observado en células embrionarias, en las que se observó una relación inversa en la regulación de volumen con respecto a la magnitud del estímulo, en las células adultas esta proporción no fue evidente.

Estos resultados muestran que las CPN embrionarias y adultas, tienen la capacidad de regular activamente su volumen, aproximadamente con la misma eficiencia. Se pudo detectar una diferencia importante en la magnitud del hinchamiento: las CPN embrionarias tuvieron un incremento en volumen de 2 a 3 veces mayor que las adultas.

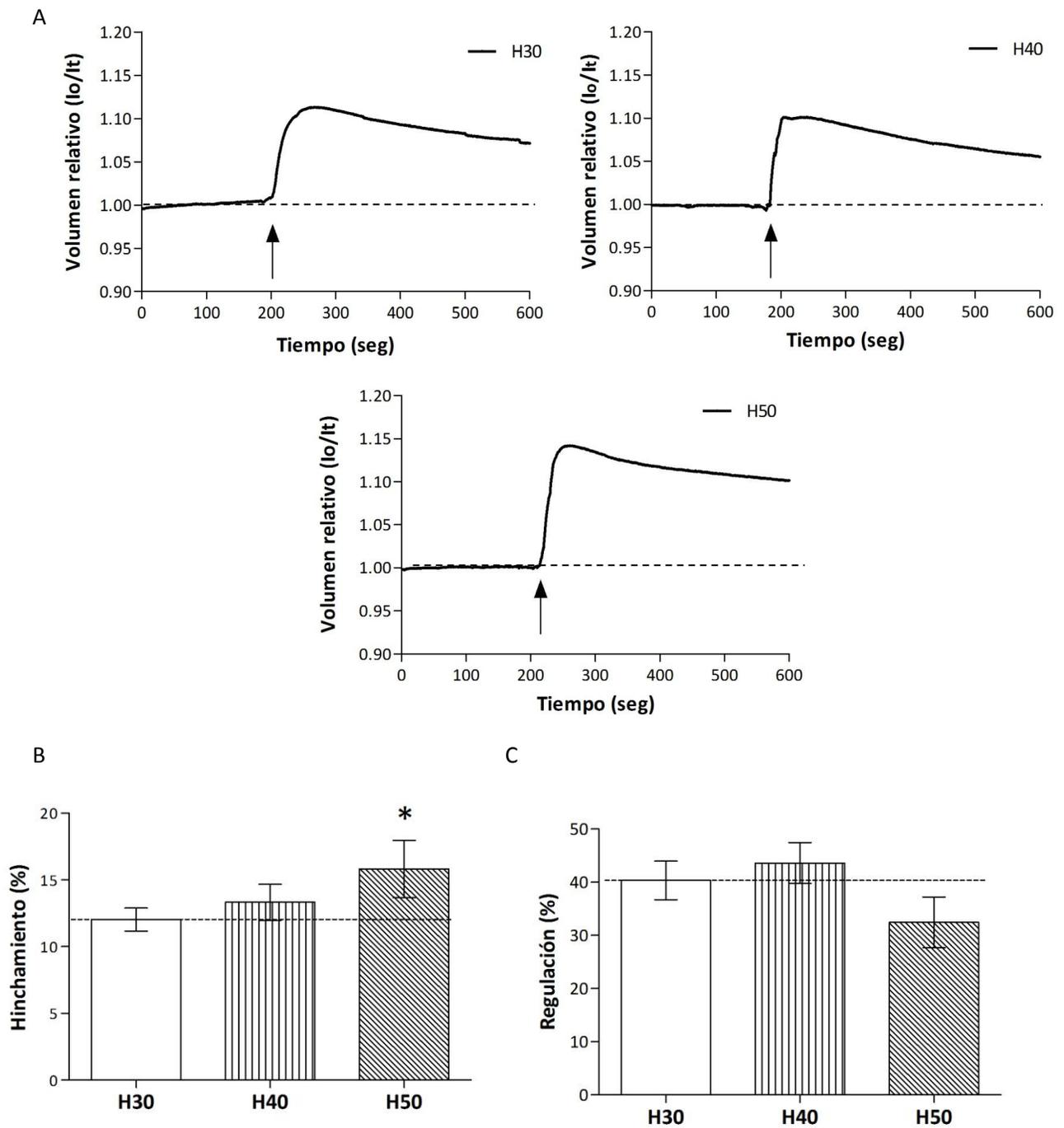


Figura 6.3. Hinchamiento y regulación del volumen de CPN adultas expuestas a hiposmolaridad. **A.** Trazos representativos de los cambios de volumen inducidos por hiposmolaridad al 30%, 40% y 50%. **B.** Porcentaje de hinchamiento máximo alcanzado tras el estímulo. **C.** Porcentaje de regulación (alcanzado a los 600s) respecto al total de hinchamiento obtenido para cada condición. Las barras representan la media \pm error estándar de 7-10 experimentos. Diferencias estadísticamente significativas con respecto a H30* $P < 0.05$.

6.2. Cuantificación de la concentración de aminoácidos en el tejido de origen de las CPN

Se estudió la concentración de los aminoácidos glutamato, glicina, taurina, alanina y GABA con función de osmolitos, en el mesencéfalo y la zona subventricular tras cuantificarse por HPLC de fase reversa. Se observó una diferencia sustancial en la concentración de los aminoácidos entre ambos tejidos, siendo notablemente mayor en el mesencéfalo que en la zona subventricular. En el mesencéfalo, la taurina fue el aminoácido que presentó mayor concentración, siendo de 417 $\mu\text{mol/g}$ proteína; le siguieron la alanina con 255 $\mu\text{mol/g}$ proteína, el glutamato con 196 $\mu\text{mol/g}$ proteína, la glicina con 106 $\mu\text{mol/g}$ proteína y de manera muy reducida, el GABA con 24 $\mu\text{mol/g}$ proteína. Con excepción del GABA, cuya concentración de 36 $\mu\text{mol/g}$ proteína es mayor en la ZSV que en el mesencéfalo embrionario, todos los otros aminoácidos se encuentran en niveles considerablemente más bajos que en el tejido adulto: la concentración de taurina y glutamato es sólo de 18 $\mu\text{mol/g}$ proteína, y la de glicina y alanina es aún menor, con 10 $\mu\text{mol/g}$ proteína y 5 $\mu\text{mol/g}$ proteína, respectivamente (**Tabla 6.4**).

Aminoácido	Mesencéfalo	Laterales ventriculares
	(μmol/g proteína)	
GLUT	196.7 ± 84.3	18.5 ± 2.8
GLY	106.7 ± 13.3	9.7 ± 0.7
TAURINA	417.2 ± 28.0	17.9 ± 4.2
ALA	255.0 ± 39.4	5.4 ± 1.1
GABA	24.9 ± 7.7	36.9 ± 6.2

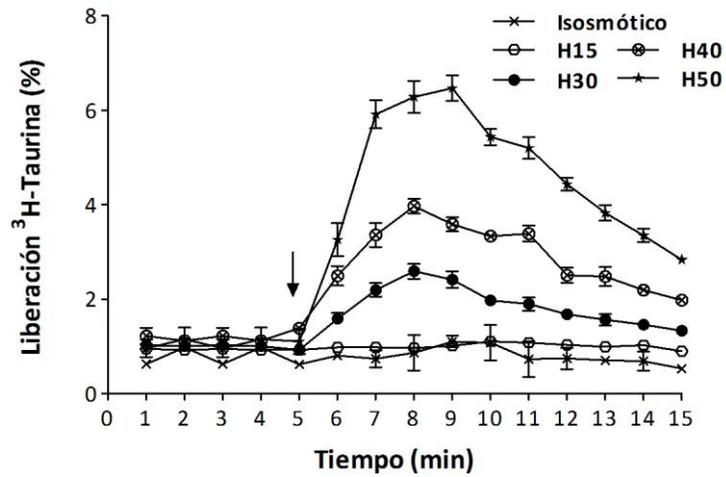
Tabla 6.4. Concentración de aminoácidos en el mesencéfalo de ratón en etapa embrionaria (13.5 d) y en los laterales ventriculares de ratón en etapa adulta (8 semanas) obtenidos por HPLC de fase reversa. Los resultados se expresan como la media \pm error estándar de 3 experimentos.

6.3. Movilización de osmolitos

6.3.1. Liberación de taurina

La movilización de taurina se siguió a través del trazador radioactivo ^3H -taurina. En las CPN embrionarias, la liberación en condiciones isosmóticas (basal) fue de $1\% \times \text{min}^{-1}$ respecto a la captura total. Al reemplazar la solución isosmótica por soluciones hiposmóticas al 30%, 40% y 50%, la liberación se incrementó significativamente alcanzando un valor máximo a los 3 ó 4 minutos después del estímulo. La magnitud de la liberación fue dependiente del decremento en la osmolaridad siendo de $2.6 \pm 0.1\%$, $3.9 \pm 0.1\%$ y $6.4 \pm 0.1\%$ en soluciones con 30%, 40% y 50% de reducción en osmolaridad, respectivamente. El estímulo hiposmótico de 15% no generó ningún incremento significativo sobre la liberación basal ($1.1 \pm 0.1\%$). Posterior al pico de liberación, ésta se redujo gradualmente sin llegar a alcanzar los valores basales. (**Figura 6.5 A**). En el tiempo total del experimento, se observó una liberación total de taurina (área bajo la curva) de 18.4%, 29.3% y 47%, en respuesta a decrementos en la osmolaridad de 30%, 40% y 50%, respectivamente. La liberación inducida por el medio 15% hiposmótico no incrementó significativamente sobre la liberación basal (**Figura 6.5 B**).

A



B

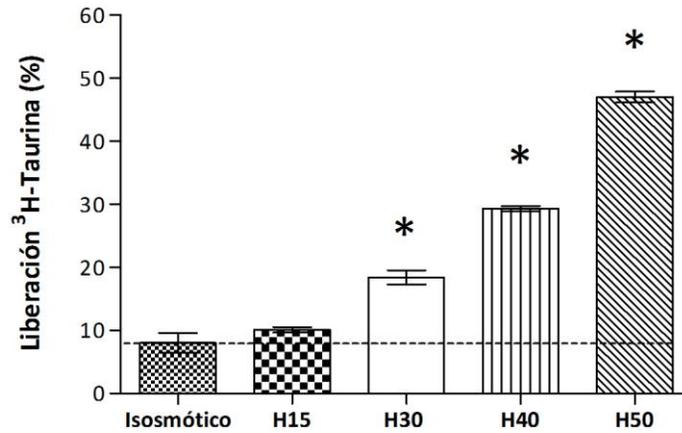
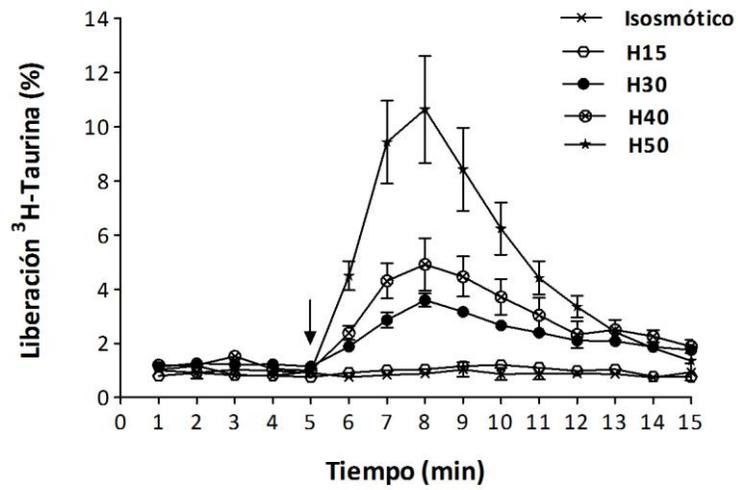


Figura 6.5. Liberación de ^3H -taurina de CPN embrionarias expuestas a hiposmolaridad. **A.** Seguimiento curso-temporal de liberación, en la cual cada punto representa el porcentaje de la radioactividad liberada por las células respecto a la captura total. La flecha señala el momento en el cual se inicia el estímulo hiposmótico. **B.** Las barras representan el porcentaje acumulado de la taurina liberada durante los 10 minutos de la condición de hiposmolaridad (6-15 min). Los resultados se expresan como media \pm error estándar de 8-11 experimentos. Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control * $P < 0.05$.

En las CPN adultas la liberación de taurina en condiciones isosmóticas CPN fue de $1\% \times \text{min}^{-1}$. El estímulo hiposmótico incrementó la movilización de taurina en forma dependiente de la osmolaridad. En el pico máximo, que se alcanzó a los 3 min, la movilización de taurina estimulada por hiposmolaridad al 15%, 30%, 40% y 50% fue de $1.2 \pm 0.1\%$, $3.6 \pm 0.2\%$, $4.9 \pm 0.9\%$ y $10.6 \pm 1.9\%$ respectivamente. Posteriormente, la liberación se redujo de manera gradual hasta casi alcanzar los valores iniciales (**Figura 6.6 A**). En el tiempo total del experimento (10 min) la liberación total de taurina de 10.0%; 24.4%; 30.5% y 58.7%, en respuesta a decrementos en la osmolaridad de 15%, 30%, 40% y 50%, respectivamente (**Figura 6.6 B**).

A



B

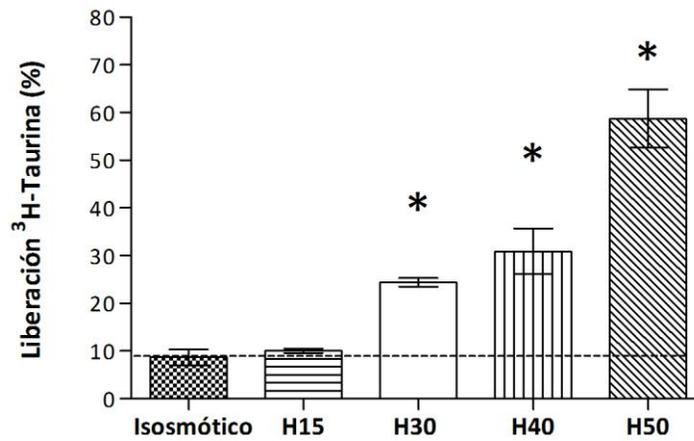
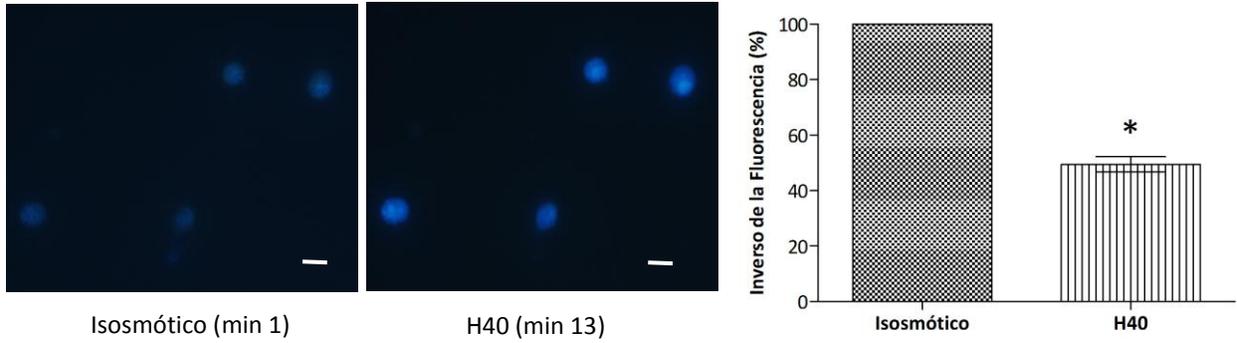


Figura 6.6. Liberación de ^3H -taurina de CPN adultas expuestas a hiposmolaridad. **A.** Seguimiento curso-temporal de liberación, en la cual cada punto representa el porcentaje de la radioactividad liberada por las células respecto a la captura total. La flecha señala el momento en el cual se inicia el estímulo hiposmótico. **B.** Las barras representan el porcentaje acumulado de la taurina liberada durante los 10 minutos de la condición de hiposmolaridad (6-15 min). Los resultados se expresan como media \pm error estándar de 4-13 experimentos. Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control * $P < 0.05$.

6.3.2. Reducción en la concentración de Cl^- intracelular ante la disminución de la osmolaridad externa.

Se estudió la movilización del Cl^- , el osmolito inorgánico más importante que utiliza la célula para el proceso de DRV. El Cl^- , así como otros aniones intracelulares, se pueden detectar cualitativamente por el efecto de amortiguación de fluorescencia que ejercen sobre numerosos fluoróforos. Al incubar las CPN con el fluoróforo DiI-MEQ, se observó una fluorescencia tenue basal que indica la presencia de una cantidad considerable de Cl^- al interior celular. Al reducir la osmolaridad en un 40%, se observaron incrementos en la intensidad de la fluorescencia que corresponden a reducciones en las concentraciones de Cl^- intracelular (**Figura 6.7 A**). El patrón curso-temporal de fluorescencia muestra claramente 3 etapas transitorias en la disminución de Cl^- intracelular. En la primera etapa, que comprende los primeros dos minutos posteriores al estímulo hiposmótico, se observa una disminución marcada en la concentración de Cl^- intracelular, reflejado por un valor de pendiente elevado ($m=-12.4$). La segunda etapa corresponde a los minutos 3 a 8, en la que se presenta una disminución gradual y más lenta de concentración de Cl^- intracelular respecto a la etapa inicial, con una pendiente de la recta 3 veces menor ($m=-4.8$). En la tercera etapa, que corresponden a los minutos 8 a 13, ya no se observan cambios en la concentración de Cl^- intracelular, pues el valor de la pendiente es muy cercano a cero ($m=0.22$) (**Figura 6.7 B**).

A



B

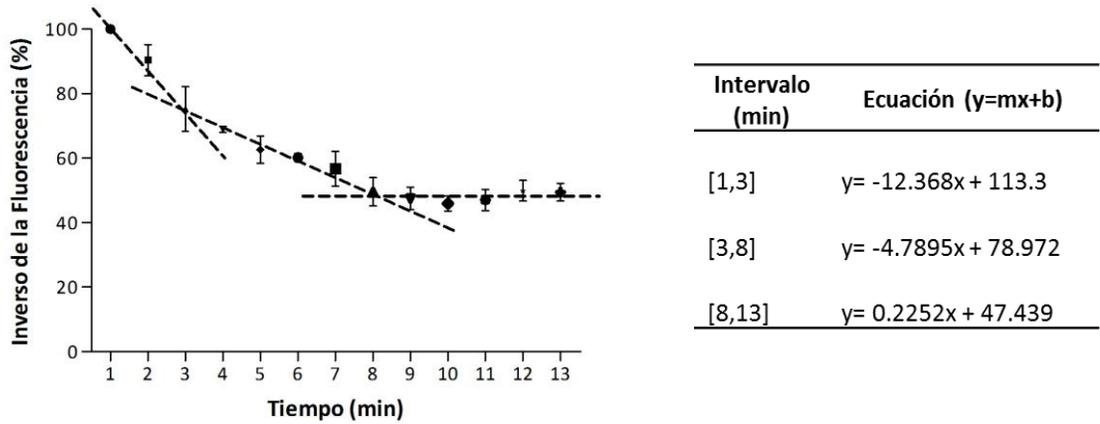


Figura 6.7. Liberación de Cl^- intracelular en CPN adultas expuestas a hiposmolaridad. **A.** Fotos representativas de la variación de la concentración de Cl^- intracelular, medida por la fluorescencia del compuesto DiH-MEQ, en respuesta a un estímulo hiposmótico (H40%). Las fotografías fueron capturadas con un objetivo 20x y un aumento 1.6x empleando un microscopio óptico de fluorescencia y luz UV (emisión 440 nm, excitación 344 nm). Barra de escala= 12 μm . **B.** Cambio curso-temporal de fluorescencia ante un estímulo hiposmótico (40%). Cada punto es el porcentaje del inverso de la fluorescencia con respecto al estado basal ($t_0=1$). Las rectas punteadas representan las 3 etapas transitorias en la disminución de Cl^- intracelular, cuyas pendientes se observan en la tabla. Los valores se representan como la media \pm error estándar de 3 experimentos. Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control * $P < 0.05$

6.4. Efecto de los inhibidores generales de canales de Cl^- sobre el DRV y la liberación osmosensible de taurina

Se investigó en CPN adultas el efecto de los agentes DIDS, SITS, NPPB y DICPIB en la regulación de volumen y la liberación de taurina evocados por una reducción del 30% en la osmolaridad del medio. En presencia de los agentes bloqueadores, las células mostraron en promedio, un incremento en volumen $24.3 \pm 3.5\%$ menor al observado en los controles sin el inhibidor (**Figura 6.8 B**). La regulación del volumen no se vio significativamente afectada por DIDS o SITS, los que redujeron el DRV en $1.8 \pm 0.7\%$ y $10.5 \pm 0.9\%$, respectivamente. En cambio, NPPB y DCPIB sí tuvieron un efecto inhibitor muy marcado del proceso regulador, que se redujo $64.7 \pm 0.9\%$ y $79.3 \pm 0.8\%$ respectivamente (**Figura 6.8 C**).

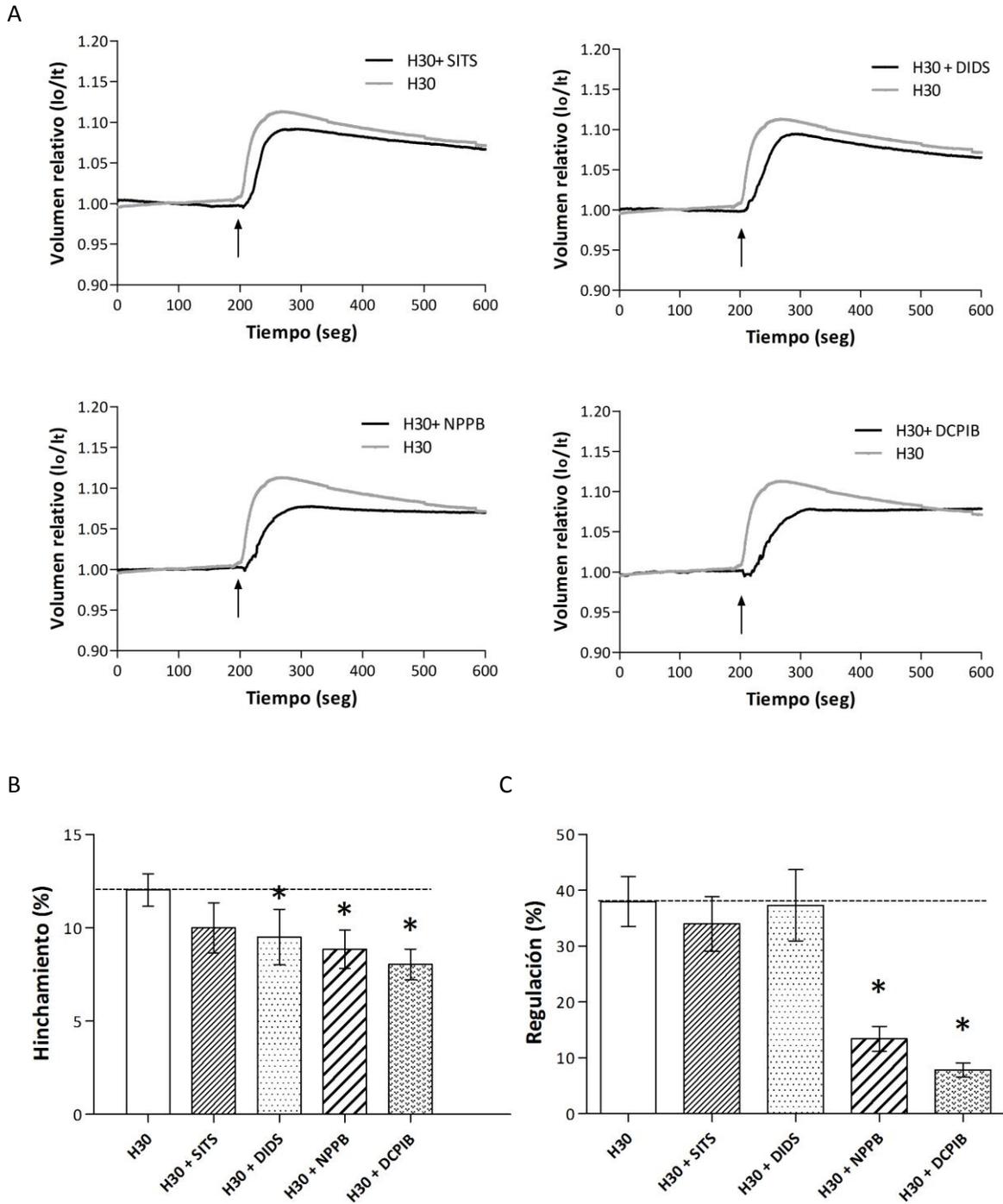
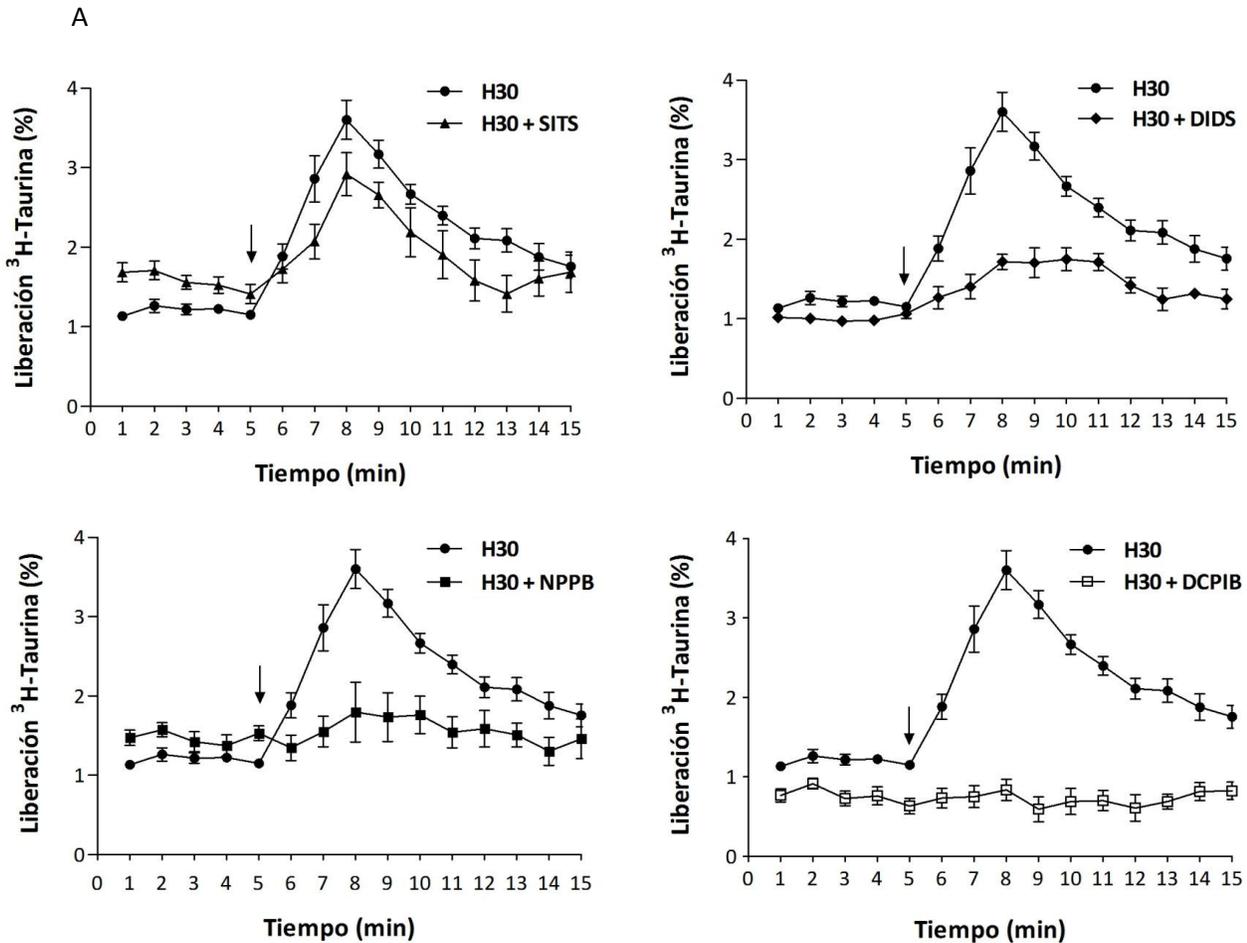


Figura 6.8. Hinchamiento y regulación de CPN adultas expuestas a bloqueadores de canales aniónicos. **A.** Trazos representativos de los cambios de volumen inducidos por un estímulo hiposmótico (30%) \pm inhibidores SITS (100 μ M), DIDS (100 μ M), NPPB (50 μ M) o DCPIB (10 μ M). **B.** Porcentaje de hinchamiento máximo alcanzado tras el estímulo. **C.** Porcentaje de regulación (alcanzado a los 600s) respecto al total de hinchamiento obtenido para cada condición. Los resultados se expresan como media \pm error estándar de 6-11 experimentos. Diferencias estadísticamente significativas con respecto a H30* $P < 0.05$.

En relación con la liberación de taurina, se empleó una reducción en la osmolaridad del 30% para la evaluación, pues ésta es suficiente para inducir una movilización de taurina reproducible y de magnitud apreciable. La **Figura 6.9** muestra el efecto de los bloqueadores DIDS, SITS, NPPB y DCPIB. El NPPB redujo la liberación de taurina en un $36.8 \pm 1.8\%$, similar a la reducción por DIDS de $40.76 \pm 0.9\%$. DCPIB fue el inhibidor más potente, disminuyendo la liberación hasta $69.93 \pm 1.0\%$. El SITS mostró el menor efecto reduciendo en $22.9 \pm 1.9\%$ la liberación de taurina (**Figura 6.9 B**).

El efecto de los bloqueadores de canales de Cl^- sobre el decremento en Cl^- intracelular no pudo ser medido, debido a que los fármacos inhibidores tienen *per se* un nivel de fluorescencia de fondo que impide detectar los cambios relacionados con la concentración de Cl^- .



B

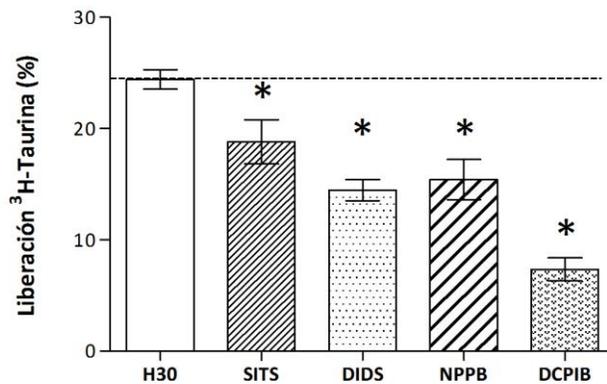


Figura 6.9. Liberación de ³H-taurina de CPN adultas expuestas a bloqueadores de canales aniónicos. **A.** Seguimiento curso-temporal de liberación ante los bloqueadores SITS (100 μ M), DIDS (100 μ M), NPPB (50 μ M) y DCPIB (10 μ M); cada punto representa un porcentaje de la radioactividad liberada por las células respecto a la captura total. La flecha señala el momento en el cual se inicia el estímulo hiposmótico (30%) \pm inhibidores. **B.** Las barras representan el porcentaje acumulado de la taurina liberada durante los 10 minutos de la condición de hiposmolaridad (6-15 min). Los resultados se expresan como media \pm error estándar de 5-12 experimentos. Diferencias estadísticamente significativas con respecto a H30* P<0.05.

7. DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio mostraron que las CPN tienen la capacidad de regulación de su volumen celular al ser expuestas a un estímulo hiposmótico. Esta es una propiedad fundamental de las células animales, presente en casi todos los tipos celulares y conservada evolutivamente, aunque ésta es la primera investigación que se realiza sobre la respuesta a cambios en el volumen y su adaptación en CPN. El estudio de los cambios en el volumen celular ha adquirido mayor relevancia luego de que en la última década se ha demostrado su participación en una serie de procesos celulares de la mayor importancia tales como proliferación, diferenciación, apoptosis y migración celular (Dubois y Rouzair-Dubois, 2004; Lambert *et al.*, 2008; Lang *et al.*, 2008). Por otra parte, el DRV es un proceso activo, subsecuente al hinchamiento originado por un estímulo hiposmótico, en donde se liberan osmolitos como K^+ , Cl^- y moléculas orgánicas como los aminoácidos, que a su vez pueden incidir en otras funciones celulares (Pasantés-Morales *et al.*, 2002a).

En el presente estudio se realizó la caracterización del DRV en CPN obtenidas de ratón en etapa embrionaria y adulta. Los resultados mostraron algunas variaciones entre ambas etapas. Una primera diferencia notable fue que las CPN embrionarias mostraron un hinchamiento 2.5 veces mayor que las adultas. A pesar de ello, aún las CPN embrionarias mostraron un hinchamiento considerablemente menor al registrado en condiciones hiposmóticas en comparación con otras células cerebrales. Estudios previos en neuronas granulares cerebelares (Morán *et al.*, 1997; Morales-Mulia *et al.*, 2001; Pasantes-Morales *et al.*, 1993), cultivos de neuronas corticales (Inoue *et al.*, 2005), astrocitos (Cardin *et al.*, 1999; Sánchez-Olea *et al.*, 1993) y de células de glioma y neuroblastomas (Altamirano *et al.*, 1998; Lohr y Yohe, 1994; Loveday *et al.*, 2003; O'Reilly *et al.*, 2002), muestran consistentemente el incremento en el volumen celular ante condiciones hipotónicas, con valores máximos de hinchamiento del 70 a 80% ante reducciones de la osmolaridad externa, aunque se observan variaciones en la magnitud de este incremento. Los astrocitos corticales son las especies celulares cerebrales que muestran un mayor aumento en el volumen en condiciones hipotónicas (80%) (Cardin *et al.*, 1999). La razón de estas diferencias no se ha estudiado con detalle, pero es posible que intervengan factores como la rigidez del citoesqueleto, la expresión de acuaporinas o las tasas

de eficiencia del DRV (Kimelberg *et al.*, 2006). Una o varias de estas propiedades podrían explicar también la diferencia encontrada en las CPN embrionarias y las adultas.

La membrana celular es muy permeable al agua. Durante mucho tiempo se consideró que el agua permeaba por difusión a través de la bicapa lipídica, pero ahora se sabe que una proporción alta de los flujos de agua ocurre a través de las acuaporinas, que son canales a través de los cuales el agua se mueve siguiendo su gradiente de concentración. Por tanto, al modificarse la concentración de agua en función de un cambio en los niveles de solutos, el agua se desplazará en la dirección necesaria para restablecer el equilibrio osmótico. Generalmente se ha asociado el hinchamiento celular con la entrada de agua osmóticamente activa al interior celular por medio de acuaporinas (Pasantés-Morales y Cruz-Rangel, 2010). En CPN adultas de ratones y humanos se ha reportado la presencia de la AQP4, mientras que en las CPN embrionarias no se encuentran expresadas la AQP4 ni la AQP9 (Cavazzin *et al.*, 2006; Wen *et al.*, 1999). Aunque estos datos sugerirían un mayor hinchamiento celular en las CPN adultas que en las embrionarias, en nuestro estudio encontramos un fenómeno opuesto, razón por la cual no es posible correlacionar en forma directa a las acuaporinas con el porcentaje de hinchamiento celular. Podría hacerse la consideración de que en el tejido en condiciones *in vivo*, las CPN adultas se encuentran en un espacio reducido de la ZSV, lo que podría restringir su hinchamiento. Por otra parte, puede también existir una diferencia en el potencial del agua en las células embrionarias, pues la concentración de solutos permeables e impermeables en el tejido de mesencéfalo es mayor que en el tejido de la zona subventricular.

El proceso de respuesta activa al incremento en volumen (DRV), se encontró presente tanto en las CPN embrionarias como en las adultas, con una eficiencia similar en los dos tipos celulares. Sin embargo, las CPN presentaron una capacidad de regulación inferior a la registrada en un lapso de tiempo similar (10 minutos), en astrocitos (60-80%) y neuronas (50%) (Cardin *et al.*, 1999; Sánchez-Olea *et al.*, 1993; Pasantés-Morales *et al.*, 1993).

Tanto en las CPN de origen embrionario como de adulto, el proceso regulador de volumen fue sensible a la acción de los bloqueadores de canales de Cl⁻, NPPB, DCPIB, DIDS y SITS. Aunque todos ellos mostraron un cierto grado de inhibición, el más potente fue el DCPIB que redujo casi 80% la regulación del volumen y el de menor capacidad inhibidora fue el DIDS.

Esta sensibilidad del DRV a los bloqueadores de los canales de Cl^- ha sido una observación consistente en prácticamente todos los tipos celulares, incluyendo células nerviosas, aunque se han observado variaciones entre los distintos tipos celulares. Como se mencionó en la Introducción, el Cl^- , junto con el K^+ y los osmolitos orgánicos son los responsables del proceso activo de regulación del volumen. Desde hace tiempo se conoce que además de los flujos de Cl^- , también los de osmolitos orgánicos son sensibles a los bloqueadores de canales de Cl^- y por ello, estos agentes tienen un efecto importante sobre el DRV (Pasantes-Morales *et al.*, 2006).

En el presente estudio se confirmó que en respuesta a un estímulo hiposmótico, las CPN activan flujos de Cl^- , ya que su concentración intracelular disminuye significativamente. Se empleó una técnica fluorométrica que mide cualitativamente las concentraciones de Cl^- intracelular, lo que refleja indirectamente la activación de los flujos de Cl^- . Con esta técnica, sin embargo, no es posible evaluar los efectos de los bloqueadores de canales de Cl^- , ya que interfieren con la técnica fluorométrica empleada.

Para caracterizar la movilización de los osmolitos orgánicos, en este trabajo se empleó la taurina como osmolito representativo pues, como se describió con detalle en la Introducción, se ha reportado que es la molécula más sensible a la perturbación osmótica, tiene el umbral más bajo de estímulo requerido para mostrar un efecto y es la que se libera en mayor cantidad en el cerebro. Estas características, aunadas al hecho de que es metabólicamente inerte y se encuentra presente en altas concentraciones intracelulares, la hacen particularmente adecuada para el estudio de los mecanismos del DRV (Pasantes-Morales, 2007).

Al comparar a las CPN embrionarias con las adultas en relación con la liberación osmosensible de taurina, se encontró que presentaron un curso temporal distinto, aunque el porcentaje de liberación de la taurina radioactiva fue similar en las de origen embrionario y en las de adulto. Sin embargo, hay que tomar en cuenta la gran diferencia que existe en la concentración de taurina en los tejidos cerebrales de los que se obtienen las CPN: mientras que el mesencéfalo presenta una concentración de casi 350 $\mu\text{moles/g}$ de proteína, la ZSV tiene una concentración de solo 14.5 $\mu\text{moles/g}$ de proteína. Los flujos de taurina se siguieron a través de un trazador radioactivo, que va a distribuirse de manera homogénea en la poza endógena que es en su gran mayoría citosólica, por lo que haciendo la consideración de que la magnitud y las

características de los flujos de taurina serían similares a las condiciones *in vivo*, la cantidad de taurina movilizada en las células embrionarias sería casi 20 veces mayor que la de las células adultas. Esta circunstancia puede estar relacionada con el requerimiento bien documentado, de mayores concentraciones de taurina para un óptimo desarrollo cerebral (Huxtable, 1992).

Al hacer una comparación de la magnitud de la movilización osmosensible de taurina en otras células cerebrales, se advierte que en una condición de osmolaridad similar (reducción del 30%) las CPN tanto embrionarias como adultas, muestran un porcentaje de liberación de taurina similar al registrado en astrocitos cerebelares (Cruz-Rangel *et al.*, 2008) y neuronas granulares cerebelares (Morales-Mulia *et al.*, 2001) pero moderadamente mayor al de células de neuroblastoma ((Cheema *et al.*, 2007). Sin embargo, las mismas consideraciones del párrafo anterior en relación con los niveles de taurina en cada tipo celular y su seguimiento a través de un trazador radioactivo, se aplicarían a esta comparación, por lo que los astrocitos, con una concentración de taurina de aproximadamente 30 mM (Sánchez-Olea *et al.*, 1991) serían entonces las células que liberan más taurina de su poza endógena (Pasantés-Morales *et al.*, 1993). Existen otros estudios en células cerebrales, astrocitos y neuronas, en los que se mide la liberación de taurina ante estímulos hiposmóticos de 50% (Pasantés-Morales *et al.*, 1993; Hussy *et al.*, 2000; Pasantés-Morales y Schousboe, 1989). Sin embargo, estos decrementos en la osmolaridad son demasiado drásticos y poco comparables con cambios en el volumen que pudieran observarse aún en condiciones patológicas (Ordaz *et al.*, 2004).

La taurina es un osmolito importante en el tejido nervioso, pero no es el único. Otros osmolitos orgánicos incluyendo el glutamato, el GABA, y la glicina, polialcoholes como el mio-inositol y el sorbitol y aminos como la creatinina, participan también activamente en el proceso de regulación del volumen (Lang *et al.*, 1998). Hasta ahora no hay investigaciones sobre la movilización hiposmótica de otros osmolitos en las CPN, siendo éste el primer estudio realizado acerca de la regulación del volumen en estas células.

La naturaleza de las rutas de liberación de los osmolitos orgánicos activada por hiposmolaridad no se conoce a nivel molecular y aún quedan muchos aspectos sin aclarar en relación con sus propiedades funcionales. De hecho, no se sabe todavía si todos los osmolitos, orgánicos tienen una vía común de movilización, lo cual es muy poco probable debido a sus

grandes diferencias estructurales (Pasantés-Morales *et al.*, 2002a). Lo que sí está bien documentado es que la liberación de todos los osmolitos orgánicos es sensible a los bloqueadores de canales de Cl^- activados por volumen. Esta situación también ocurre en las CPN adultas, como mostramos en el presente estudio, en el que se observó un efecto inhibitor de algunos bloqueadores de canales de Cl^- en la liberación de taurina. En general, hay una correlación entre el efecto de los inhibidores NPPB y DCPIB en la liberación de taurina y la eficiencia del DRV. Esta correlación no se observó para el DIDS, ya que no mostró un efecto inhibitor del DRV, en tanto que inhibió significativamente la salida de taurina. En otros tipos de células cerebrales el DIDS tiene también un efecto variable, ya sea mostrando una capacidad alta de inhibición de la liberación de taurina como en las células de neuroblastoma (O'Reilly *et al.*, 2002) o un efecto menor en otros tipos celulares, como los astrocitos y neuronas (Sánchez-Olea *et al.*, 1993; Sánchez-Olea *et al.*, 1996). Parte de la dificultad en el uso de estos inhibidores es que son muy poco selectivos, al inhibir diversas vías de transporte aniónico. Se ha reportado que NPPB bloquea canales de Cl^- y Ca^{2+} activados por voltaje, el cotransportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ y el intercambiador aniónico $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (Kirkup *et al.*, 1995); DCPIB es un inhibidor selectivo de VRAC y su efecto es reversible e independiente de voltaje (Decher *et al.*, 2001); DIDS es un inhibidor reversible no específico de proteínas de transporte de Cl^- (CLC), del intercambiador aniónico $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, VRAC y $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPasa}$ (Matulef *et al.*, 2008), mientras que SITS es un inhibidor específico del intercambiador aniónico $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ y también de la $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPasa}$ (Pedemonte *et al.*, 1992).

La evidencia que muestra que las vías de movilización de los osmolitos orgánicos son sensibles a bloqueadores de canales de Cl^- ha dado pie a que se considere la posibilidad de una sola vía, común para todos los osmolitos, incluyendo el Cl^- . Incluso se ha hablado de un solo canal, al que se ha llamado "volume-sensitive osmolyte anion channel" (VSOAC). Entre las objeciones a esta propuesta se encuentran las diferencias en la estructura de moléculas como los aminoácidos, los polialcoholes y las aminas, haciéndola poco probable. Las similitudes farmacológicas que muestran las distintas vías podrían explicarse ya sea invocando a la vía aniónica común, con todas las objeciones antes mencionadas, o bien a una interacción muy estrecha entre las diversas vías, ya sea por una modulación recíproca o bien, porque estén actuando sobre un sensor, señal o mecanismo de transducción común (Sánchez-Olea *et al.*,

1996; Shennan, 2008). El principal problema para discernir entre estas posibilidades es que no se conoce la identidad molecular ni del canal de Cl^- osmosensible ni de las vías de permeación de los osmolitos orgánicos.

En conjunto, los resultados obtenidos en este trabajo muestran que las CPN presentan un mecanismo de DRV de eficiencia moderada, similar en las CPN embrionarias y las adultas, y que en los dos casos hay una respuesta de movilización de Cl^- y de taurina. La movilización de taurina muestra las características típicas de la vía difusional a través de la cuál permea este osmolito en las células cerebrales. La liberación de taurina, tomando en cuenta la naturaleza del método de trazador radioactivo usado en este estudio y discutido en párrafos anteriores, parece ser notablemente más importante en las células embrionarias que en las adultas. El disponer de una mayor liberación de taurina en las células embrionarias puede ser necesario para tener una eficiencia en el DRV al menos igual que en las células adultas, considerando el hecho de que en general, en células troncales fetales la mayor parte de los genes de canales de Cl^- , K^+ y Ca^{2+} no se expresan en niveles detectables (Cai *et al.*, 2004). Al analizar estos resultados desde un contexto ambiental, las CPN embrionarias durante el desarrollo se encuentran en un ambiente extra e intracelular en constante cambio, que puede implicar cambios osmóticos así sean locales y transitorios. Por esta razón, una mayor eficiencia en la regulación del volumen es importante para modular adecuadamente diversos procesos celulares como la proliferación y migración. La regulación del volumen celular en CPN adultas también se ha propuesto crítica para la proliferación celular, pues se ha observado que la exposición a ambientes hipertónicos puede inhibir la formación de neuroesferas (Yasuda *et al.*, 2008).

La movilización de taurina en respuesta al incremento en volumen, observada y caracterizada en el presente trabajo, puede también estar relacionada con una mayor proliferación de las CPN. En estudios recientes se ha demostrado que la presencia de taurina en el cultivo tiene un efecto significativo incrementando la proliferación celular (Hernández-Benítez *et al.*, 2010b). Este hallazgo es importante ya que en etapas embrionarias, la proliferación es un proceso crucial para el desarrollo óptimo del cerebro, y de hecho como se ha mencionado en este trabajo, el cerebro fetal tiene un importante requerimiento de taurina. Por tanto, es posible suponer que el incremento en el volumen en las células en desarrollo, junto con el consiguiente aumento en la movilización de taurina, esté teniendo un papel importante

asegurando la tasa de proliferación óptima para el desarrollo del cerebro. En cuanto a las células adultas, se ha encontrado que un factor que desencadena la proliferación de las CPN en el cerebro adulto es la presencia de condiciones patológicas agudas como la epilepsia o los accidentes cerebrovasculares (Okano y Sawamoto, 2008; Yoneyama *et al.*, 2011). Se considera ésta una respuesta al daño inducido por las patologías y como un mecanismo de reparación del daño cerebral. Coincidentemente, en estas patologías hay siempre un incremento en el volumen celular con la consiguiente liberación de taurina (Pasantés-Morales y Tuz, 2006). Esta serie de procesos culminaría con un incremento en la proliferación de las CPN adultas y la facilitación del proceso de reparación del daño cerebral.

8. CONCLUSIONES

Los resultados presentados en este trabajo indican que:

- La concentración de aminoácidos con función de osmolitos es considerablemente mayor en el tejido de mesencéfalo de ratones embrionarios que en la zona subventricular de ratones adultos.
- Las CPN cultivadas en forma de neuroesferas presentan un mecanismo de DRV de eficiencia moderada, similar en las CPN embrionarias y las adultas
- En las CPN hay una respuesta de movilización de Cl^- y de taurina ante hiposmolaridad.
- La movilización de taurina muestra las características típicas de la vía difusional a través de la cual permea este osmolito en las células cerebrales y parece ser notablemente más importante en las células embrionarias que en las adultas.
- En las CPN, tanto el DRV como la liberación, son sensibles al efecto inhibitor de los bloqueadores de canales de Cl^- , NPPB y DCPIB.

9. PERSPECTIVAS

En las CPN, la eficiencia en la regulación del volumen es importante para modular procesos celulares como la proliferación, en la cual, la movilización de taurina en respuesta al incremento en volumen puede también estar relacionada, sobre todo, durante el desarrollo.

- Es necesario realizar más estudios donde se evalúe la contribución de otros osmolitos en el proceso de regulación del volumen en las CPN.
- Evaluar el proceso de regulación del volumen en las CPN ante diversas condiciones de edema cerebral como la hiposmolaridad y la isquemia química
- Evaluar la participación de otros factores como:
 - 1) la activación de receptores acoplados a proteínas G en la liberación de osmolitos dependiente de volumen,
 - 2) el papel del citoesqueleto en la regulación de volumen,
 - 3) los canales de cloro que se encuentran expresados en este tipo celular, a fin de identificar las posibles vías por las cuales se movilizan los osmolitos activados por volumen.
- La clarificación de los mecanismos de regulación del volumen en CPN, contribuirá sin duda en el entendimiento de funciones críticas en este tipo celular como: proliferación, migración, diferenciación y muerte celular.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Agre P. 2006. Review: The aquaporin water channels. *Proc Am Thorac Soc.* **3**(1):5-13.
- Ahmed S. 2009. The culture of neural stem cells. *J Cell Biochem.* **106**(1):1-6.
- Altamirano J, Brodwick MS, Alvarez-Leefmans FJ. 1998. Regulatory volume decrease and intracellular Ca²⁺ in murine neuroblastoma cells studied with fluorescent probes. *J Gen Physiol.* **122**(2): 145-60.
- Álvarez FJ y Reuss L. 1996. Operación orquestada de los sistemas de transporte a través de la membrana plasmática: regulación y mantenimiento del volumen celular. En: Biofísica y fisiología celular. Capítulo 7. Ramón Latorre. Serie ciencias. No. 49. Universidad de Sevilla. España. 708 pp.
- Andrew RD, Fagan M, Ballyk BA, Rosen AS. 1989. Seizure susceptibility and the osmotic state. *Brain Res.* **498**(1): 175-80.
- Baizabal JM, Furlan-Magaril M, Santa-Olalla J, Covarrubias L. 2003. Neural stem cells in development and regenerative disease. *Arch Med Res.* **34**(6): 572-88.
- Brand A, Leibfritz D, Hamprecht B, Dringen R. 1998. Metabolism of cysteine in astroglial cells: synthesis of hypotaurine and taurine. *J Neurochem.* **71**(2): 827-32.
- Cai J, Cheng A, Luo Y, Lu C, Mattson MP, Rao MS, Furukawa K. 2004. Membrane properties of rat embryonic multipotent neural stem cells. *J Neurochem.* **88**(1):212-26.
- Camacho A y Massieu L. 2006. Role of glutamate transporters in the clearance and release of glutamate during ischemia and its relation to neuronal death. *Arch Med Res.* **37**(1): 11-18.
- Cardin V, Peña-Segura C, Pasantes-Morales H. 1999. Activation and inactivation of taurine efflux in hyposmotic and isosmotic swelling in cortical astrocytes: role of ionic strength and cell volume decrease. *J Neurosci Res.* **56**(6): 659-67.
- Cavazzin C, Ferrari D, Facchetti F, Russignan A, Vescovi AL, La Porta CA, Gritti A. 2006. Unique expression and localization of aquaporin-4 and aquaporin-9 in murine and human neural stem cells and their glial progeny. *Glia.* **53**(2): 167-81.
- Chamberlin ME y Strange K. 1989. Anisosmotic volume regulation: a comparative view. *Am J Physiol Cell Physiol.* **257**(2 Pt 1): C159-73.
- Cheema TA, Pettigrew VA, Fisher SK. 2007. Receptor regulation of the volume-sensitive efflux of taurine and iodide from human SH-SY5Y neuroblastoma cells: differential requirements for Ca²⁺ and protein kinase C. *J Pharm Exp Ther.* **320**(3): 1068-77.
- Chen XC, Pan ZL, Liu DS, Han X. 1998. Effect of taurine on human fetal neuron cells: proliferation and differentiation. *Adv Exp Med Biol.* **442**: 397-403.
- Chojnacki A y Weiss S. 2008. Production of neurons, astrocytes and oligodendrocytes from mammalian CNS stem cells. *Nat Protoc.* **3**(6): 935-40.

- Conti L y Cattaneo E. 2005. Review: Controlling neural stem cell division within the adult subventricular zone: an APPEaling job. *Trends Neurosci.* **28**(2): 57-9.
- Cruz Rangel S, Hernández-Benítez R, Vázquez-Juárez E, López-Dominguez A, Pasantes-Morales H. 2008. Potentiation by thrombin of hyposmotic glutamate and taurine efflux from cultured astrocytes: signalling chains. *Neurochem Res.* **33**(8):1518-24.
- Decher N, Lang HJ, Nilius B, Brüggemann A, Busch AE, Steinmeyer K. 2001. DCPIB is a novel selective blocker of I(Cl,swell) and prevents swelling-induced shortening of guinea-pig atrial action potential duration. *Br J Pharmacol.* **134**(7): 1467-79.
- Dietrich J y Easterday MC. 2002. Developing concepts in neural stem cells. *Trends Neurosci.* **25**(3): 129-31.
- Dominy J, Eller S, Dawson R Jr. 2004. Building biosynthetic schools: reviewing compartmentation of CNS taurine synthesis. *Neurochem Res.* **29**(1): 97-103.
- Dubois JM y Rouzaire-Dubois B. 2004. Review: The influence of cell volume changes on tumour cell proliferation. *Eur Biophys J.* **33**(3): 227-32.
- El Drissi A y Trenkner E. 1999. Growth factors and taurine protect against excitotoxicity by stabilizing calcium homeostasis and energy metabolism. *J Neurosci.* **19**(21): 9459-68.
- Gaull GE. 1989. Taurine in pediatric nutrition: review and update. *Pediatrics.* **83**(3): 433-42.
- Guizouarn H, Motais R, Garcia-Romeu F y Borgese F. 2000. Cell volume regulation: the role of taurine loss in maintaining membrane potential and cell pH. *J Physiol.* **523**(Pt 1): 147-54.
- Han X, Patters AB, Jones DP, Zelikovic I, Chesney RW. 2006. Review: The taurine transporter: mechanisms of regulation. *Acta Physiol.* **187**(1-2):61-73.
- Hayes KC, Carey RE, Schmidt SY. 1975. Retinal degeneration associated with taurine deficiency in the cat. *Science.* **188**(4191): 949-51.
- Hernández-Benítez R, Pasantes-Morales H, Pinzón-Estrada E, Ramos-Mandujano G. 2010a. Functional expression and subcellular localization of the taurine transporter TauT in murine neural precursors. *Dev Neurosci.* **32**(4): 321-28.
- Hernández-Benítez R, Pasantes-Morales H, Saldaña IT, Ramos-Mandujano G. 2010b. Taurine stimulates proliferation of mice embryonic cultured neural progenitor cells. *J Neurosci Res.* **88**(8):1673-81.
- Hussy N, Deleuze C, Desarménien MG, Moos FC. 2000. Review: Osmotic regulation of neuronal activity: a new role for taurine and glial cells in a hypothalamic neuroendocrine structure. *Prog Neurobiol.* **62**(2): 113-34.
- Huxtable RJ. 1992. Physiological actions of taurine. *Physiol Rev.* **72**(1):101-63.

- Huxtable RJ. 2000. Expanding the circle 1975-1999: sulfur biochemistry and insights on the biological functions of taurine. *Adv Exp Med Biol.* **483**(1):1-25.
- Inoue H, Mori S, Morishima S, Okada Y. 2005. Volume-sensitive chloride channels in mouse cortical neurons: characterization and role in volume regulation. *Eur J Neurosci.* **21**(6): 1648-58.
- Ip, NY. 1998. The neurotrophins and neurotrophic cytokines: two families of growth factors acting on neural and hematopoietic cells. *Ann NY Acad Sci.* **840**(1): 97-106.
- Jacobsen JG, Smith LH. 1968. Biochemistry and physiology of taurine and taurine derivatives. *Physiol Rev.* **48**(2):424-511.
- Jin NG, Kim JK, Yang DK, Cho SJ, Kim JM, Koh EJ, Jung HC, So I, Kim KW. 2003. Fundamental role of CIC-3 in volume-sensitive Cl⁻ channel function and cell volume regulation in AGS cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* **285**(5): G938-48.
- Kaya K y Sano T. 1991. Definition of total biosynthesis pathway of taurolipids in Tetrahymena cells. *Biochim Biophys Acta.* **1084**(1):101-4.
- Kimelberg HK, Macvicar BA, Sontheimer H. 2006. Anion channels in astrocytes: biophysics, pharmacology, and function. *Glia.* **54**(7): 747-57.
- Kirkup AJ, Edwards G, Weston AH. 1995. Investigation of the effects of 5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)-benzoic acid (NPPB) on membrane currents in rat portal vein. *Brit J Pharm.* **117**(1): 175-183.
- Krapivinsky GB, Ackerman MJ, Gordon EA, Krapivinsky LD, Clapham DE. 1994. Molecular characterization of a swelling-induced chloride conductance regulatory protein, pICln. *Cell.* **76**(3): 439-48.
- Lambert IH y Hoffmann EK. 1994. Cell swelling activates separate taurine and chloride channels in Ehrlich mouse ascites tumor cells. *J Membr Biol.* **142**(3): 289-98.
- Lambert IH. 2004. Regulation of the cellular content of the organic osmolyte taurine in mammalian cells. *Neurochem Res.* **29**(1): 27-63.
- Lambert IH, Hoffmann EK, Pedersen SF. 2008. Review: Cell volume regulation: physiology and pathophysiology. *Acta Physiol.* **194**(4): 255-82.
- Lang F, Busch GL, Ritter M, Völkl H, Waldegger S, Gulbins E, Häussinger D. 1998. Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol Rev.* **78**(1):247-306.
- Lang F. 2007. Mechanisms and significance of cell volume regulation. *J Am Col Nutr.* **26**(5): 613S-23S.
- Lang F, Gulbins E, Szabo I, Vereninov A, Huber SM. 2008. Ion channels, Cell volume, Cell proliferation and Apoptotic Cell Death. En: Sensing with Ion Channels. B. Martinac (ed). Springer Series in Biophysics. Vol. 11. USA. Pp: 69-84.

- Law RO. 1991. Amino acids as volume-regulatory osmolytes in mammalian cells. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol.* **99**(3):263-77.
- Lien YH, Shapiro JI, Chan L. 1991. Study of brain electrolytes and organic osmolytes during correction of chronic hyponatremia. Implications for the pathogenesis of central pontine myelinolysis. *J Clin Invest.* **88**(1):303-9.
- Lin H. 2002. The stem-cell niche theory: lessons from flies. *Nat Rev Genet.* **3**(12): 931-40.
- Lin ML y Bertics PJ. 1995. Laminin responsiveness is associated with changes in fibroblast morphology, motility, and anchorage-independent growth: cell system for examining the interaction between laminin and EGF signaling pathways. *J Cell Physiol.* **164**(3):593-604.
- Lohr JW y Yohe LA. 1994. Mechanisms of hypoosmotic volume regulation in glioma cells. *Brain Res.* **667**(2):263-8.
- Loveday D, Heacock AM, Fisher SK. 2003. Activation of muscarinic cholinergic receptors enhances the volume-sensitive efflux of myo-inositol from SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J Neurochem.* **87**(2): 476-86.
- Ma W, Maric D, Li BS, Hu Q, Andreadis JD, Grant GM, Liu QY, Shaffer KM, Chang YH, Zhang L, Pancrazio JJ, Pant HC, Stenger DA, Barker JL. 2000. Acetylcholine stimulates cortical precursor cell proliferation in vitro via muscarinic receptor activation and MAP kinase phosphorylation. *Eur J Neurosci.* **12** (4):1227-40.
- Maar T, Morán J, Schousboe A, Pasantes-Morales H. 1995. Taurine deficiency in dissociated mouse cerebellar cultures affects neuronal migration. *Int J Neurosci.* **13**(5): 491-502.
- Marnela KM, Morris HR, Panico M, Timonen M, Lähdesmäki P. 1985. Glutamyl-taurine is the predominant synaptic taurine peptide. *J Neurochem.* **44**(3):752-54.
- Massieu L, Montiel T, Robles G, Quesada O. 2004. Brain amino acids during hyponatremia in vivo: clinical observations and experimental studies. *Neurochem Res.* **29**(1):73-81.
- Matulef K, Howery AE, Tan L, Kobertz WR, Du Bois J, Maduke M. 2008. Discovery of potent CLC chloride channel inhibitors. *ACS Chem Biol.* **3**(7): 419-28.
- Miller TJ, Hanson RD, Yancey PH. 2000. Developmental changes in organic osmolytes in prenatal and postnatal rat tissues. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* **125**(1):45-56.
- Morales-Mulia S, Cardin V, Torres-Márquez ME, Crevenna A, Pasantes-Morales H. 2001. Influence of protein kinases on the osmosensitive release of taurine from cerebellar granule neurons. *Neurochem Int.* **38**(2): 153-61.
- Morán J, Miranda D, Peña-Segura C, Pasantes-Morales H. 1997. Volume regulation in HIH/3T3 cells not expressing P-Glycoprotein. II. Chloride and amino acid fluxes. *Am J Physiol.* **272**(6 Pt 1): C1804-9.

- Morán J, Morales-Mulia S, Hernández-Cruz A, Pasantes-Morales H. 1997. Regulatory volume decrease and associated osmolyte fluxes in cerebellar granule neurons are calcium independent. *J Neurosci Res.* **47**(1): 144-153.
- Morán J, Morales-Mulia M, Pasantes-Morales H. 2001. Reduction of phospholemman expression decreases osmosensitive taurine efflux in astrocytes. *Biochim Biophys Acta.* **1538**(2-3): 313-20.
- Okano H y Sawamoto K. 2008. Review: Neural stem cells: involvement in adult neurogenesis and CNS repair. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **363** (1500): 2111-22.
- O'Reilly N, Xia Z, Fiander H, Tauskela J, Small DL. 2002. Disparity between ionic mediators of volume regulation and apoptosis in N1E 115 mouse neuroblastoma cells. *Brain Res.* **943**(2): 245-56.
- Oliveira MW, Minotto JB, de Oliveira MR, Zanotto-Filho A, Behr GA, Rocha RF, Moreira JC, Klamt F. 2010. Scavenging and antioxidant potential of physiological taurine concentrations against different reactive oxygen/nitrogen species. *Pharmacol Rep.* **62**(1): 185-93.
- Ordaz B, Tuz K, Ochoa LD, Lezama R, Peña-Segura C, Franco R. 2003. Osmolytes and mechanisms involved in regulatory volume decrease under conditions of sudden or gradual osmolarity decrease. *Neurochem Res.* **29**(1): 65-72.
- Palackal T, Moretz R, Wisniewski H, Sturman J. 1986. Abnormal visual cortex development in the kitten associated with maternal dietary taurine deprivation. *J Neurosci Res.* **15**(2): 223-39.
- Pasantes-Morales H y Schousboe A. 1989. Release of taurine from astrocytes during potassium-evoked swelling. *Glia.* **2**(1):45-50.
- Pasantes-Morales H, Alavez S, Sánchez-Olea R, Morán J. 1993. Contribution of organic and inorganic osmolytes to volume regulation in rat brain cells in culture. *Neurochem Res.* **18**(4): 445-52.
- Pasantes-Morales H. 1996. Volume regulation in brain cells: cellular and molecular mechanisms. *Metab Brain Dis.* **11**(3):187-204.
- Pasantes-Morales H y Schousboe A. 1997. Role of taurine in osmoregulation in brain cells: Mechanisms and functional implications. *Amino Acids.* **12**: 281-292.
- Pasantes-Morales H, Cardin V, Tuz K. 2000a. Signaling events during swelling and regulatory volume decrease. *Neurochem Res.* **25**(9-10): 1301-14.
- Pasantes-Morales H, Franco R, Torres-Marquez ME, Hernández-Fonseca K, Ortega A. 2000b. Amino acid osmolytes in regulatory volume decrease and isovolumetric regulation in brain cells: contribution and mechanisms. *Cell Physiol Biochem.* **10**(5-6):361-70.
- Pasantes-Morales H., Franco R, Ochoa L, Ordaz B. 2002a. Osmosensitive release of neurotransmitter amino acids: relevance and mechanisms. *Neurochem Res.* **27**(1-2):59-65.
- Pasantes-Morales H, Franco R, Ordaz B, Ochoa L. 2002b. Mechanisms counteracting swelling in brain cells during hyponatremia. *Arch Med Res.* **33**(3): 237-44.

- Pasantes-Morales H y Tuz K. 2006. Volume changes in neurons: hyperexcitability and neuronal death. *Contrib Nephrol.* **152**(1): 221-40.
- Pasantes-Morales H. 2007. Aminoacids and brain volume regulation: Contribution and mechanisms. *Handbook of Neurochem and Mol Neurobiol.* 3ed. Springer. USA. Pp. 226-42.
- Pasantes-Morales H y Cruz-Rangel S. 2010. Brain volume regulation: osmolytes and aquaporin perspectives. *Neuroscience.* **168**(4): 871-84.
- Pedemonte CH, Kirley TL, Treuheit MJ, Kaplan JH. 1992. Inactivation of the Na,K-ATPase by modification of Lys-501 with 4-acetamido-4'-isothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid (SITS). *FEBS Lett.* **314** (1): 97-100.
- Pevny L y Rao MS. 2003. Review: The stem-cell menagerie. *Trends Neurosci.* **26**(7): 351-59.
- Pow DV, Sullivan R, Reye P, Hermanussen S. 2002. Localization of taurine transporters, taurine, and (3)H taurine accumulation in the rat retina, pituitary, and brain. *Glia.* **37**(2):153-68.
- Reiss K, Mentlein R, Sievers J, Hartmann D. 2002. Stromal cell-derived factor 1 is secreted by meningeal cells and acts as chemotactic factor on neuronal stem cells of the cerebellar external granular layer. *Neuroscience.* **115**(1):295-305.
- Reynolds BA y Rietze RL. 2005. Neural stem cells and neurospheres--re-evaluating the relationship. *Nat Methods.* **2**(5):333-6.
- Rietze RL y Reynolds BA. 2006. Neural stem cell isolation and characterization. *Methods Enzymol.* **419**(1):3-23.
- Rozental R, Morales M, Mehler MF, Urban M, Kremer M, Dermietzel R, Kessler JA, Spreay DC. 1998. Changes in the properties of gap junctions during neuronal differentiation of hippocampal progenitor cells. *J Neurosci.* **18**(5): 1753-62.
- Saly V y Andrew RD. 1993. CA3 neuron excitation and epileptiform discharge are sensitive to osmolality. *J Neurophysiol.* **69**(6): 2200-8.
- Sánchez-Olea R, Morán J, Schousboe A, Pasantes-Morales H. 1991. Hyposmolarity-activated fluxes of taurine in astrocytes are mediated by diffusion. *Neurosci Lett.* **130**(2): 233-6.
- Sánchez Olea R, Peña C, Morán J, Pasantes-Morales H. 1993. Inhibition of volume regulation and efflux of osmoregulatory amino acids by blockers of Cl⁻ transport in cultured astrocytes. *Neurosci Lett.* **156**(1-2):141-44.
- Sánchez-Olea R, Morales M, García O, Pasantes-Morales H. 1996. Cl⁻ channel blockers inhibit the volume-activated efflux of Cl⁻ and taurine in cultured neurons. *Am J Physiol Cell Physiol.* **270**(6):C1703-C1708.
- Schaffer S, Takahashi K, Azuma J. 2000. Role of osmoregulation in the actions of taurine. *Amino Acids.* **19**(3-4): 527-46.

- Schambra Uta B, Lauder Jean M, Silver Jerry. 1992. Atlas of the prenatal mouse brain. Academic Press, Inc. USA. Pp: 123, 132, 133.
- Schousboe A, Sánchez-Olea R, Morán J, Pasantes-Morales H. 1991. Hyposmolarity-induced taurine release in cerebellar granule cells is associated with diffusion and not with high-affinity transport. *J Neurosci Res.* **30**(4): 661-65.
- Schousboe A, Apreza CL, Pasantes-Morales H. 1992. GABA and taurine serve as respectively a neurotransmitter and an osmolyte in cultured cerebral cortical neurons. *Adv Exp Med Biol.* **315**(1): 391-7.
- Schwartzkroin PA, Baraban SC, Hochman DW. 1998. Osmolarity, ionic flux, and changes in brain excitability. *Epilepsy Res.* **32** (1-2): 275-85.
- Shennan DB, McNeillie SA, Curran DE. 1994. The effect of a hyposmotic shock on amino acid efflux from lactating rat mammary tissue: stimulation of taurine and glycine efflux via a pathway distinct from anion exchange and volume-activated anion channels. *Exp Physiol.* **79**(5): 797-808.
- Shennan DB. 2008. Swelling-induced taurine transport: relationship with chloride channels, anion exchangers and other swelling-activated transport pathways. *Cell Physiol Biochem.* **21**(1-3):15-28.
- Sommer L y Rao M. 2002. Neural stem cells and regulation of cell number. *Prog Neurobiol.* **66**(1): 1-18.
- Strange K. 1992. Regulation of solute and water balance and cell volume in the Central Nervous System. *J Am Soc Nephrol.* **3**(1):12-27.
- Strange K y Jackson PS. 1995. Swelling-activated organic osmolyte efflux: a new role for anion channels. *Kidney Int.* **48**(4): 994-1003.
- Strange K, Emma F, Jackson PS. 1996. Cellular and molecular physiology of volume-sensitive anion channels. *Am J Physiol Cell Physiol.* **270** (3 Pt 1): C711-30.
- Strange K. 2004. Cellular volume homeostasis. *Advan Physiol Edu.* **28**(1-4): 155-59.
- Sturman JA, Rassin DK, Gaull GE, Cote LJ. 1980. Taurine in developing rhesus monkey brain. *J Neurochem.* **35**(2): 304-10.
- Sturman JA, Moretz RC, French JH, Wisniewski HM. 1985. Taurine deficiency in the developing cat: persistence of the cerebellar external granule cell layer. *J Neurosci Res.* **13**(3): 405-16.
- Stutzin A, Torres R, Oporto M, Pacheco P, Eguiguren AL, Cid LP, Sepúlveda FV. 1999. Separate taurine and chloride efflux pathways activated during regulatory volume decrease. *Am J Physiol.* **277**(3 Pt 1): C392-402.
- Tasaki I. 1999. Rapid structural changes in nerve fibers and cells associated with their excitation processes. *Jap J Physiol.* **49**(1):125-138.
- Temple S. 2001. The development of neural stem cells. *Nature.* **414**(6859): 112-17.

- Timbrell JA, Seabra V, Waterfield CJ. 1995. The in vivo and in vitro protective properties of taurine. *Gen Pharmacol.* **26**(3): 453-62.
- Tosteson DC y Hoffman JF. 1960. Regulation of cell volume by active cation transport in high and low potassium sheep red cells. *J Gen Physiol.* **44**(1):169-94.
- Tuz K, Ordaz B, Vaca L, Quesada O, Pasantes-Morales H. 2001. Isovolumetric regulation mechanisms in cultured cerebellar granule neurons. *J Neurochem.* **79**(1): 143-51.
- Warskulat U, Heller-Stilb B, Oermann E, Zilles K, Haas H, Lang F, Häussinger D. 2007. Phenotype of the taurine transporter knockout mouse. *Methods Enzymol.* **428**(1): 439-58.
- Wen H, Nagelhus EA, Amiry-Moghaddam M, Agre P, Ottersen OP, Nielsen S. 1999. Ontogeny of water transport in rat brain: postnatal expression of the aquaporin-4 water channel. *Eur J Neurosci.* **11**(3):935-45.
- Xu YJ, Saini HK, Zhang M, Elimban V, Dhalla NS. 2006. MAPK activation and apoptotic alterations in hearts subjected to calcium paradox are attenuated by taurine. *Cardiovasc Res.* **72**(1): 163-74.
- Yancey PH. 2005. Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *J Exp Biol.* **208**(Pt 15): 2819-30.
- Yasuda T, Bartlett PF, Adams DJ. 2008. K(ir) and K(v) channels regulate electrical properties and proliferation of adult neural precursor cells. *Mol Cell Neurosci.* **37**(2): 284-97.
- Yoneyama M, Shiba T, Hasebe S, Ogita K. 2011. Adult neurogenesis is regulated by endogenous factors produced during neurodegeneration. *J Pharmacol Sci.* **115**(4): 425-32.