



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Excitotoxicidad por activación de receptores a trombina  
en condiciones de edema celular cerebral”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestra en Ciencias

PRESENTA:

Martha Pérez Domínguez

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Herminia Pasantes Ordóñez  
[Instituto de Fisiología Celular, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Claudia González Espinosa  
[Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas](#)  
Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes  
[Facultad de Química, UNAM](#)

MÉXICO, D. F. Junio, 2014



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

El presente proyecto de investigación fue desarrollado bajo la tutoría de la Dra. Herminia Pasantes del Departamento de Neurodesarrollo y Fisiología de la División de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Los miembros del comité tutor que asesoraron el desarrollo del proyecto fueron:

Dra. Herminia Pasantes Ordóñez	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dra. Claudia González Espinosa	Cinvestav, IPN
Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes	Facultad de Química, UNAM

Los miembros del jurado de examen de grado designados por el Subcomité Académico del Posgrado en Ciencias Bioquímicas fueron:

Dra. María de Lourdes Massieu Trigo	PRESIDENTE
Dr. Edmundo Chávez Cossío	VOCAL
Dra. Marina Macías Silva	VOCAL
Dra. Rocío Salceda Sacanelles	VOCAL
Dra. María Eugenia Torres Márquez	SECRETARIO

La realización de este trabajo contó con el donativo otorgado al laboratorio de la Dra. Herminia Pasantes por parte del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la UNAM (DGAPA-PAPIIT, IN202313) y por una beca nacional para la formación a nivel de posgrado en la modalidad de maestría por parte del CONACyT en el periodo 2012-1 a 2013-2.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la Dra. Herminia Pasantes por permitirme formar parte de su grupo de trabajo y por todo su apoyo para mi formación académica.

A los Dres. Claudia González y Marco Antonio Cerbón por sus importantes aportaciones para el desarrollo de este proyecto.

Al jurado de examen de grado integrado por los Dres. María del Lourdes Massieu, Edmundo Chávez, Marina Macías, Rocío Salceda, María Eugenia Torres por la revisión de esta tesis, sus comentarios y sugerencias.

A la Biól. Claudia Peña y al Dr. Gerardo Ramos por su valioso apoyo técnico y contribución a este trabajo.

A Rosa Rivera por su eficiente asistencia como auxiliar de laboratorio.

A Erika Vázquez, Silvia Cruz y Reyna Hernández por todo su apoyo académico y personal.

*“La vida no es la que uno vivió,  
sino la que uno recuerda y  
cómo la recuerda para contarla”*

Gabriel García Márquez

A mi familia y amigos quienes  
me acompañaron y apoyaron  
todo este tiempo...  
gracias por tantos recuerdos.

## ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b>	3
<b>RESUMEN</b>	4
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	6
1.1 El volumen celular	6
1.2 El decremento regulador de volumen	7
1.3 El edema cerebral	13
1.3.1 La hiponatremia	16
1.3.2 La isquemia cerebral	17
1.4 Los receptores a trombina y su participación en el DRV	19
<b>2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	22
<b>3. HIPÓTESIS</b>	23
<b>4. OBJETIVO GENERAL</b>	23
4.1 Objetivos específicos	23
<b>5. MÉTODOS</b>	24
<b>6. RESULTADOS</b>	33
6.1 Edema hiposmótico	33
6.1.1 Astrocitos	33
6.1.2 Neuronas	37
6.2 Edema Isosmótico	45
6.2.1. Astrocitos	45
6.2.2 Neuronas	48
6.2.3. Viabilidad celular	51
<b>7. DISCUSIÓN</b>	53
<b>8. CONCLUSIONES</b>	60
<b>REFERENCIAS</b>	63

## ABREVIATURAS

**ANDEVA** - Análisis de varianza  
**ATP** – Trifosfato de adenosina  
**BAPTA** – Ácido 1,2-bis (2-aminofenoxi) etano-N, N, N', N'-tetra-acético.  
**BAPTA-AM** – Ácido 1,2 - Bis (2-aminofenoxi) etano - N, N, N', N' – tetra-acético (acetoximetil éster)  
**BHE**.-. Barrera hematoencefálica  
**DAG** - Diacilglicerol  
**DCPIB** - Ácido 4-[(2-butyl-6,7-dicloro-2-ciclopentil-1-oxo-3H-inden-5-yl) oxi] butanoico  
**DDF** - 1,9-dideoxi-forskolin  
**DIDS** - Ácido 4'4diisotiocianatostilbeno-2,2' disulfónico  
**DL-TBOA** - DL-Treo-Beta-Benziloxiaspartato  
**DRV** - Decremento Regulador de Volumen  
**GPCR** - Receptor acoplado a proteínas G  
**HEPES** – Ácido 4-(2-Hidroxietil) piperazina-1-etanosulfónico  
**H30** - Solución Hiposmótica 30%  
**H40** – Solución Hiposmótica 40%  
**HT** - Solución Hiposmótica con 5 U/mL de trombina  
**IoA** – Iodoacetato de sodio  
**IP<sub>3</sub>** - Inositol 1, 4, 5 trifosfato  
**I** - Isquemia química  
**IT** – Isquemia química con 5 U/mL de trombina  
**NaN<sub>3</sub>** - Azida de sodio  
**NC** - Neuronas Corticales  
**NH** - Neuronas de Hipocampo  
**NGC** - Neuronas Granulares de Cerebelo  
**NMDA** - N-Metil-D-Aspartato  
**NPPB**-Acido 5-nitro-2-(3-fenilprolilamino) benzoico  
**PAR** - Receptor Activado por Proteasas  
**PIP<sub>2</sub>** - Fosfatidilinositol 4, 5-bifosfato  
**PKC** – Proteína Cinasa C  
**PLC<sub>β</sub>** - Isoforma β de la Fosfolipasa C  
**PPACK** - Fenilalanil-Proil-Arginina-Clorometilcetona  
**SITS** - Ácido 4-acetamido-4'isotiocianatostilbeno-2,2' disulfónico  
**TEA** - Tetraetilamonio  
**TFLLRNH<sub>2</sub>** - H-Thr-Phe-Leu-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>  
**[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>** - Concentración de calcio intracelular  
**VRAC** – Canal Aniónico Regulado por Volumen  
**9-AC** - Ácido 9-antraceno-carboxílico

## RESUMEN

Las células liberan osmolitos y agua osmóticamente obligada en respuesta a edema lo que permite la recuperación del volumen celular; sin embargo, la liberación de osmolitos como  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$  y aminoácidos neuroactivos, como el glutamato, alteran la excitabilidad neuronal. La liberación de osmolitos dependiente de volumen se incrementa significativamente por la activación de ciertos receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) y el incremento en la concentración de calcio intracelular  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  que se desencadena.

En el presente proyecto de investigación se estudió la acción de la trombina como un agonista del receptor activado por proteasas 1 (PAR-1), un GPCR, sobre la liberación de glutamato inducida por condiciones que conllevan edema citotóxico hiposmótico e isosmótico, por reducción de la concentración de  $\text{NaCl}$  extracelular e isquemia química por inhibición glicolítica y respiratoria, respectivamente, en cultivos primarios de astrocitos de cerebelo y corticales, de neuronas granulares de cerebelo, hipocampo y corteza cerebral de rata.

En respuesta a un estímulo hiposmótico 30% tanto los astrocitos como las neuronas liberan D-aspartato (un análogo no metabolizable del L-glutamato). La trombina incrementó esta liberación 2.3 y 2.2 veces en los astrocitos de cerebelo y corteza, además movilizó el 19% y el 16% de la poza celular de D-aspartato durante 5 minutos, respectivamente. En las neuronas granulares de cerebelo y de hipocampo la potenciación de la liberación osmosensible de D-aspartato por trombina fue de 2.3 y 1.34 veces, y movilizó el 12% y el 4% de la poza celular de D-aspartato durante 5 minutos, respectivamente. En las neuronas de corteza la trombina potenció la liberación de D-aspartato 1.63 veces cuando el estímulo hiposmótico fue del 40%. El efecto de la trombina incrementó la liberación de D-aspartato dependiente de volumen, (sensible a DCPIB) y ocurrió a través de su actividad proteolítica (prevenido por PPACK) sobre el receptor PAR-1 que expresan los tipos celulares evaluados (mimetizado por el péptido sintético agonista TFLLRNH<sub>2</sub>); que promueve un incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (inhibido



por condiciones libres de este catión). Las diferenciadas observadas en la magnitud de la potenciación de la liberación del D-aspartato por trombina se relacionan con el aumento en la  $[Ca^{2+}]_i$  en cada tipo celular.

El curso temporal de la liberación de D-aspartato por isquemia química tuvo dos fases en los astrocitos corticales. La operación reversa del transportador de glutamato fue la principal vía de movilización de D-aspartato en ambas fases. La activación de la vía sensible a volumen participó en la segunda fase, minutos 40 a 60, cuando hubo un incremento en el volumen celular y fue sensible a DIDS y a floretina. La trombina incrementó la salida de D-aspartato únicamente en esta etapa. En la liberación de D-aspartato por isquemia química en las neuronas granulares de cerebelo contribuyó principalmente la operación reversa del transportador, seguida de la liberación vesicular y la movilización de D-aspartato por la vía sensible a volumen que fue potenciada por trombina.

La condición de isquemia química indujo un 37% de muerte necrótica en los astrocitos corticales que incrementó al 60% por trombina, ambas se previnieron por el tratamiento con floretina, un bloqueador de la vía sensible a volumen. No se observó un incremento significativo en la muerte en las neuronas granulares de cerebelo.

Se concluye que la trombina, a través del incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  mediado por la activación del receptor PAR-1, tiene un papel importante en la movilización de glutamato que ocurre a través de la vía difusional en condiciones de edema, particularmente en los astrocitos. La importancia del estudio radica en una posible exacerbación por la trombina del daño por excitotoxicidad al activar de manera anormal a los receptores PAR y promover una mayor liberación de aminoácidos excitadores en patologías en las que coincidan el edema celular cerebral y la pérdida de la selectividad de la barrera hematoencefálica.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 El volumen celular

El mantenimiento de un volumen constante ante los cambios del entorno es un requisito en la homeostasis celular. Estos cambios se deben a perturbaciones en la osmolaridad externa o a alteraciones en el contenido de los solutos intracelulares, en ambos casos, se genera un gradiente osmótico transmembranal que puede llevar a un desequilibrio osmótico de magnitud tal que afecte la función y aún la supervivencia celular (Pasantes-Morales et al., 2002).

La constancia del volumen celular requiere de un equilibrio osmótico, que considera necesariamente el gradiente de concentración del agua, que a su vez está determinado por la concentración de solutos osmóticamente activos en ambos lados de la membrana. Las membranas celulares son altamente permeables al agua, cualquier cambio en la concentración de osmolitos resulta en un flujo inmediato de agua, ya sea hacia dentro o fuera de las células, hasta que se alcance el equilibrio osmótico. Dado que las membranas de las células animales son incapaces de mantener gradientes de presión hidrostática significativos, los flujos de agua causan hinchamiento o encogimiento celular. El flujo de agua ocurre por difusión pasiva a través de la bicapa lipídica y por difusión facilitada mediada por acuaporinas, a través de las cuales el desplazamiento de agua es más eficiente, selectivo y bidireccional (Lang, 1998; Strange, 2004; Pasantes-Morales y Cruz-Rangel, 2010).

El volumen total de una célula se mantiene constante por el equilibrio dinámico de los distintos sistemas de transporte de iones y solutos orgánicos a través de la membrana plasmática. Aunque la osmolaridad sistémica está finamente controlada en condiciones fisiológicas, no se excluye el que hayan variaciones en determinadas regiones celulares por la generación de microgradientes, locales y transitorios, como una consecuencia de la captura de nutrientes, la exocitosis de productos, la síntesis o la degradación de macromoléculas, la

remodelación del citoesqueleto y la matriz extracelular, las reacciones metabólicas y la generación de gradientes iónicos en la transmisión sináptica. Además el volumen celular no es una característica estática, participa como señal en la proliferación, el crecimiento, la migración y la muerte celular (Pasantes-Morales y Tuz, 2006; Hoffmann et al., 2009, 2011).

Las alteraciones en el volumen celular tienen consecuencias lesivas de diversa índole, a nivel estructural interfieren con la integridad de la membrana plasmática y perturban las asociaciones pre-existentes entre los componentes de la membrana con el citoesqueleto, la matriz extracelular y las células contiguas. Además el agua, como solvente, medio de reacción y reactante, modifica la concentración y la difusión de moléculas solubles que participan como señales y perturba la interacción espacial de enzimas, sustratos, iones y cofactores, lo que en conjunto altera la compleja red de señalización bajo la que opera el funcionamiento y la comunicación celular (Lang, 1998; Pasantes-Morales et al., 2006; 2010; Pedersen et al., 2011).

Las células tienen la capacidad de responder ante las alteraciones en el volumen por medio de mecanismos adaptativos que le permiten recuperar su volumen original. Esta capacidad es una característica ancestral que se ha conservado a través de la evolución, en prácticamente todas las especies. La presión de selección positiva asociada a este proceso enfatiza la importancia de la homeostasis de los fluidos intra y extracelulares (Pasantes-Morales et al., 2002).

## **1.2 El decremento regulador de volumen**

En respuesta a un incremento en el volumen celular se activa un mecanismo adaptativo al que se le ha denominado decremento regulador de volumen (DRV). El DRV es un proceso complejo y dinámico que resulta de la acción concertada del sensor de volumen y vías de señalización que activan a los efectores que finalmente harán posible la recuperación activa del volumen celular (Pasantes-Morales et al., 2006; Hoffman y Pedersen, 2011; Pedersen et al., 2011).

**El sensor de volumen.** La percepción del cambio en el volumen celular es el paso inicial y crítico en la serie de eventos que se activan y que culminan con su corrección. A través del sensor de volumen se identifica el cambio ocurrido y se activan los mecanismos correctores; el sensor tiene igualmente la memoria del volumen característico del tipo celular y detiene de manera activa el proceso correctivo en el momento necesario. A pesar de su importancia en todo el proceso regulador, el mecanismo sensor no ha sido identificado aún, se desconoce si está conformado por un solo tipo de molécula o por distintas señales que involucran varios tipos de moléculas; asimismo se ignora si el mecanismo es semejante para identificar las diferencias en la magnitud del cambio en el volumen. Se han considerado al menos tres tipos de señales de estrés osmótico que podrían participar como un mecanismo sensor de volumen: los cambios en el hacinamiento macromolecular, las modificaciones en la fuerza iónica y las modificaciones mecánicas o químicas en la bicapa lipídica, la matriz extracelular o el citoesqueleto (Wehner et al., 2003; Hoffmann y Pedersen, 2011).

Entre las moléculas transmembranales que pudieran percibir cambios en el ambiente extracelular y a su vez transmitir la señal al medio intracelular se incluyen los siguientes: i) los receptores con actividad de cinasa de tirosinas, que son proteínas de convergencia para una gran variedad de vías de señalización y que al final regulan la expresión y actividad de numerosas funciones celulares, ii) los receptores canal de potenciales transitorios como el TRPV4, que son canales catiónicos no selectivos sensibles a osmolaridad y a estiramiento de la membrana y iii) las integrinas, que son moléculas de adhesión célula-matriz extracelular y que interactúan a nivel intracelular con elementos del citoesqueleto y activan señales para el control del transporte de iones como los que participan en la regulación del volumen (Pasantes-Morales et al., 2002; Wehner et al., 2003; Lezama et al., 2005).

**La osmotransducción.** En esta etapa tiene lugar la activación de una variedad de vías de señalización que permiten la adaptación de la célula a la nueva condición. El cambio en

volumen es un fenómeno complejo que implica modificaciones en un gran número de funciones celulares y no solo las que están directamente relacionadas con la recuperación del volumen. Entre las respuestas celulares que se activan durante el DRV, se encuentran las que están encaminadas a la remodelación de la membrana, la reorganización del citoesqueleto y las reacciones de adhesión vinculadas al cambio físico que experimenta la célula durante la alteración en volumen y su recuperación; estos cambios permiten a la célula adaptarse rápidamente sin rupturas o deformaciones mayores que interfieran con la integridad de la membrana. Además, durante el hinchamiento y la subsecuente recuperación del volumen, se activan también señales de estrés y elementos de vías de supervivencia celular (Vázquez-Juárez et al., 2008; Pedersen et al., 2011). Finalmente, se activan también las señales que llevarán a la movilización de los osmolitos, que constituyen a la etapa que es propiamente reguladora del volumen. Entre estas señales se encuentran cambios en la fosforilación de proteínas que participan en la regulación directa de canales y transportadores a cargo de cinasas de tirosinas y cinasas de fosfoinosítidos, que llevan a la activación de las vías de movilización del Cl<sup>-</sup> y taurina, mientras que el Ca<sup>2+</sup> y las cinasas de serinas y treoninas modulan las vías de movilización del K<sup>+</sup> (Pasantes-Morales et al., 2002). La jerarquía, interacción y conexión de estas moléculas de señalización activadas por el cambio en volumen aún no están del todo establecidas.

***Las vías de movilización de osmolitos.*** Los osmolitos que participan en el DRV son esencialmente los mismos en la mayoría de los tipos celulares. Todos los solutos libres en el citosol pueden participar como osmolitos, aunque los que tienen una contribución sustancial son los que están en altas concentraciones. En las células animales los osmolitos son los iones inorgánicos K<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> y moléculas orgánicas pequeñas de estructura heterogénea como los aminoácidos y sus derivados, los polialcoholes y las aminas. Los iones tienen una mayor contribución en la respuesta inmediata al hinchamiento, mientras que la de los osmolitos

orgánicos ocurre en la fase sostenida del proceso de regulación de volumen (Verbalis y Gullans, 1991). La movilización de osmolitos tiene lugar esencialmente a través de vías difusionales. Aunque los flujos de  $K^+$  y  $Cl^-$  sensibles a volumen permean principalmente por canales, también hay una participación de los cotransportadores electroneutros (Cruz-Rangel et al., 2012; Pasantes-Morales y Vázquez-Juárez, 2012). En el caso de los osmolitos orgánicos la movilización ocurre a través de vías difusionales sin una contribución de los transportadores dependientes de energía (Sánchez-Olea et al., 1991). La contribución de los osmolitos orgánicos ha sido estimada en alrededor del 20-30% y la de los iones entre 60 y 70%. Mientras que la disminución del nivel de los iones se revierte con el tiempo, la disminución de los osmolitos orgánicos, particularmente la taurina, es sostenida en tanto persista la condición que generó el cambio en el volumen celular (Verbalis y Gullans, 1991).

El canal de  $Cl^-$  sensible a volumen ( $Cl^-_{vol}$ ) ha sido caracterizado en numerosos tipos celulares y muestra características electrofisiológicas, biofísicas y farmacológicas similares. Se trata de un canal de rectificación saliente, con una conductancia unitaria intermedia de 40-78 pS y muestra una inactivación dependiente de voltaje  $\geq +60$  mV. Exhibe una alta selectividad por los aniones, específicamente los monovalentes. Su secuencia de permeabilidad  $SNC^- > I^- > NO_3^- > Br^- > Cl^- > F^- > gluconato^1$  corresponde a una secuencia Eisenman I. El  $Cl^-_{vol}$  es independiente de  $Ca^{2+}$ , su activación requiere de ATP, más no de su hidrólisis. Es sensible a los bloqueadores generales de canales de  $Cl^-$  tales como DIDS, SITS, 9-AC, NPPB, DDF<sup>2</sup>, ácido niflúmico, ácido flufenámico y floretina (Nilius et al., 1996; Okada, 2006). Se ha reportado que el DCPIB<sup>3</sup> es un inhibidor específico del  $Cl^-_{vol}$  porque no afecta a otros canales de  $Cl^-$

---

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

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

<sup>3</sup>**DCPIB** ácido 4-[(2-butil-6,7-dicloro-2-ciclopentil-2,3-dihidro-1-oxo-1H-inden-5-yl)oxy] butanoico.

(Decher et al., 2001). A pesar de su distribución ubicua, la identidad molecular de  $\text{Cl}^-_{\text{vol}}$  se desconoce, aunque se han clonado y caracterizado numerosos tipos de canales de  $\text{Cl}^-$  y a pesar que algunos muestran activación por hinchamiento, ninguno de ellos reúne las propiedades típicas del  $\text{Cl}^-_{\text{vol}}$  (Nilius et al., 1996; Okada, 1997).

En contraste con el  $\text{Cl}^-_{\text{vol}}$ , que presenta características similares en los diferentes tipos celulares, las observaciones indican que el  $\text{K}^+$  que se moviliza en respuesta al incremento en volumen celular lo hace a través de diversos tipos de canales involucrados en otras funciones celulares, pero que se activan en respuesta a señales consecuentes al hinchamiento celular como el aumento en la concentración de calcio intracelular  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . El incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  o los cambios en el voltaje debidos a la movilización de iones constituyen señales concurrentes con el hinchamiento en distintos tipos celulares y activan la movilización del  $\text{K}^+$  que en esta forma contribuye a la regulación del volumen celular. Los canales de  $\text{K}^+$  que responden a la elevación en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  son los canales KB; estos canales muestran conductancia unitaria grande (100-200 pS), sensibilidad al TEA<sup>4</sup>, caribdotoxina e iberotoxina. Las neuronas, astrocitos y otros tipos celulares regulan su volumen independientemente al incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  como señal acopladora; en estas células el  $\text{K}^+$  se moviliza por la apertura de canales activados por voltaje (Kv), estos canales son rectificadores salientes, se bloquean por TEA, moxiustoxina, argiotoxina y dendrotoxinas. Los canales de  $\text{K}^+$  activados por hiposmolaridad o aumento en volumen ( $\text{K}^+_{\text{vol}}$ ) presentan una conductancia unitaria intermedia, son independientes a  $\text{Ca}^{2+}$  y voltaje, son insensibles a los inhibidores clásicos de canales de  $\text{K}^+$  pero pueden ser inhibidos por clofilio. Los canales de  $\text{K}^+$  activados por estiramiento son insensibles a los bloqueadores típicos pero son inhibidos por gadolinio y quinidina (Ordaz et al., 2004).

---

<sup>4</sup>TEA Tetraetilamonio

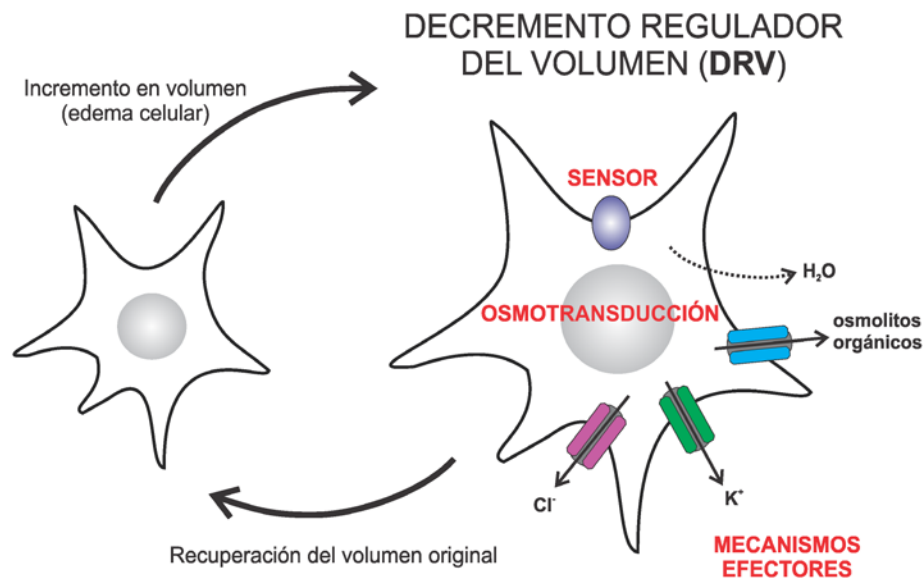
La vía de permeabilidad de los osmolitos orgánicos sensible a volumen es bidireccional con un movimiento neto de soluto dependiendo del gradiente de concentración. Esta vía se ha estudiado en términos de sus propiedades funcionales, pero su identidad molecular aún se desconoce. Con base en la sensibilidad farmacológica se ha propuesto una vía común o una interdependencia para las vías de movilización del Cl<sup>-</sup> y los osmolitos orgánicos, ya que la liberación de estos osmoefectores se inhibe en presencia de bloqueadores de canales de Cl<sup>-</sup> tales como el DIDS, el NPPB y el DCPIB (Sánchez-Olea et al., 1996).

De manera general, los osmolitos orgánicos son movilizados por la mayoría de las células, desde procariontes hasta células de mamíferos, durante la regulación de volumen. Algunos osmolitos orgánicos son compatibles o ideogénicos, es decir, que las células pueden acumular estos solutos en altas concentraciones y tolerar grandes cambios en su concentración sin que haya efectos adversos en la función y la estructura celular, a diferencia de las alteraciones en los iones que puede modificar la estructura y la función de macromoléculas, así como las propiedades de transporte de las membranas y la excitabilidad celular (Strange, 1992; Lang, 1998).

Los osmolitos orgánicos que participan en la regulación de volumen celular forman parte de un grupo heterogéneo de moléculas pequeñas que incluye a los aminoácidos de mayor concentración intracelular (taurina, glutamato, glutamina, glicina y alanina), polialcoholes (sorbitol y mio-inositol), metilaminas (glicerofosforilcolina y betaína) y otros compuestos como fosfoetanolamina, creatinina, fosfocreatinina y N-acetil-aspartato. La taurina es un  $\beta$ -aminoácido azufrado que se encuentra en altas concentraciones en un gran número de tipos celulares; se encuentra esencialmente soluble en el citosol, a pH fisiológico se encuentra como ión dipolar, no forma parte estructural de las proteínas, participa en pocas reacciones metabólicas como la conjugación de ácidos biliares (ácido taurocólico), es un elemento terminal en el catabolismo de la cisteína y metionina, lo que representa un costo de producción notablemente bajo, estas



propiedades le confieren a la taurina ventajas únicas como osmolito que permiten considerarla como representante de los osmolitos orgánicos u osmolito ideal al desplazarse dentro y fuera de la célula sin alterar el metabolismo celular. La activación de la salida de taurina se observa frente a cambios muy pequeños en la osmolaridad (Tuz et al., 2001) por lo que se considera el osmolito de elección ante cambios pequeños en el volumen.



**Figura 1.** Esquema representativo de los elementos y las etapas que participan durante el Decremento Regulador de Volumen.

### 1.3 El edema cerebral

Los cambios en el volumen son lesivos para todas las células, pero pueden ser particularmente perjudiciales en el cerebro debido a las restricciones impuestas por el cráneo rígido a la distensión del tejido, que da márgenes estrechos para amortiguar los cambios en el volumen intracraneal. La presión interna que se origina en situaciones de edema tiene consecuencias clínicas muy serias porque se compromete la irrigación sanguínea por la ruptura de vasos capilares, con los consecuentes episodios de isquemia y muerte neuronal, y en casos

extremos, incluso la muerte por paro respiratorio y cardiaco debido a la herniación caudal del parénquima cerebral a través del *foramen magnum* y la opresión de los núcleos neuronales del tallo cerebral (Kimelberg, 1995; Verbalis, 2010). A otro nivel, los cambios pequeños en el volumen celular pueden alterar las relaciones espaciales existentes entre las neuronas, la glia y el espacio extracelular, pueden igualmente presentarse modificaciones en la citoarquitectura de las neuronas y en sus interacciones con otras neuronas y con las células gliales. Otra consecuencia asociada al edema celular es la reducción del espacio extracelular con la consecuente aparición de la transmisión efáptica, en la cual los cambios eléctricos de una neurona específica alteran la excitabilidad de las neuronas vecinas por la proximidad anatómica y eléctrica de las células. Además hay un aumento de la concentración extracelular de neurotransmisores y  $K^+$ . Todas las consecuencias anteriormente mencionadas promueven un estado de hiperexcitabilidad y generan daños neurológicos (Strange, 1992; Pasantes-Morales y Tuz, 2006).

El cerebro de los mamíferos tiene cuatro compartimientos distintos de fluidos: la sangre, el líquido cerebroespinal, el fluido intersticial, que rodea a las células gliales y a las neuronas, y el líquido intracelular. El mantenimiento de la composición iónica y osmótica, así como el volumen de estos fluidos es un factor crítico para el funcionamiento del cerebro. Los cambios en la composición de solutos de los líquidos intra y extracelulares pueden alterar el procesamiento de la información y la señalización de las células cerebrales. El balance iónico y osmótico en el sistema nervioso central está regulado por el transporte de solutos y agua a través de la barrera hematoencefálica (BHE), el plexo coroideo y la membrana plasmática de células gliales y neuronas. Cuando existen desequilibrios entre estos compartimientos se genera edema cerebral (Strange, 1992).

El edema cerebral se clasifica como vasogénico o celular. El edema vasogénico involucra primordialmente a la BHE, esta estructura está formada por las células endoteliales y

sus asociaciones con los astrocitos perivasculares; las uniones estrechas en los capilares cerebrales restringen los movimientos de solutos y fluidos a través de este tejido. Cuando hay una alteración en la estructura o la función de la BHE se acumulan agua y solutos en el espacio extracelular. Este tipo de edema se presenta debido a la presencia de tumores o de patologías infecciosas como la meningitis. El edema celular o citotóxico resulta de la acumulación de agua en el espacio intersticial sin una alteración de la BHE. El edema citotóxico puede presentarse en condiciones hiposmóticas o isosmóticas. El edema citotóxico hiposmótico se presenta cuando hay una reducción en la osmolaridad del plasma, que origina la movilización de agua a través de la BHE hacia el cerebro. Esta condición ocurre en las patologías que conllevan una condición de hiponatremia. El edema celular isosmótico se presenta en patologías que generan cambios en la distribución de los iones y los solutos entre los compartimientos extra e intracelulares, como ocurre durante la hipoxia, la hipoglucemia y la isquemia originadas por los accidentes cerebrovasculares, el traumatismo craneoencefálico, la epilepsia y las encefalopatías hepática y urémica (Strange, 1992; Pasantes-Morales y Cruz-Rangel, 2010).

La regulación del volumen en las células cerebrales sigue los patrones observados en otros tipos celulares y los osmolitos que participan son esencialmente los mismos. En la mayoría de las especies los osmolitos orgánicos que están presentes en mayor concentración en el cerebro son glutamato, mio-inositol, creatina, taurina y N-acetilaspártato, éstos agrupan cerca del 80% del total de la poza de estos osmolitos liberables (Pasantes-Morales y Cruz-Rangel, 2010). Sin embargo, las características particulares del cerebro hacen que la movilización de estos osmolitos como parte de la regulación del volumen tenga efectos lesivos sobre la función cerebral. Aunque la pérdida de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{K}^+$  contribuye de manera significativa al DRV, la reducción en la concentración intracelular de estos iones y su persistencia en el espacio extracelular alteran la excitabilidad neuronal (Fisher et al., 2008). Entre los osmolitos orgánicos, los aminoácidos como glutamato, GABA y glicina tienen un doble papel, como

osmolitos y como neurotransmisores, por lo cual su translocación puede alterar la excitabilidad neuronal y la transmisión sináptica (Pasantes-Morales y Cruz-Rangel, 2010). En el caso particular del glutamato, dado que es principal neurotransmisor excitador del sistema nervioso central, una concentración excesiva y sostenida en el espacio extracelular puede llevar a la muerte neuronal por excitotoxicidad (Pasantes-Morales et al., 2000).

### **1.3.1 La hiponatremia**

La hiponatremia es la causa más común de hinchamiento hiposmótico en las células cerebrales (Pasantes-Morales et al., 2002). Se considera una situación de hiponatremia cuando los valores de  $\text{Na}^+$  en el plasma se reducen de su valor normal de 145-136 mEq/L. Cuando estos valores disminuyen entre 135 y 125 mEq/L se presentan síntomas como náusea leve, vómito y dolores de cabeza, mientras que por una reducción por debajo de 120 mEq/L se presentan paro respiratorio, estado de coma y puede ocurrir un daño cerebral permanente. Una concentración de  $\text{Na}^+$  de 110 mEq/L o menor está asociada con una alta incidencia de mortalidad. Cuando la osmolaridad del plasma disminuye, como ocurre durante la hiponatremia, el agua se moviliza siguiendo su gradiente de concentración y entra al cerebro a través de la BHE. Aunque el cerebro no se comporta como un osmómetro perfecto, una reducción significativa en la osmolaridad del plasma (10-20%), como ocurre durante la hiponatremia, incrementa el volumen cerebral de un 5 a 7%, lo que genera una compresión de los vasos sanguíneos y episodios de isquemia (Fisher et al., 2008).

La hiponatremia es el resultado de un desbalance entre la ingesta y la excreción de agua y electrolitos; puede ser consecuencia de un exceso de agua derivada de una ingesta exagerada como en la polidipsia psicótica, o más comúnmente, de un desbalance en la eliminación renal como consecuencia de una secreción inadecuada de la hormona antidiurética, una deficiencia de glucocorticoides, hipotiroidismo y de una falla hepática o renal.

La hiponatremia concurre con una variedad de patologías como el traumatismo craneoencefálico, los tumores cerebrales y accidentes cerebrovasculares. La hiponatremia también puede ser una consecuencia de un déficit de  $\text{Na}^+$  ya sea por una eliminación renal excesiva, una deficiencia de mineralocorticoides, síndrome nefrótico, diuresis osmótica, vómito o diarrea; además es un estado común durante la vejez y el embarazo (Pasantes-Morales et al., 2002).

### **1.3.2 La isquemia cerebral**

El edema isosmótico ocurre en ausencia de una variación en la osmolaridad del medio externo. Este tipo de edema se presenta en patologías como la epilepsia, la isquemia, el traumatismo craneoencefálico y la encefalopatía hepática y urémica. En estas patologías, los fluidos extracelulares dejan de ser isotónicos por la redistribución de solutos intracelulares, como  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$ , ya sea por una falla en sus mecanismos de transporte, por la apertura de vías difusionales o por acumulación de moléculas orgánicas como la urea, el lactato o el amonio, que son permeables en la membrana celular. Esto convierte al medio intracelular hipertónico, lo que tiene como consecuencia un desplazamiento de agua al interior de la célula y, por lo tanto, un aumento en su volumen. La respuesta celular ante el incremento en volumen en condiciones isosmóticas se ha estudiado en menor detalle que la que tiene lugar en condiciones anisomóticas; los modelos más estudiados de hinchamiento isosmótico son los que simulan algunas condiciones isquémicas (Pasantes-Morales et al., 2000; Tuz et al., 2004).

El metabolismo cerebral depende principalmente de la oxidación de la glucosa, la reducción del flujo sanguíneo cerebral causa una disminución rápida en el metabolismo porque la demanda energética del cerebro no puede cubrirse y sobreviene la muerte neuronal. Durante un evento isquémico el tejido comprometido puede clasificarse en el área del foco isquémico y la zona de penumbra. En el foco isquémico el flujo sanguíneo es menor a 15-20% y las

neuronas mueren por una rápida despolarización anóxica que causa una pérdida inmediata del potencial de membrana, mientras que en la zona de penumbra las células son potencialmente viables por la irrigación colateral. Durante el transcurso de un evento isquémico la reducción de oxígeno y glucosa afecta la actividad de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  que conlleva un colapso progresivo de los gradientes iónicos transmembranales, la despolarización membranal origina una acumulación intracelular de  $\text{Na}^+$  que provoca un influjo pasivo de  $\text{Cl}^-$  y agua, que tiene como consecuencia un incremento en el volumen celular. Además, como consecuencia de la despolarización, se genera una acumulación de  $\text{K}^+$  y liberación excesiva de aminoácidos excitadores, con lo que el daño entra a una cadena autopropagada de despolarización y excitotoxicidad que causa nuevos episodios de muerte neuronal (Pasantes-Morales et al., 2000; Tuz et al., 2004). La muerte celular inducida bajo estas condiciones está relacionada con la pérdida de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y un incremento en los niveles extracelulares de los aminoácidos excitadores, aspartato y glutamato (Camacho et al., 2006; Mongin, 2007). En estas condiciones, la presencia persistente de glutamato en el espacio extracelular es un factor crítico que determina la supervivencia de las neuronas y astrocitos, por lo que cualquier factor adicional que incremente la salida de glutamato exacerbará el daño excitotóxico.

**La excitotoxicidad** induce muerte neuronal por la sobre-estimulación de los receptores a glutamato, en particular los de tipo NMDA. Este tipo de receptor muestra una alta permeabilidad a  $\text{Ca}^{2+}$  originando un influjo masivo de este ión al citosol. La pérdida de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  activa proteasas, lipasas y endonucleasas que degradan proteínas estructurales, afectan al DNA y alteran la estructura y la función de membranas y organelos, lo que origina un daño celular severo (Camacho et al., 2006).

La liberación de aminoácidos excitadores durante la isquemia cerebral muestra un componente calcio-dependiente relacionado con la exocitosis sináptica, uno asociado a la actividad en reversa de sus transportadores y otro relacionado con la activación de canales de

Cl<sup>-</sup> sensibles a volumen (Camacho et al., 2006). La liberación de glutamato a través de estas vías puede ocurrir en diferentes etapas del episodio isquémico y contribuyen a un incremento sostenido de sus niveles extracelulares, favoreciendo aún más la excitotoxicidad. La función de los transportadores en la regulación de la concentración extracelular de glutamato se altera debido al colapso de los gradientes iónicos de modo que no solamente se suprime el proceso de recaptura de glutamato sino que incluso el transportador opera en reversa incrementando su concentración extracelular. La aparición del edema también genera la salida de glutamato por la vía difusional sensible a volumen, sumándose al riesgo de muerte neuronal por excitotoxicidad (Camacho et al., 2006; Mongin, 2007; Rossi et al., 2007).

#### **1.4 Los receptores a trombina y su participación en el DRV**

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

**La trombina** es una serina proteasa constitutiva de la sangre que se genera en respuesta al daño en el tejido vascular y desempeña un papel fundamental en el proceso de coagulación sanguínea (Coughlin, 2000). Además la trombina genera una gran diversidad de respuestas celulares a través de la activación de la familia de receptores activados por proteasas (PARs) de la que se han identificado 4 miembros, denominados PAR 1 a 4, de los cuales activa a los receptores PAR-1, PAR-3 y PAR-4. (Grand et al., 1996; Coughlin, 2005). Los receptores PAR se expresan ampliamente en el tejido cerebral (Niclou et al., 1994 ; Weinstein et al., 1995, Striggow et al., 2001).

La activación de esta familia de receptores difiere de la típica que procede a través de la unión de un ligando exógeno al receptor, porque el ligando de los receptores PAR es una secuencia peptídica del propio receptor, que queda expuesta por el corte proteolítico de la trombina en un sitio específico de la región amino-terminal extracelular; esta secuencia interactúa con el receptor e induce el cambio conformacional que activa a las proteínas G heterotriméricas, compuestas por las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . Al activarse las proteínas G por la unión de GTP, las unidades se disocian en  $\alpha$  y el dímero  $\beta\gamma$ ; la subunidad  $\alpha$  tiene cuatro subtipos. Los receptores PAR pueden estar acoplados a miembros de  $G\alpha_{12/13}$ ,  $G\alpha_q$  y  $G\alpha_i$  y por lo tanto puede regular cinasas de tirosinas, la producción de  $IP_3$ ,  $Ca^{2+}$ , DAG, y la activación de la adenilato ciclasa (Coughlin, 2000). La subunidad  $G\alpha_q$  activa la enzima Fosfolipasa C ( $PLC_\beta$ ) que cataliza la producción de los segundos mensajeros inositol 1, 4, 5 trifosfato ( $IP_3$ ) y diacilglicerol (DAG), mediante la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-bifosfato ( $PIP_2$ ) en la membrana plasmática. El  $IP_3$  se une a un canal específico ubicado en el retículo endoplásmico que interviene en la liberación de  $Ca^{2+}$  hacia el citoplasma celular. El DAG y  $Ca^{2+}$  por su parte activan a la proteína cinasa C (PKC).

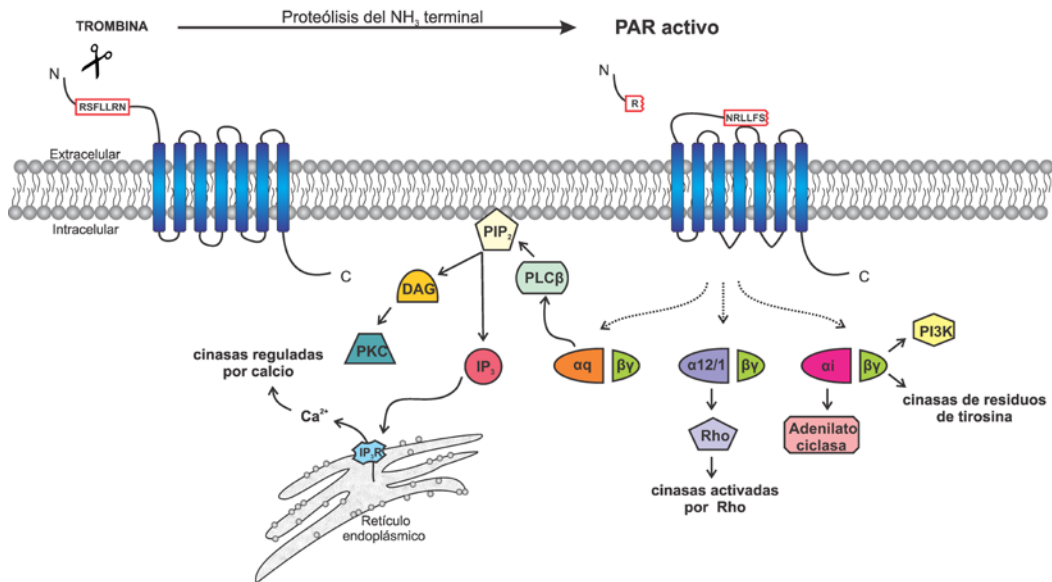
Diversas herramientas han sido desarrolladas para el estudio de los receptores PAR. Experimentalmente se puede activar específicamente a los distintos miembros de la familia PAR en ausencia de trombina, mediante el uso de péptidos sintéticos que modelan la secuencia ligando específica para cada receptor (Vu et al., 1991); de las secuencias diseñadas la  $TFLLRNH_2^5$  muestra gran selectividad para PAR-1 (Hollenberg, 2003). Para caracterizar el efecto catalítico de la trombina se han desarrollado diversos inhibidores, uno de ellos es el  $PPACK^6$ , que actúa formando un enlace covalente con la serina del sitio catalítico, actuando como un inhibidor irreversible (Kovach et al., 2009).

---

<sup>5</sup>  $TFLLRNH_2$  H-Thr-Phe-Leu-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>

<sup>6</sup>  $PPACK$  Fenilalanil-Prolil-Arginina-Clorometilcetona





**Figura 2.** Estructura, activación y señalización del receptor PAR-1.

Dependiendo de sus niveles en el cerebro, la trombina puede tener efectos notablemente diferentes, a concentraciones subnanomolares se ha descrito como un factor neuroprotector mientras que niveles altos de trombina son reconocidos como una condición que contribuye a la muerte neuronal por isquemia, hemorragia intracerebral y trauma (Xi et al., 2003; De Castro Ribeiro et al., 2006). La trombina se genera en respuesta a daño en el tejido vascular, a partir de la protrombina en presencia de los factores Xa, Va,  $\text{Ca}^{2+}$  y fosfolípidos de membrana; esta trombina vascular entra al parénquima cerebral por trauma craneano, isquemia u otra patología en la que se presenten cambios en la permeabilidad de la BHE que puede dañarse por fuerzas mecánicas y hemostáticas o cualquier situación que comprometa la funcionalidad de algunos de sus elementos. El aumento en la cantidad de trombina en el cerebro bajo condiciones patológicas puede generar la activación anormal de los receptores PAR con consecuencias lesivas (Xi et al., 2003; De Castro Ribeiro et al., 2006).

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En respuesta al edema celular se liberan osmolitos y se desplaza agua osmóticamente obligada con la consecuente recuperación del volumen celular, pero la movilización de osmolitos como  $K^+$ ,  $Cl^-$  y glutamato altera la excitabilidad neuronal y la transmisión sináptica. Se sabe que la activación de ciertos receptores acoplados a proteínas G participan en el proceso de regulación de volumen debido a que potencian la liberación de osmolitos.

El estudio de la participación del glutamato como osmolito en la regulación del volumen celular es de particular interés por ser el principal neurotransmisor excitador del sistema nervioso central. El decremento regulador de volumen se ha descrito en cultivos primarios de neuronas bajo condiciones de hiposmolaridad, pero no se ha estudiado la liberación de glutamato ni el posible efecto potenciador que puede ejercer la trombina al activar a los receptores PAR.

En las patologías en las que se presentan hinchamiento celular isosmótico, como en la isquemia, la respuesta celular ante el incremento en el volumen se ha estudiado en menor detalle; sin embargo, en estas condiciones el aumento y la persistencia de glutamato en el espacio extracelular se convierte en un factor crítico en la sobrevivencia celular, por lo que cualquier factor adicional que incremente la liberación de glutamato exacerbará el daño excitotóxico. Se ha descrito que la excitotoxicidad consecuente a la isquemia tiene un componente relacionado con la activación de la vía sensible a volumen sobre la cual la trombina podría ejercer un efecto potenciador.

El mecanismo anteriormente mencionado podría ser una explicación al hecho de que altas concentraciones de trombina se relaciona con la muerte neuronal por isquemia, de encontrar evidencia experimental se podría postular a la trombina como un elemento de exacerbación de la muerte neuronal por excitotoxicidad en patologías en las que coexistan el edema celular cerebral y cambios en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica.

### **3. HIPÓTESIS**

La trombina, como un agonista de receptores acoplados a proteínas G, potenciará la liberación de glutamato en respuesta al aumento en el volumen celular.

### **4. OBJETIVO GENERAL**

Determinar si la trombina tiene un efecto potenciador sobre la liberación de glutamato (D-aspartato) sensible a volumen en condiciones de edema hiposmótico e isosmótico y relacionar este efecto con la muerte celular inducida por estas condiciones en neuronas y astrocitos en cultivo.

#### **4.1 Objetivos específicos**

1. Determinar si la trombina ejerce un efecto potenciador sobre la liberación de glutamato en modelos experimentales de hiponatremia y de isquemia en cultivos primarios de astrocitos de cerebelo y corticales, así como de neuronas granulares de cerebelo, de hipocampo y de corteza.
2. Identificar los mecanismos de movilización del glutamato en los modelos experimentales en presencia de trombina y el curso temporal de su funcionamiento.
3. Examinar el efecto de la isquemia química sobre la viabilidad celular y su relación con la liberación del glutamato evocado por estas condiciones y potenciado por la trombina.

## 5. MÉTODOS

### 5.1 Materiales

Los medios de cultivo BME, DMEM/F12 y Neurobasal, el suero fetal bovino (SFB), el suplemento B27, la penicilina/estreptomicina, la gentamicina, el fura-2, AM y el anticuerpo secundario Alexa flúor 568 (A11066) se adquirieron de Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA). El DCPIB y el DL-TBOA de TOCRIS Bioscience (Ellisville, MO, EUA). El DIDS y el PPACK de Calbiochem (San Diego, CA, EUA). El TFLLRNH<sub>2</sub> de Bachem Americas (Torrance, CA, EUA). La trombina bovina (actividad específica > 1500 U/mg de proteína) de BioPharm Laboratories, LLC (Bluffdale, UT, EUA). El D-[2,3-<sup>3</sup>H]-aspartato de American Amersham Biosciences (Buckinghamshire, UK). Las sales para la preparación de las soluciones experimentales (NaCl, KCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub> y MgCl<sub>2</sub>) de J.T. Baker y el HEPES de Roche (Indianapolis, IN, EUA). El iodoacetato de sodio, la azida de sodio, la ionomicina, la tripsina de páncreas bovino, la DNAsa, la L-glutamina, la D-glucosa, el arabinósido de citosina (AraC), el ioduro de propidio, la floretina, el hoechst-33258, el BAPTA y BAPTA-AM de Sigma (St. Louis, MO, EUA). El anticuerpo primario anti-PAR1 (H-111, sc-5605) de Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA, EUA).

### 5.2 Soluciones

La **solución isosmótica** contuvo en mM: 135 de NaCl, 4.7 de KCl, 1.17 de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.7 de MgSO<sub>4</sub>, 1 de CaCl<sub>2</sub>, 5 de glucosa y 10 de HEPES. Su osmolaridad se ajustó a la del medio de cultivo antes de comenzar cada experimento. La **solución hiposmótica** consistió en una solución a la que se le redujo la osmolaridad un 30% o 40% con respecto a la isosmótica por la

disminución de la concentración de NaCl. La **solución de isquemia química** consistió en una solución isosmótica sin glucosa a la que se le agregaron 5mM de azida de sodio ( $\text{NaN}_3$ ) y 1.25mM de iodoacetato de sodio (IoA) con la reducción correspondiente de NaCl. El IoA es un inhibidor irreversible de la enzima glicolítica gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GADPH) al formar un derivado covalente con el grupo SH- esencial del centro activo de la enzima inactivándolo y la  $\text{NaN}_3$  es un inhibidor de la citocromo C oxidasa. Todas las soluciones experimentales se ajustaron a un pH de 7.4 con NaOH y la osmolaridad se determinó en un osmómetro de punto de congelación marca Precision Systems Inc. (Natick, MA, USA).

La **trombina** (5 U/mL) fue adicionada concomitante con la solución estímulo sin incubación o periodo de pre-estimulación. Para establecer si el efecto de trombina depende de su actividad proteolítica se pre-incubó en la solución estímulo en presencia de **PPACK** (1  $\mu\text{M}$ ) durante 30 minutos antes de comenzar los experimentos, un inhibidor irreversible de su actividad catalítica (Kovach et al., 2009). Para identificar el subtipo de receptor PAR activado por trombina se utilizó el **TFLLRNH<sub>2</sub>** (10  $\mu\text{M}$ ), un péptido sintético que es un agonista específico del receptor PAR-1, el cual se adicionó a la solución estímulo en sustitución de la trombina. Para determinar si el efecto de trombina depende de la activación de la vía de señalización que promueve un incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  se utilizaron **soluciones libres de  $\text{Ca}^{2+}$**  en las que se sustituyó el  $\text{CaCl}_2$  por 1 mM de  $\text{MgCl}_2$ , además se utilizaron compuestos quelantes de  $\text{Ca}^{2+}$ , a la solución experimental se le adicionó 0.5 mM de BAPTA y las células se pre-incubaron con 50  $\mu\text{M}$  BAPTA-AM 30 minutos antes de comenzar los experimentos.

La contribución de la vía de liberación de osmolitos orgánicos activada por aumento en el volumen celular se estableció con la sensibilidad a **DCPIB** (10  $\mu\text{M}$ ), un inhibidor selectivo de esta vía, a **DIDS** (10  $\mu\text{M}$ ) y a **floretina** (100  $\mu\text{M}$ ). La liberación de glutamato por la actividad reversa de su transportador se determinó por la sensibilidad al **DL-TBOA** (10  $\mu\text{M}$ ), un inhibidor

no competitivo del transportador. Los inhibidores se pre-incubaron durante 30 minutos antes de comenzar los experimentos de liberación y se mantuvieron durante todo el experimento en las soluciones experimentales.

### **5.3 Cultivos primarios**

Las ratas de la cepa Wistar se obtuvieron del bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Brevemente, para la disección los animales de la edad requerida (Tabla 1) se decapitaron, se quitó la piel y se removió el cráneo. Los cerebros se mantuvieron en una solución Krebs-Ringer (KRS) fría y se quitaron las meninges. El tejido se cortó y se digirió en una solución KRB con 0.25% de tripsina a 37°C durante 10 minutos. La reacción se detuvo con una solución KRB con 10% de SFB. El tejido se trituró mecánicamente con una solución KRB con 20% de SFB y 0.008% de DNAsa. Las suspensiones celulares se mantuvieron en un medio de cultivo apropiado para cada tipo celular (Tabla 1). El conteo y la viabilidad celular se determinaron por tinción con azul tripano y una de cámara de Neubauer. Las células se sembraron a la densidad requerida según cada tipo de experimento en cajas Petri de plástico de 35mm, 60mm y placas de 12 pozos pre-tratadas con 10 µg/mL poli-L-lisina. El cultivo se mantuvo a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% CO<sub>2</sub> y 95% de aire. Los astrocitos de cerebelo y corticales se sembraron a una densidad de 2.1x10<sup>4</sup>cells/cm<sup>2</sup> como describió previamente (Vázquez-Juárez et al., 2009). Las neuronas granulares de cerebelo se sembraron a una densidad de 2.1x10<sup>5</sup>cells/cm<sup>2</sup> como describió previamente Morán y Patel (1989). Las neuronas de hipocampo y de corteza se sembraron a una densidad de 2.1x10<sup>5</sup>cells/cm<sup>2</sup> como describió previamente Hernández-Fonseca y Massieu (2005).

**Tabla 1. Especificaciones para los cultivos primarios de neuronas astrocitos de rata.**

Tipo celular	Ratas Wistar	Medio de cultivo	Mantenimiento	Experimento
Astrocitos de cerebelo (ACe)	neonatas de 8 días	DMEM/F12 suplementado con 10% de SFB, 50 U/mL de penicilina y 50 $\mu$ M de estreptomina	Cambio de medio 3 veces por semana	2-3 semanas resiembra
Astrocitos Corticales (ACo)	neonatas de 1 día	DMEM/F12 suplementado con 10% de SFB, 50 U/mL de penicilina y 50 $\mu$ M de estreptomina	Cambio de medio 3 veces por semana	2-3 semanas resiembra
Neuronas granulares de cerebelo (NGC)	neonatas de 8 días	BME suplementado con 10% de SFB <sup>7</sup> , 2 mM de L-glutamina, 50 U/mL de penicilina, 50 $\mu$ M de estreptomina y 4 mM de glucosa	24 horas después adición de 25 mM de KCl y 10 $\mu$ M AraC <sup>8</sup>	8 DIV <sup>9</sup>
Neuronas de hipocampo (NH)	embriones con 17-18 días de gestación	Neurobasal suplementado con 2% de B-27, 0.5 mM de L-glutamina y 20 $\mu$ g/mL de gentamicina	4 DIV 10 $\mu$ M AraC Medio cambio de medio	8 DIV
Neuronas corticales (NC)	embriones con 17-18 días de gestación	Neurobasal suplementado con 2% de B-27, 0.5 mM de L-glutamina y 20 $\mu$ g/mL de gentamicina	4 DIV 10 $\mu$ M AraC Medio cambio de medio	8 DIV

<sup>7</sup> SFB Suero fetal bovino inactivado por calor

<sup>8</sup> AraC Arabinósido de citosina, previene la proliferación celular

<sup>9</sup> DIV Días de maduración *in vitro*

#### **5.4 Experimentos de liberación de aminoácidos tritiados**

La liberación de glutamato se determinó con el trazador radioactivo [2,3-<sup>3</sup>H]-D-aspartato, un análogo no metabolizable. A los cultivos primarios se les sustituyó el medio de cultivo por una solución isosmótica y se preincubaron con 0.3  $\mu$ Ci/mL de <sup>3</sup>H-D-aspartato durante una hora. Posteriormente se lavaron 9 veces perfundiendo 1 mL/min con una solución isosmótica para eliminar el excedente del trazador radioactivo que no fue capturado por las células y estabilizar la liberación basal. Después se colectaron 3 muestras para establecer la liberación en condiciones control y para las colectas subsecuentes la solución se reemplazó por el estímulo y las colectas continuaron por 5, 40 o 60 minutos. Para las condiciones hiposmóticas las colectas se realizaron a una tasa de 1 mL/min y para las condiciones de isquemia química a 1 mL/5min. Al concluir el experimento se lisaron las células con un raspador y la radioactividad se determinó en un contador de centelleo líquido marca Beckman Coulter. Los resultados se expresaron como el porcentaje de radioactividad liberada en cada colecta con respecto a la total incorporada que corresponde a la suma de las colectas y el lisado celular. Con los porcentajes de radioactividad se graficó el curso temporal de la liberación para cada condición, en donde los primeros tres puntos corresponden a la liberación basal y los subsecuentes a la liberación en respuesta al estímulo que fue agregado al tiempo  $t=3$  o  $15$ . Para comparar la liberación de cada condición se sumó la radioactividad acumulada en las tres fracciones máximas del pico de liberación.

#### **5.5 Detección del receptor PAR-1 por Inmunocitoquímica**

Las células se sembraron a baja densidad en cubreobjetos redondos pre-tratados con 10  $\mu$ g/mL poli-L-lisina en placas de 12 pozos. Se sustituyó el medio de cultivo por una solución



isosc mica y las células se fijaron con paraformaldehído al 4% a 4 C durante 15 minutos, después se lavaron 3 veces con PBS durante 5 min c/u. Las células no se permeabilizaron y se bloquearon a temperatura ambiente durante 40 minutos con una solución al 2% de albúmina de suero bovino + 10% de suero de cabra en PBS. La expresión del receptor PAR-1 se determinó con un anticuerpo primario policlonal que reconoce la secuencia amino terminal, las células se incubaron con el anticuerpo sc-5605 a una dilución de 1:100 durante 24 horas a 4 C en una cámara húmeda. Las células se lavaron 3 veces con PBS durante 5 min c/u y se incubó el anticuerpo secundario Alexa 568 a una concentración 1:200 durante 1 hora a temperatura ambiente. Los núcleos se tiñeron con Hoechst (2  g/mL, PBS). Las microfotografías se obtuvieron con un microscopio de epifluorescencia Olympus 1X71 con un aumento de 40x y el software Qcapture Pro 6.0 .

## **5.6 Estimación de los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$**

Las células se sembraron sobre cubreobjetos (7 x 50 mm) pre-tratados con 10  g/mL poli-L-lisina en cajas Petri de 60 mm. Se sustituyó el medio de cultivo por una solución isosc mica y las células se incubaron con 2  M de Fura 2-AM durante 30 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente. Después las células se dejaron durante 5 minutos en una solución isosc mica libre del indicador y se introdujeron verticalmente en celdas para espectrofluor metro con 2 mL de una solución isosc mica. Al estabilizarse la emisión basal (100 seg) la solución experimental se hizo hiposmolar por la adición de 1mL de una solución libre de NaCl en presencia de ionomicina (1  M), un ionóforo hidrofóbico de  $Ca^{2+}$  que se intercala en la bicapa lipídica de la membrana celular y permite el flujo de  $Ca^{2+}$  en favor de su gradiente de concentración, trombina (5 U/mL) o el péptido TFLLRNH<sub>2</sub> (10  M) y se siguió el curso temporal durante 200 seg más. Los cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$  se determinaron por la variación

en la fluorescencia, el Fura 2-AM es un indicador cuantitativo de alta afinidad que permite monitorear la dinámica del calcio libre en el citosol. El indicador fue excitado con una longitud de onda alternada entre 340 y 380 nm, cuando está unido a  $\text{Ca}^{2+}$  y cuando está libre, respectivamente. La intensidad de la fluorescencia emitida fue monitoreada a 510 nm cada 3 segundos. La relación de los valores obtenidos de la fluorescencia a 340/380nm correlaciona directamente con la cantidad de calcio intracelular. Se utilizó el espectrofluorómetro Fluoromax-3 Horiba y la adquisición de datos se hizo con el software DataMax®.

### **5.7 Estimación de los cambios en el volumen celular**

Los cambios relativos en el volumen celular se estimaron con la técnica de dispersión de luz de ángulo amplio descrito en Pedersen et al, 2002. Las células se sembraron sobre cubreobjetos (7 x 50 mm) pre-tratados con 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  poli-L-lisina en cajas Petri de 60mm. Se sustituyó el medio de cultivo por una solución isosmótica y las células se dejaron adecuar por 30 min. Los cubreobjetos se introdujeron verticalmente en celdas para espectrofluorómetro en un ángulo de 50° respecto a la luz de excitación con 2 mL de una solución isosmótica control con o sin glucosa según fuera el caso; la excitación se calibró a 585 nm usando una lámpara de argón-arc y la emisión se detectó a la misma longitud de onda. Durante los primeros 100 seg se determinó la emisión en condiciones basales y después se agregó el estímulo hiposmótico 30% o de isquemia química, por la adición de 1 mL de una solución sin NaCl o de 1 mL de una solución de isquemia química, en presencia o ausencia de inhibidores. Los resultados se expresaron como la función inversa de la señal de emisión obtenida porque la variación de la intensidad de la luz correlaciona inversamente con el volumen celular. La gráfica del curso temporal del cambio en el volumen celular se construyó con el cociente  $I_0/I_t$ , en la que  $I_0$  es el promedio de la señal de emisión basal e  $I_t$  es la emisión obtenida en el tiempo t. Se utilizó el

espectrofluorómetro Fluoromax-3 Horiba y la adquisición de datos se hizo con el programa DataMax®.

### **5.8 Determinación de la viabilidad celular**

Los astrocitos y las neuronas se sembraron sobre cajas Petri de 35 mm a una densidad de  $2.1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> y  $2.1 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> respectivamente. Se sustituyó el medio de cultivo por una solución control con o sin floretina (100 µM) durante 30 min, el inhibidor se mantuvo durante todo el experimento. Después se sustituyó por la solución experimental y a los 40 min se adicionaron 5 U/mL de trombina. Las células necróticas se detectaron por la exclusión de yoduro de propidio (10 µg/mL; rojo), un indicador fluorescente que se intercala y reacciona con el DNA de células cuya membrana celular está comprometida; para el conteo total de células los núcleos se tiñeron con Hoechst (6 µg/mL; azul) un indicador fluorescente que permea a través de la membrana plasmática y se une al DNA. Ambos indicadores se disolvieron en PBS. Los astrocitos corticales se preincubaron con Hoechst por 15 minutos y con yoduro de propidio por 5 min, las neuronas fueron incubadas con Hoechst por 1 hr y con yoduro de propidio por 5 min. Después del tiempo de incubación las células se lavaron una vez y las microfotografías se obtuvieron con un microscopio de epifluorescencia Olympus 1X71 con un aumento de 10x y con el programa QCapture Pro 6.0®. La cuantificación de las células muertas se determinó en cada fotografía con la proporción del número de células positivas a yoduro de propidio sobre el número de células totales positivas a Hoechst usando el programa ImageJ®.

## **5.9 Análisis de datos**

La significancia estadística para comparaciones múltiples se determinó con un ANDEVA seguido de una prueba post hoc de Tukey. Se utilizó el software Prism versión 5, Graphpad® (La Jolla, CA, EUA).

## **6. RESULTADOS**

El presente proyecto de investigación buscó describir las características de la movilización de glutamato como un osmolito y la posible potenciación por trombina en condiciones de edema en astrocitos y neuronas en cultivo obtenidas de distintas regiones del cerebro de rata. Se investigaron dos condiciones que generan edema celular, por una reducción en la osmolaridad externa (edema hiposmótico) y por un tratamiento *in vitro* que simula la isquemia cerebral *in vivo* (edema isosmótico). El curso temporal de la movilización de glutamato se realizó por la técnica de perfusión descrita en Vázquez-Juárez et al., 2008, detallada en los métodos. En todos los experimentos se utilizó al D-aspartato, un análogo no metabolizable del L-glutamato, marcado con tritio.

### **6.1 Edema hiposmótico**

#### **6.1.1 Astrocitos**

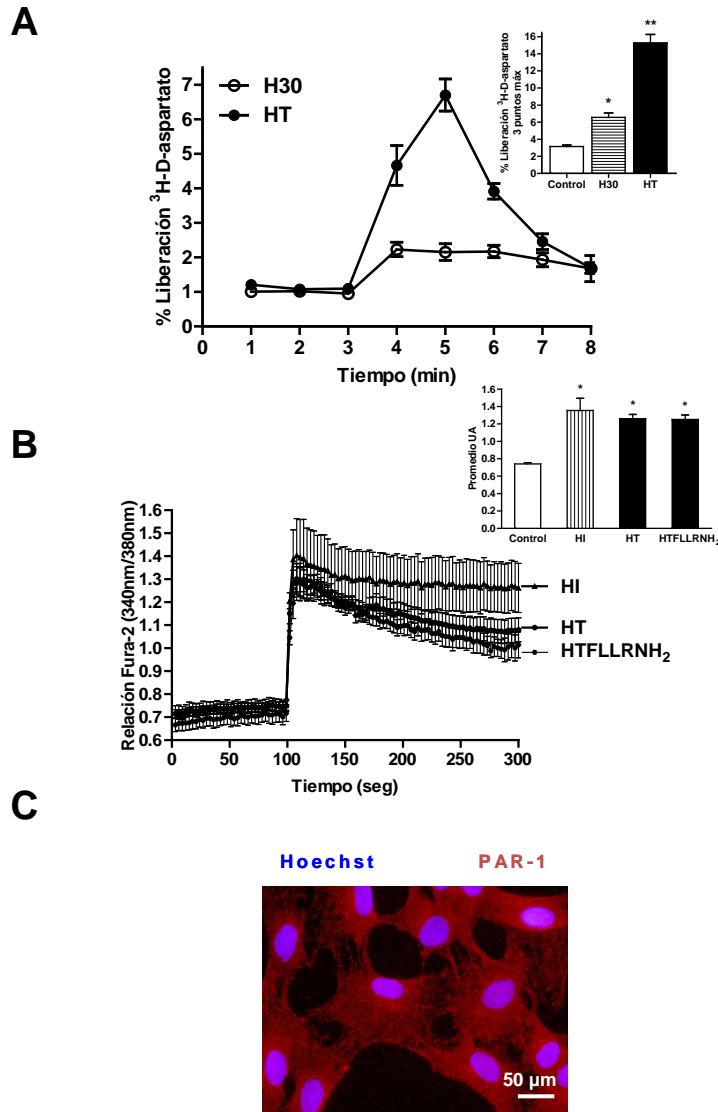
En un trabajo previo del grupo de Pasantes y col., (Ramos-Mandujano et al., 2007) se describió un efecto muy notable de la trombina al incrementar la liberación de glutamato inducida por una condición hiposmótica. En el presente estudio se hizo una comparación entre las respuestas de los astrocitos de cerebelo con astrocitos corticales y se caracterizó el mecanismo responsable del efecto de la trombina. En los astrocitos de cerebelo en cultivo hubo un incremento en la liberación del D-aspartato en respuesta al estímulo hiposmótico 30% (H30) que fue potenciada por la adición de 5 U/mL de trombina al estímulo H30 (HT). El mayor efecto se presentó en el pico de liberación que ocurrió en los 3 minutos siguientes a la adición del estímulo, el D-aspartato liberado por la condición hiposmótica fue de 6.6% e incrementó a 15.3% inducido por la trombina, una potenciación de 2.3 veces. En los 5 minutos de exposición a la condición HT

se liberó el 19.5% del total de la poza de D-aspartato. Este resultado reprodujo el obtenido anteriormente por Ramos-Mandujano y colaboradores (2007), en ese mismo trabajo se demostró que los efectos de trombina en los astrocitos de cerebelo ocurren a través de su acción proteolítica sobre el receptor PAR-1.

Los cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$  por un estímulo HT se estimaron usando el indicador Fura-2 AM y se compararon con los de la ionomicina, un ionóforo de calcio, (1  $\mu$ M, HI), así como con el péptido sintético agonista TFLLRNH<sub>2</sub> que activa al receptor PAR-1 sin su corte proteolítico (HTFLLRNH<sub>2</sub>) (figura 1B). Se detectó la expresión del receptor PAR-1 en los astrocitos de cerebelo por inmunocitoquímica utilizando el anticuerpo sc-5605 que reconoce la secuencia amino terminal de este receptor (figura 1C).

En los astrocitos corticales la trombina tuvo efectos muy semejantes a los observados en los astrocitos de cerebelo. El incremento en la liberación del D-aspartato por una condición hiposmótica mostró un curso temporal similar en los dos tipos celulares, se liberó 5.7% y 12.2% de D-aspartato por un estímulo H30 y HT, respectivamente, una potenciación de 2.2 veces. La liberación por la exposición al estímulo HT durante 5 minutos fue de 15.6% de la poza de glutamato marcada (figura 2A).

El mecanismo responsable de la acción de la trombina no había sido caracterizado en este tipo celular, por lo que en este trabajo se examinaron los elementos más importantes del fenómeno de potenciación de la liberación osmosensible de glutamato. La trombina es una serina proteasa y para determinar si sus efectos en los astrocitos dependen de su actividad proteolítica se utilizó el PPACK (1  $\mu$ M), un inhibidor irreversible que forma un enlace covalente



**Figura 1. La trombina tiene un efecto potenciador sobre la liberación osmosensible de <sup>3</sup>H-D-aspartato en cultivos primarios de astrocitos de cerebelo.** **A.** La liberación curso temporal de <sup>3</sup>H-D-aspartato por una reducción del 30% en la osmolaridad externa (H30, ○) y por la adición de 5U/mL de trombina al estímulo H30 (HT, ●). Los puntos representan la radioactividad liberada en cada fracción, expresada como el porcentaje liberado con respecto al total incorporado; los primeros tres puntos corresponden a la liberación basal, el estímulo H30 o HT fue agregado al tiempo t=3. Las barras representan la radioactividad liberada en las tres fracciones principales del pico de liberación de cada condición. **B.** El Curso temporal de la dinámica de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> por la adición de 1 μM de ionomicina (HI), 5 U/mL de trombina (HT) o 10 μ M de FLLRNH<sub>2</sub> al estímulo H30. La [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> se determinó con fura-2, AM como se detalla en métodos. Los resultados están expresados como la relación en la intensidad de fluorescencia (340/380 nm). Las barras representan el valor promedio de la intensidad de fluorescencia durante 30 segundos en condiciones basales o tras la adición del estímulo. **C.** La expresión del receptor PAR-1 se detectó por inmunocitoquímica con un anticuerpo primario anti-PAR1, seguido del anticuerpo secundario Alexa 568 (rojo). Los núcleos se tiñeron con Hoechst (azul). Las microfotografías se obtuvieron con un microscopio de epifluorescencia como se detalla en métodos. Los datos mostrados son la media ± error estándar. La significancia estadística se determinó con un ANDEVA seguido de una prueba de Tukey; significativamente diferente de Control \*p<0.05, significativamente diferente de H30 \*\*p<0.05; n≥4.

con la serina del sitio catalítico (Kovach et al., 2009). La incubación de la trombina con el PPACK previno por completo la potenciación de la liberación hiposmótica del D-aspartato (figura 2A).

A consecuencia de esta actividad proteolítica, la trombina desenmascara una nueva secuencia amino-terminal que constituye el ligando activador de los receptores PAR, de los que se han identificado 4 subtipos (PAR1-4), el receptor PAR-1 es el prototipo y el miembro más ubicuo de esta familia. La trombina puede activar a tres de los cuatro subtipos identificados de receptores PAR (Coughlin, 2005). Se identificó el subtipo que está mediando el efecto de la trombina en los astrocitos corticales utilizando un péptido sintético agonista específico de esta isoforma, el TFLLRNH<sub>2</sub> (10 μM) (Hollenberg, 2003) cuya unión de manera independiente al corte proteolítico del receptor activa al receptor PAR-1. El péptido sintético agonista TFLLRNH<sub>2</sub> reprodujo íntegramente el efecto de la trombina sobre la liberación del D-aspartato (figura 2A).

Los receptores PAR pertenecen a la familia de los GPCR, por lo que su activación inicia una cadena de señalización con múltiples elementos y reacciones intracelulares. Una de éstas es el incremento en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> que ocurre a través de la vía PLC/IP<sub>3</sub>. El incremento en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> subsecuente a la interacción de la trombina con el receptor PAR-1 se muestra en la figura 2B y representa una evidencia funcional de la expresión del receptor. Este incremento en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> es de una magnitud similar al que genera la ionomicina, aunque su curso temporal es distinto, ya que en el caso de la trombina el incremento en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> puede reducirse por los sistemas amortiguadores de la célula, lo que no puede ocurrir en el caso de la ionomicina. Esta respuesta se replicó por el péptido sintético agonista TFLLRNH<sub>2</sub> (figura 2B). El incremento en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> es un factor determinante para la acción potenciadora de la trombina sobre la liberación del D-aspartato ya que cuando se previene este incremento mediante la omisión del Ca<sup>2+</sup> en las soluciones experimentales, junto con la acción del quelante BAPTA/BAPTA-AM, se previno

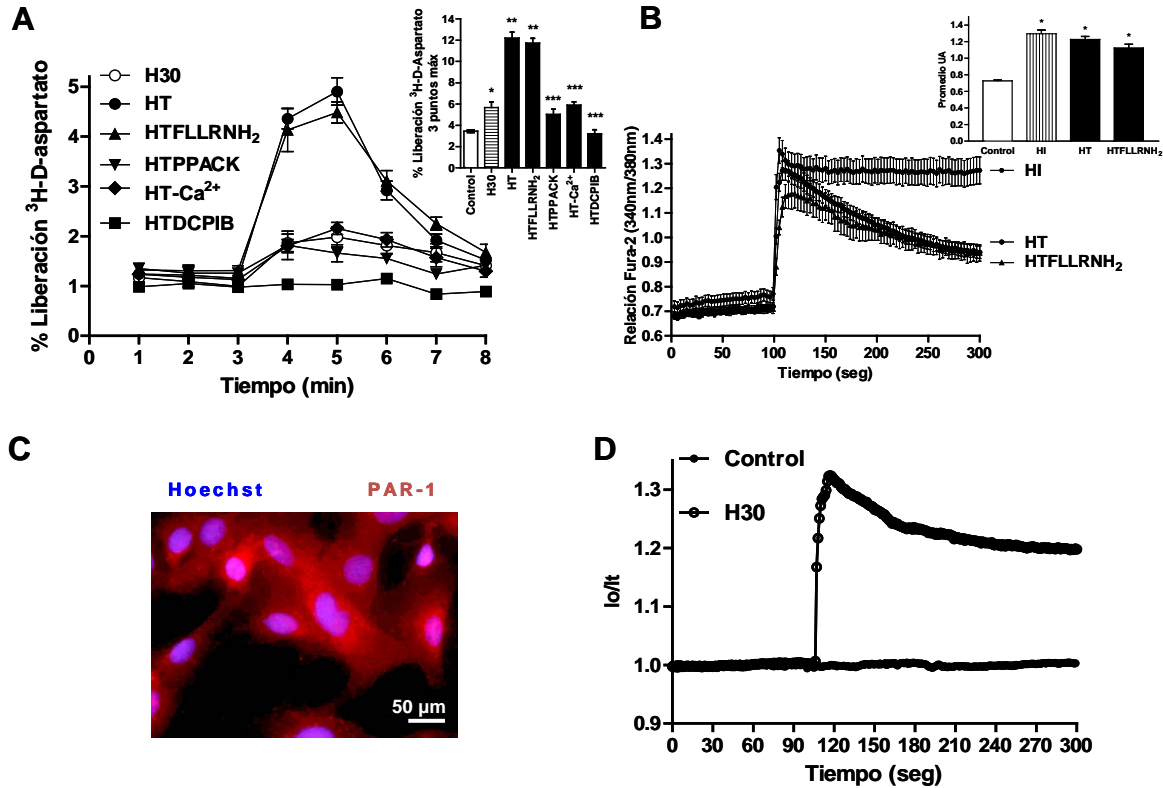


igualmente la potenciación por trombina (figura 2A). Además, mediante técnicas de inmunocitoquímica se detectó que los astrocitos corticales expresan el receptor PAR-1 (figura 2C).

Los astrocitos corticales responden al estímulo hiposmótico con un aumento muy rápido en el volumen, seguido por el decremento regulador de volumen (DRV) (figura 2D). Este mecanismo se puede prevenir por una serie de inhibidores de canales de  $\text{Cl}^-$ , entre los cuales el DCPIB se ha reportado como un inhibidor específico de la vía (Decher et al., 2001). El DCPIB (10  $\mu\text{M}$ ) bloqueó por completo la liberación de D-aspartato en respuesta al estímulo hiposmótico y a la presencia de trombina (figura 2A). Este resultado indica que la liberación del D-aspartato y su potenciación por trombina tienen lugar a través de la vía sensible a volumen presente en los astrocitos.

### **6.1.2 Neuronas**

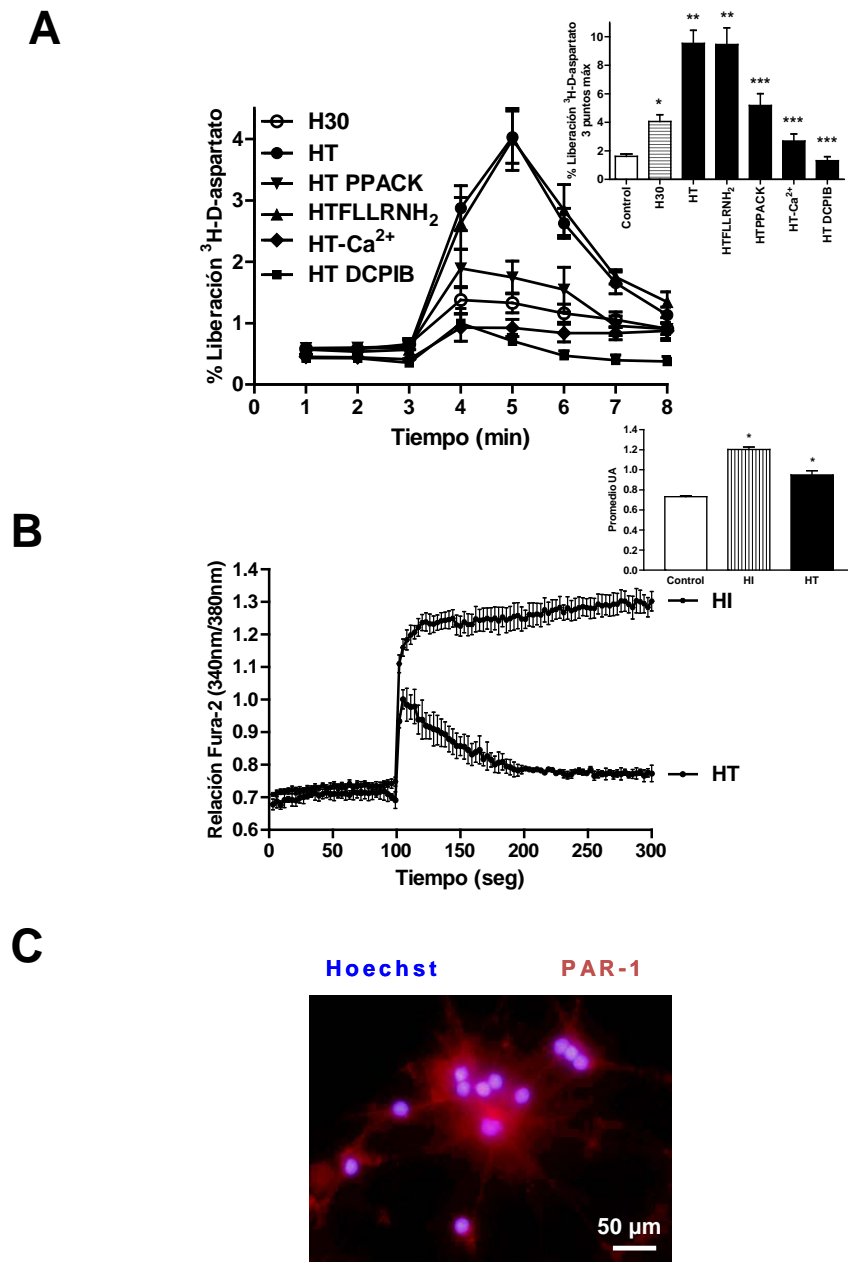
Los astrocitos son el tipo celular en el sistema nervioso central de los mamíferos que muestra mayores perturbaciones en el volumen como una respuesta a condiciones patológicas. Para determinar si la potenciación de la trombina sobre la liberación hiposmótica del D-aspartato es una respuesta exclusivamente glial o si también puede presentarse en neuronas se hicieron experimentos de liberación de D-aspartato en cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo (NGC), neuronas de hipocampo (NH) y neuronas corticales (NC).



**Figura 2.** La trombina tiene un efecto potenciador sobre la liberación osmosensible de <sup>3</sup>H-D-aspartato a través del corte proteolítico del receptor PAR-1 en cultivos primarios de astrocitos de corteza. **A.** La liberación curso temporal de <sup>3</sup>H-D-aspartato por una reducción del 30% en la osmolaridad externa (H30, ○) y la adición de 5U/mL de trombina al estímulo H30 (HT, ●). Los puntos representan la radioactividad liberada en cada fracción, expresada como el porcentaje liberado con respecto al total incorporado; los primeros tres puntos corresponden a la liberación basal, los estímulos H30, HT, HTPPACK (1 μM, ▼), HTFLLRNH<sub>2</sub> (10 μM, ▲), HT-Ca<sup>2+</sup> (◆), HTDCPIB (10 μM, ■) detallados en métodos, fueron agregados al tiempo t=3. Las barras representan la radioactividad liberada en las tres fracciones principales del pico de liberación de cada condición. **B.** El Curso temporal de la dinámica de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> por la adición de 1 μM de ionomicina (HI) o 5 U/mL de trombina (HT) al estímulo H30. La [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> se determinó con fura-2, AM como se detalla en métodos. Los resultados se expresaron como la relación en la intensidad de fluorescencia (340/380 nm). Las barras representan el valor promedio de la intensidad de fluorescencia durante 30 segundos en condiciones basales o tras el estímulo. **C.** La expresión del receptor PAR-1 se detectó por inmunocitoquímica con un anticuerpo primario anti-PAR1, seguido del anticuerpo secundario Alexa 568 (rojo). Los núcleos se tiñeron con Hoechst (azul). Las microfotografías se obtuvieron con un microscopio de epifluorescencia. **D.** Trazo representativo de los cambios relativos en el volumen celular, estimados por el sistema de dispersión de luz, tras la exposición a un estímulo H30. Los datos mostrados son la media ± error estándar. La significancia estadística se determinó con un ANDEVA seguido de una prueba de Tukey; significativamente diferente de Control \*p<0.05, significativamente diferente de H30 \*\*p<0.05, significativamente diferente de HT \*\*\*p<0.05; n≥7.

En un trabajo previo de Pasantes y col. (1993) se describió que las NGC aumentan su volumen celular cuando son expuestas a una reducción del 30% en la osmolaridad externa y como parte del proceso regulador de volumen liberan osmolitos tales como el  $K^+$ , el  $Cl^-$  y la taurina, pero se desconoce si el glutamato también se moviliza como respuesta a esta condición.

La liberación de D-aspartato de NGC en respuesta a un estímulo H30 aumentó de 1.6% en condiciones control a 4.1%, el efecto de la trombina sobre esta liberación la incrementó a 9.5%, una potenciación de 2.3 veces (figura 3A). El efecto potenciador fue similar al observado en los astrocitos, pero la cantidad liberada 12.3% en los 5 minutos del experimento fue menor. El efecto de la trombina sobre la liberación hiposmótica se previno por completo en presencia del bloqueador de la vía osmosensible, el DCPIB (10  $\mu$ M) (figura 3A). También el efecto fue igualmente dependiente de su actividad proteolítica como lo muestran los efectos del PPACK (1  $\mu$ M) que inhibió en su totalidad el efecto de la trombina. La participación del subtipo PAR-1 se confirmó cuando el péptido sintético agonista de este receptor, el TFLLRNH<sub>2</sub> (10 $\mu$ M), reprodujo los efectos de la trombina (figura 3A). La acción de la trombina sobre la liberación osmosensible de D-aspartato dependió de un incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  evocado por la trombina ya que la potenciación de esta liberación no se observó en condiciones libres de  $Ca^{2+}$  (Fig. 3A). La magnitud del incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  generada por la trombina se comparó con la inducida por ionomicina (figura 3B). En congruencia con estos resultados, se observó la expresión PAR-1 en este tipo neuronal (figura 3C).

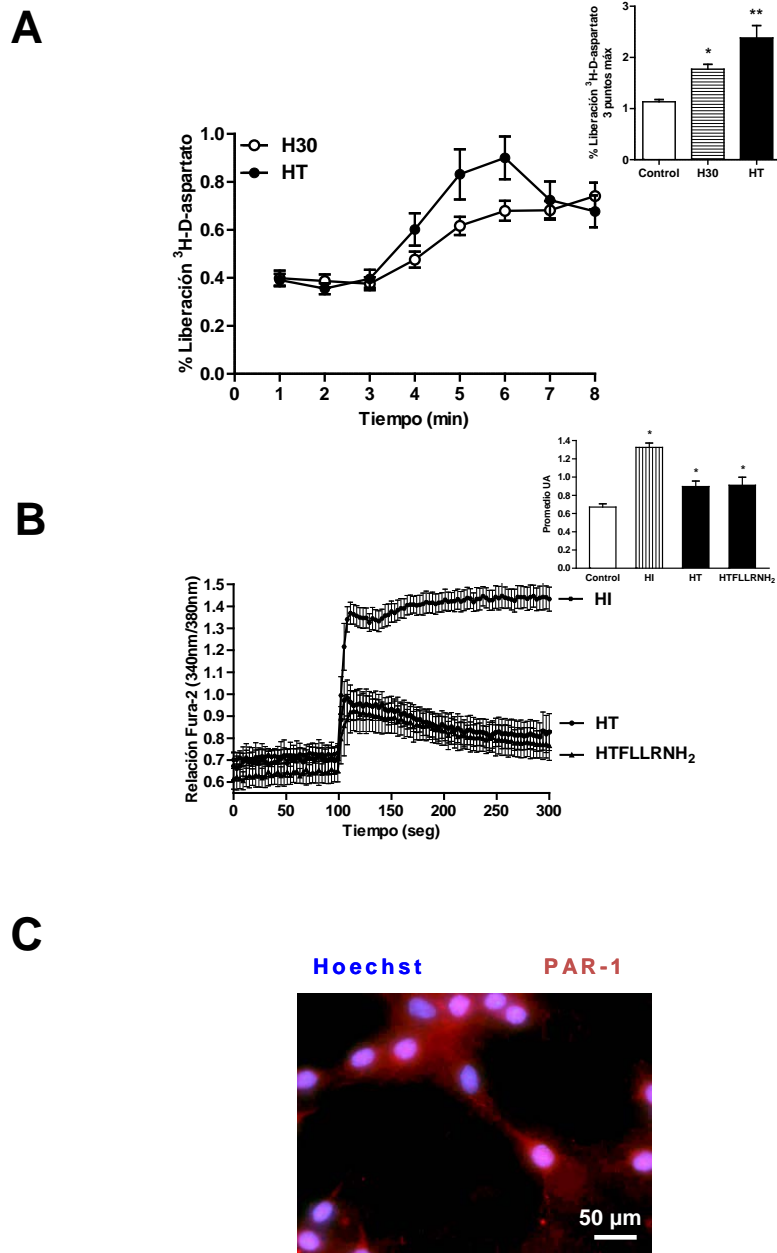


**Figura 3. La trombina tiene un efecto potenciador sobre la liberación osmosensible de  $^3\text{H-D-aspartato}$  a través del corte proteolítico del receptor PAR-1 en cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo. A.** La liberación curso temporal de  $^3\text{H-D-aspartato}$  por una reducción del 30% en la osmolaridad externa (H3O,  $\circ$ ) y la adición de 5U/mL de trombina al estímulo H3O (HT,  $\bullet$ ). Los puntos representan la radioactividad liberada en cada fracción, expresada como el porcentaje liberado con respecto al total incorporado; los primeros tres puntos corresponden a la liberación basal, los estímulos H3O, HT, HTPPACK (1  $\mu\text{M}$ ,  $\blacktriangledown$ ), HTFLLRNH<sub>2</sub> (10  $\mu\text{M}$ ,  $\blacktriangle$ ), HT -Ca<sup>2+</sup> ( $\blacklozenge$ ), HTDCPIB (10  $\mu\text{M}$ ,  $\blacksquare$ ) detallados en métodos, fueron agregados al tiempo t=3. Las barras representan la radioactividad liberada en las tres fracciones principales del pico de liberación de cada condición. **B.** El Curso temporal de la dinámica de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> por la adición de 1  $\mu\text{M}$  de ionomicina (HI), 5U/mL de trombina (HT) o 10  $\mu\text{M}$  de TFLLRNH<sub>2</sub> al estímulo H3O. La [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> se determinó con fura-2, AM como se detalla en métodos. Los resultados se expresaron como la relación en la intensidad de fluorescencia (340/380 nm). Las barras representan el valor promedio de la intensidad de fluorescencia durante 30 segundos en condiciones basales o tras el estímulo. **C.** La

expresión del receptor PAR-1 se detectó por inmunocitoquímica con un anticuerpo primario anti-PAR1, seguido del anticuerpo secundario Alexa 568 (rojo). Los núcleos se tiñeron con Hoechst (azul). Las microfotografías se obtuvieron con un microscopio de epifluorescencia. Los datos mostrados son la media  $\pm$  error estándar. La significancia estadística se determinó con un ANDEVA seguido de una prueba de Tukey; significativamente diferente de Control \* $p < 0.05$ , significativamente diferente de H30 \*\* $p < 0.05$ , significativamente diferente de HT \*\*\* $p < 0.05$ ;  $n \geq 4$ .

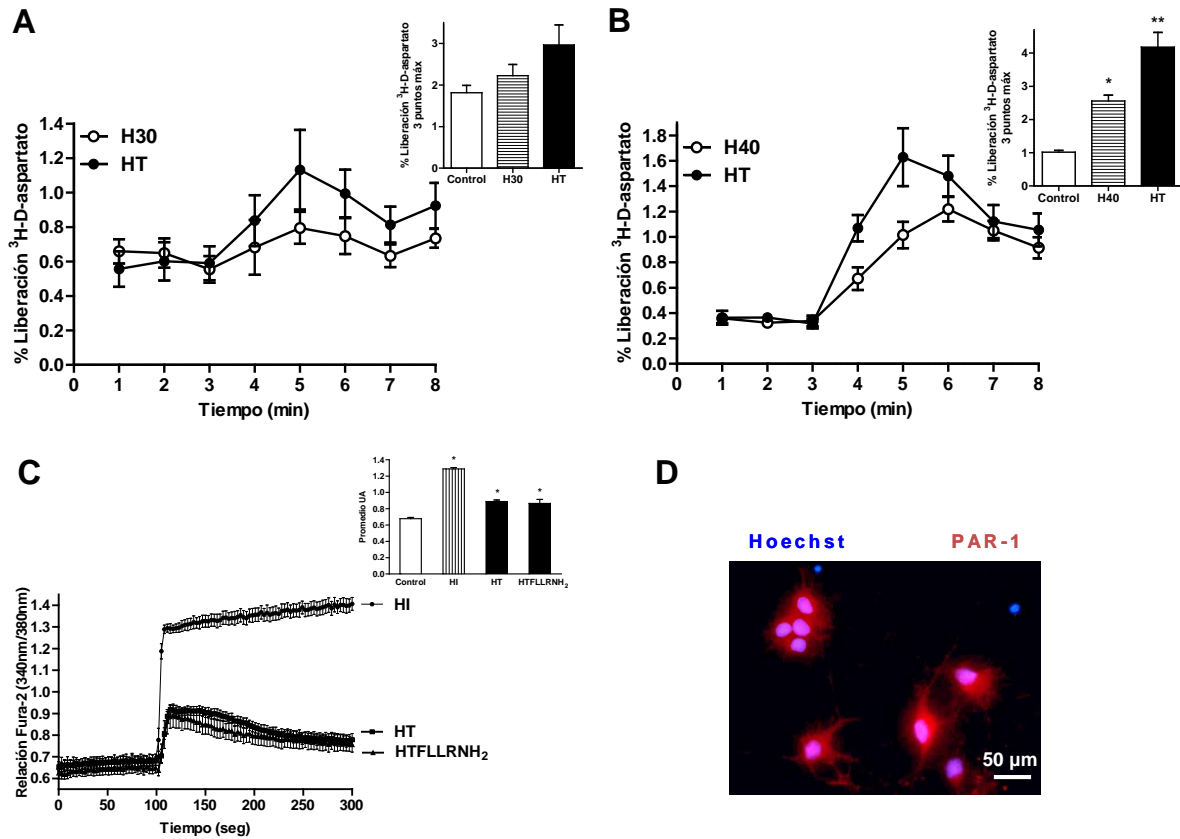
El efecto de la trombina sobre la liberación osmosensible de D-aspartato también se evaluó en neuronas de hipocampo en cultivo. En respuesta al estímulo H30 la liberación de D-aspartato aumentó de 1.1% en condiciones control a 1.8% y la trombina incrementó la liberación al 2.4%, una potenciación de 1.34 veces, la cantidad de D-aspartato liberada fue de 3.7% del total de la poza endógena de glutamato marcado (figura 4A). La trombina generó un incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  en estas neuronas, de menor magnitud que el observado en las NGC y que el evocado por la ionomicina (figura 4B). Se detectó la expresión del receptor PAR-1 en las NH por inmunocitoquímica (figura 4C).

En los cultivos primarios de neuronas corticales no se observó un aumento significativo en la movilización del D-aspartato por el estímulo H30 ni una potenciación en presencia de trombina (figura 5A). Como ya se mencionó anteriormente, el fenómeno de potenciación requiere que la vía activada por volumen se encuentre operando, lo cual prácticamente no ocurrió frente a una reducción de 30% en la osmolaridad externa. En consecuencia se probó un estímulo H40% estímulo la liberación del D-aspartato de 1% a 2.6%, misma que incrementó a 4.2% en presencia de trombina, una potenciación de 1.63 veces (figura 5B). La trombina aumentó la  $[Ca^{2+}]_i$ , aunque la magnitud fue menor que la observada en las NGC y que la inducida por ionomicina (figura 5C). Se detectó por Inmunocitoquímica la expresión del receptor PAR-1 en las NC (figura 5D).



**Figura 4. La trombina tiene un efecto potenciador sobre la liberación osmosensible de <sup>3</sup>H-D-aspartato en cultivos primarios de neuronas de hipocampo. A.** La liberación curso temporal de <sup>3</sup>H-D-aspartato por una reducción del 30% en la osmolaridad externa (H30, ○) y por la adición de 5U/mL de trombina al estímulo H30 (HT, ●). Los puntos representan la radioactividad liberada en cada fracción, expresada como el porcentaje liberado con respecto al total incorporado; los primeros tres puntos corresponden a la liberación basal, el estímulo H30 o HT fue agregado al tiempo t=3. Las barras representan la radioactividad liberada en las tres fracciones principales del pico de liberación de cada condición. **B.** El Curso temporal de la dinámica de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> por la adición de 1 μM de ionomicina (HI), 5 U/mL de trombina (HT) o 10 μM de TFLLRNH<sub>2</sub> al estímulo H30. La [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> se determinó con fura-2, AM como se detalla en métodos. Los resultados están expresados como la relación en la intensidad de fluorescencia (340/380 nm). Las barras representan el valor promedio de la intensidad de fluorescencia durante 30 segundos en condiciones basales o tras la adición del estímulo. **C.** La expresión del receptor PAR-1 se detectó por inmunocitoquímica con un anticuerpo primario anti-PAR1, seguido del anticuerpo secundario Alexa 568 (rojo). Los núcleos se tiñeron con

Hoechst (azul). Las microfotografías se obtuvieron con un microscopio de epifluorescencia como se detalla en métodos. Los datos mostrados son la media  $\pm$  error estándar. La significancia estadística se determinó con un ANDEVA seguido de una prueba de Tukey; significativamente diferente de Control \* $p < 0.05$ , significativamente diferente de H30 \*\* $p < 0.05$ ,  $n \geq 4$ .



**Figura 5.** La trombina tiene un efecto potenciador sobre la liberación osmosensible de <sup>3</sup>H-D-aspartato en cultivos primarios de neuronas de corteza. **A y B.** La liberación curso temporal de <sup>3</sup>H-D-aspartato por una reducción del 30% (H30,  $\circ$ ) o del 40% (H40,  $\circ$ ) y por la adición de 5U/mL de trombina al estímulo hiposmótico (HT,  $\bullet$ ). Los puntos representan la radioactividad liberada en cada fracción, expresada como el porcentaje liberado con respecto al total incorporado; los primeros tres puntos corresponden a la liberación basal, el estímulo hiposmótico o HT, detallado en método, fue agregado al tiempo  $t=3$ . Las barras representan la radioactividad liberada en las tres fracciones principales del pico de liberación de cada condición. **C.** El curso temporal de la dinámica de  $[Ca^{2+}]_i$  por la adición de 1  $\mu$ M de ionomicina (HI), 5 U/mL de trombina (HT) o 10  $\mu$ M de TFLLRNH<sub>2</sub> al estímulo H30. La  $[Ca^{2+}]_i$  se determinó con fura-2, AM como se detalla en métodos. Los resultados están expresados como la relación en la intensidad de fluorescencia (340/380 nm). Las barras representan el valor promedio de la intensidad de fluorescencia durante 30 segundos en condiciones basales o tras la adición del estímulo. **D.** La expresión del receptor PAR-1 se detectó por inmunocitoquímica con un anticuerpo primario anti-PAR1, seguido del anticuerpo secundario Alexa 568 (rojo). Los núcleos se tiñeron con Hoechst (azul). Las microfotografías se obtuvieron con un microscopio de epifluorescencia como se detalla en métodos. Los datos mostrados son la media  $\pm$  error estándar. La significancia estadística se determinó con un ANDEVA seguido de una prueba de Tukey; significativamente diferente de Control \* $p < 0.05$ , significativamente diferente de H30 \*\* $p < 0.05$ ,  $n \geq 6$ .

Los resultados anteriores mostraron que en las neuronas de hipocampo y corteza la potenciación de la liberación osmosensible del D-aspartato por la trombina fue menor que la observada en los astrocitos. Es posible que esta diferencia esté relacionada con la magnitud del incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  inducido por la trombina. Para considerar esta hipótesis se cuantificó el incremento en el  $[Ca^{2+}]_i$  en los 5 tipos celulares, astrocitos corticales y de cerebelo, neuronas granulares de cerebelo, de hipocampo y corticales. El cálculo consideró el porcentaje de incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  en presencia de trombina, tomando como 100% el evocado por la ionomicina. En los astrocitos de cerebelo y de corteza el pico del incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  debido a la trombina fue de magnitud similar al generado por la ionomicina, 84 y 88%, respectivamente, en las neuronas granulares del cerebelo esta proporción fue del 47%, en tanto que en las neuronas de hipocampo y corticales la proporción fue sólo del 35% y 34%, respectivamente (tabla 1).

**Tabla 1. Cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$  liberación de  $^3H$ -D-aspartato por trombina en una condición hiposmótica H30**

Tipo celular	$[Ca^{2+}]_i$	Liberación de $^3H$ -D-aspartato
Astrocitos de cerebelo	84	19.4
Astrocitos de corteza	87	15.6
Neuronas granulares de cerebelo	47	12.3
Neuronas de hipocampo	35	3.7
Neuronas de corteza	34	4.7

Los cambios en  $[Ca^{2+}]_i$  por un estímulo H30 más 5 U/mL de trombina expresados como el porcentaje de aumento con respecto al observado por ionomicina en cada tipo celular. La liberación de  $^3H$ -D-aspartato corresponde al porcentaje liberado en los 5 minutos en cada tipo celular.



## **6.2 Edema Isosmótico**

### **6.2.1. Astrocitos**

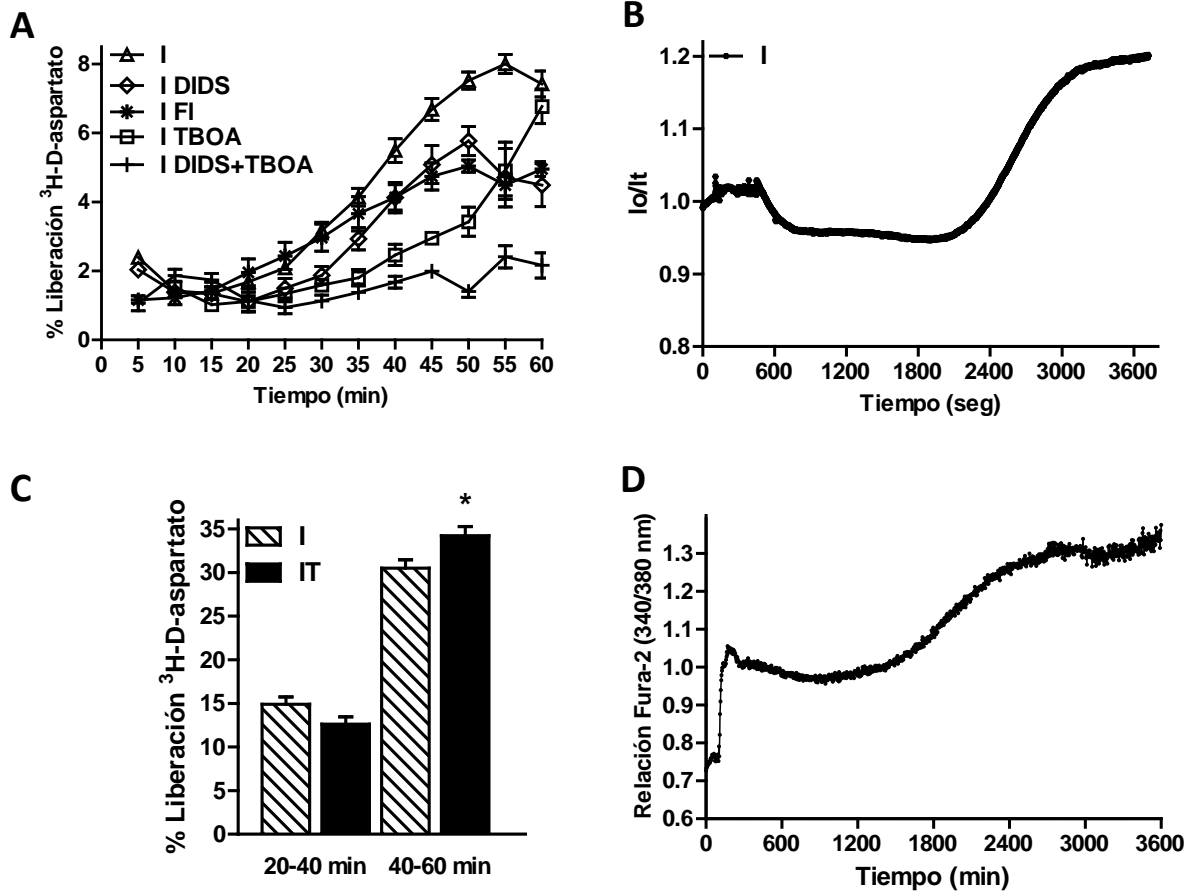
Se desconocen varios aspectos de la respuesta celular cerebral ante un incremento en el volumen en condiciones isosmóticas, a pesar de que existen patologías de relevancia clínica, como la isquemia, que presentan este tipo de hinchamiento. Se estudió la liberación de D-aspartato y el efecto de la trombina en condiciones de edema celular isosmótico. Se utilizó un modelo de isquemia química *in vitro* por inhibición glicolítica y respiratoria, se usaron el iodoacetato de sodio, un inhibidor irreversible de la enzima glicolítica GADPH y la azida de sodio, un inhibidor de la citocromo C oxidasa. La investigación se llevó a cabo en astrocitos corticales y en los mismos tres tipos de neuronas estudiados con el modelo de edema celular hiposmótico.

El curso temporal de la liberación de D-aspartato en los astrocitos corticales en condiciones de isquemia química por inhibición glicolítica y respiratoria mostró una fase inicial con una disminución en la movilización durante los primeros 15 minutos, seguida de un incremento lento a partir del minuto 20 y una segunda fase que aumenta rápidamente a partir del minuto 40 (figura 6A). El curso temporal de la liberación del D-aspartato correlacionó con los cambios en el volumen celular, se observó hinchamiento celular a partir del minuto 40, que aumentó hasta en un 20% (figura 6B).

Dentro de los mecanismos responsables de la movilización del D-aspartato en condiciones de isquemia química en los astrocitos corticales, se consideraron la operación en reversa del transportador de glutamato y la activación de la vía sensible a volumen, ambos consecuencia de la falla energética y de la pérdida subsecuente de los gradientes iónicos

transmembranales. La actividad reversa del transportador fue la principal vía de movilización de D-aspartato por isquemia química, fue sensible un 52% al TBOA (10  $\mu$ M) en ambas fases del curso temporal. La activación de la vía sensible a volumen también participó como un mecanismo de liberación de D-aspartato por isquemia química, aunque no fue sensible a la acción del DCPIB, sino que por el contrario incrementó su movilización, se inhibió con DIDS (10  $\mu$ M) aproximadamente un 33% en ambas fases, mientras que la floretina (100  $\mu$ M) tuvo un efecto de inhibición mayor en la segunda fase, que corresponde a un componente sensible a volumen hacia el final del tratamiento. Además el tratamiento simultáneo con el TBOA y el DIDS tuvo un efecto aditivo previniendo casi por completo la movilización de D-aspartato (figura 6A, Tabla 2).

Para evaluar el efecto de la trombina sobre la salida de D-aspartato en condiciones de isquemia química, ésta se aplicó en dos momentos distintos, uno simultáneamente a la condición de isquemia, y el otro en el minuto 40 de la exposición al tratamiento. Como se observa en la figura 6C en la primera condición (barras blancas) no se afectó la liberación del D-aspartato, mientras que en la segunda (barras negras) se observó un incremento modesto de 20% sobre la liberación en presencia de trombina. El tratamiento de isquemia química provoca un incremento continuo en la  $[Ca^{2+}]_i$  (figura 6D).



**Figura 6. La isquemia química es una condición de aumento en volumen en cultivos primarios de astrocitos de corteza. A.** La liberación curso temporal de <sup>3</sup>H-D-aspartato por la exposición a isquemia química por inhibición glicolítica y respiratoria (I). Los puntos representan la radioactividad liberada en cada fracción, expresada como el porcentaje liberado con respecto al total incorporado; el primer punto corresponde a la liberación control, el estímulo I fue agregado al tiempo t=5, en presencia o ausencia de inhibidores. **B.** Trazo representativo de los cambios relativos en el volumen celular por la exposición a Isquemia utilizando el sistema de dispersión de luz. **C** Las barras y la tabla indican la radioactividad liberada en cuatro colectas en el intervalo de tiempo indicado para cada condición. **D.** Trazo representativo de los cambios en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> provocados por el tratamiento de isquemia química. Los resultados están expresados como la relación en la intensidad de fluorescencia (340/380 nm). Los datos mostrados son la media ± error estándar. La significancia estadística se determinó con un ANDEVA seguido de una prueba de Tukey; significativamente diferente de I \*p<0.05, n≥6.

**Tabla 2. La liberación de <sup>3</sup>H-D-aspartato por isquemia química en los astrocitos corticales.**

Tratamiento	20-40 min		40-60 min	
	Liberación de <sup>3</sup> H-D-aspartato	%	Liberación de <sup>3</sup> H-D-aspartato	%
<b>Isquemia (I)</b>	14.9		30.5	
<b>I + TBOA</b>	7.2	↓52	14.7	↓52
<b>I + DIDS</b>	9.6	↓36	20.9	↓31
<b>I + Floretina</b>	13.2	↓11	18.9	↓38
<b>I + DIDS + TBOA</b>	5.1	↓66	8.0	↓74
<b>I + DCPIB</b>	21.5	↑44	38.4	↑26

Los astrocitos corticales en cultivo fueron expuestos a una condición de isquemia química como se describe en métodos. La liberación de <sup>3</sup>H-D-aspartato corresponde al porcentaje liberado en el periodo de tiempo indicado.

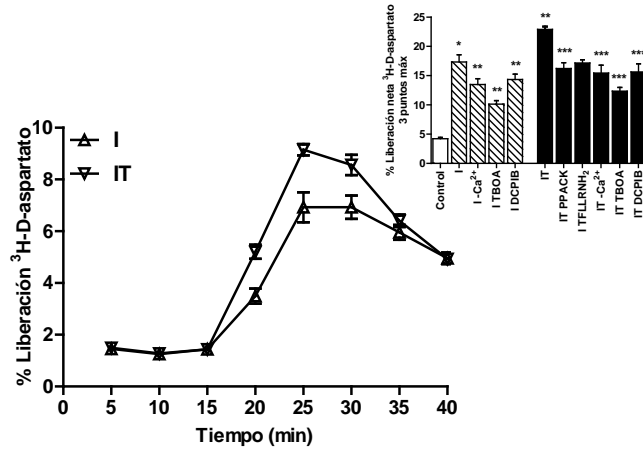
### **6.2.2 Neuronas**

La respuesta de liberación de D-aspartato por el tratamiento de isquemia química por inhibición glicolítica y respiratoria mostró un curso temporal similar entre los diferentes tipos de neuronas examinadas pero que fue distinto al que se observó en los astrocitos corticales, en cuanto a la cantidad de D-aspartato movilizado, se observó una mayor liberación en las neuronas granulares de cerebelo. En todos los casos la liberación tuvo un rápido incremento, que alcanzó un pico 10 minutos después de iniciado el tratamiento. El total del D-aspartato liberado en el transcurso del experimento (25 minutos) fue de 29%, 27% y 18% en las neuronas

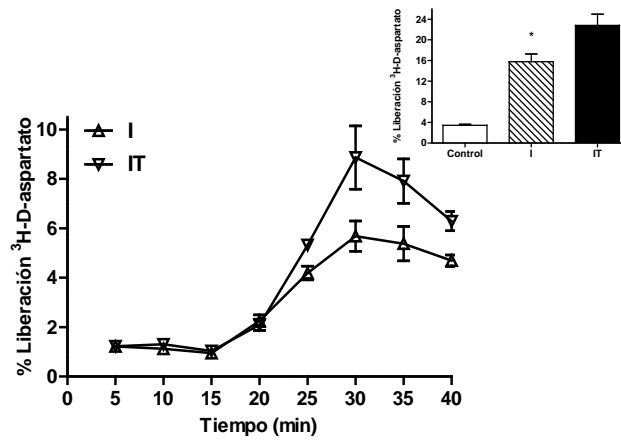
granulares de cerebelo, de hipocampo y de corteza, respectivamente. La adición de 5 U/mL de trombina al estímulo incrementó la movilización del D-aspartato en las neuronas granulares de cerebelo y de hipocampo, mientras que no se observó efecto en las neuronas corticales (figura 7 A, B, C).

La caracterización de la salida del D-aspartato se llevó a cabo en las neuronas del cerebelo (figura 7A). Se ha documentado que la movilización del glutamato en las neuronas puede ocurrir a través de tres mecanismos: i) la liberación vesicular, ii) la operación reversa del receptor dependiente de energía y iii) por el canal sensible a volumen. Las barras de la figura 7A muestran la contribución de estos tres mecanismos a la liberación en las neuronas granulares del cerebelo, evaluados por el efecto de una solución sin  $\text{Ca}^{2+}$  para evitar la liberación vesicular, el TBOA (10  $\mu\text{M}$ ) para inhibir la actividad reversa del transportador y el DCPIB (10  $\mu\text{M}$ ) para bloquear la vía activada por volumen. Se observó que los dos primeros mecanismos son responsables de una parte importante de la liberación del D-aspartato mientras que se observó una contribución menor de la vía sensible a cambios en volumen (figura 7A). En estas neuronas la presencia de trombina causó un incremento en la liberación del D-aspartato. Al igual que en la condición de edema hiposmótico, el efecto de trombina se previno por la incubación con PPACK (10  $\mu\text{M}$ ) que evita su acción como activador de receptores PAR, así como en condiciones de ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , por el uso de BAPTA. A diferencia de lo que se observó en la condición hiposmótica, el péptido sintético agonista específico de PAR-1, el TFLLRNH<sub>2</sub> (10  $\mu\text{M}$ ), no mimetizó el efecto de la trombina (figura 7A). En las neuronas de hipocampo la estimulación de la liberación de D-aspartato por trombina fue similar a la de las neuronas del cerebelo (figura 7B), en tanto que no se observó ninguna potenciación por trombina sobre la salida de D-aspartato en las neuronas corticales (figura 7C).

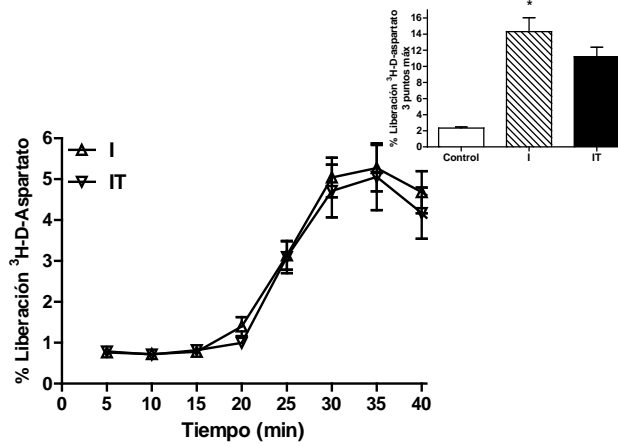
**A**



**B**



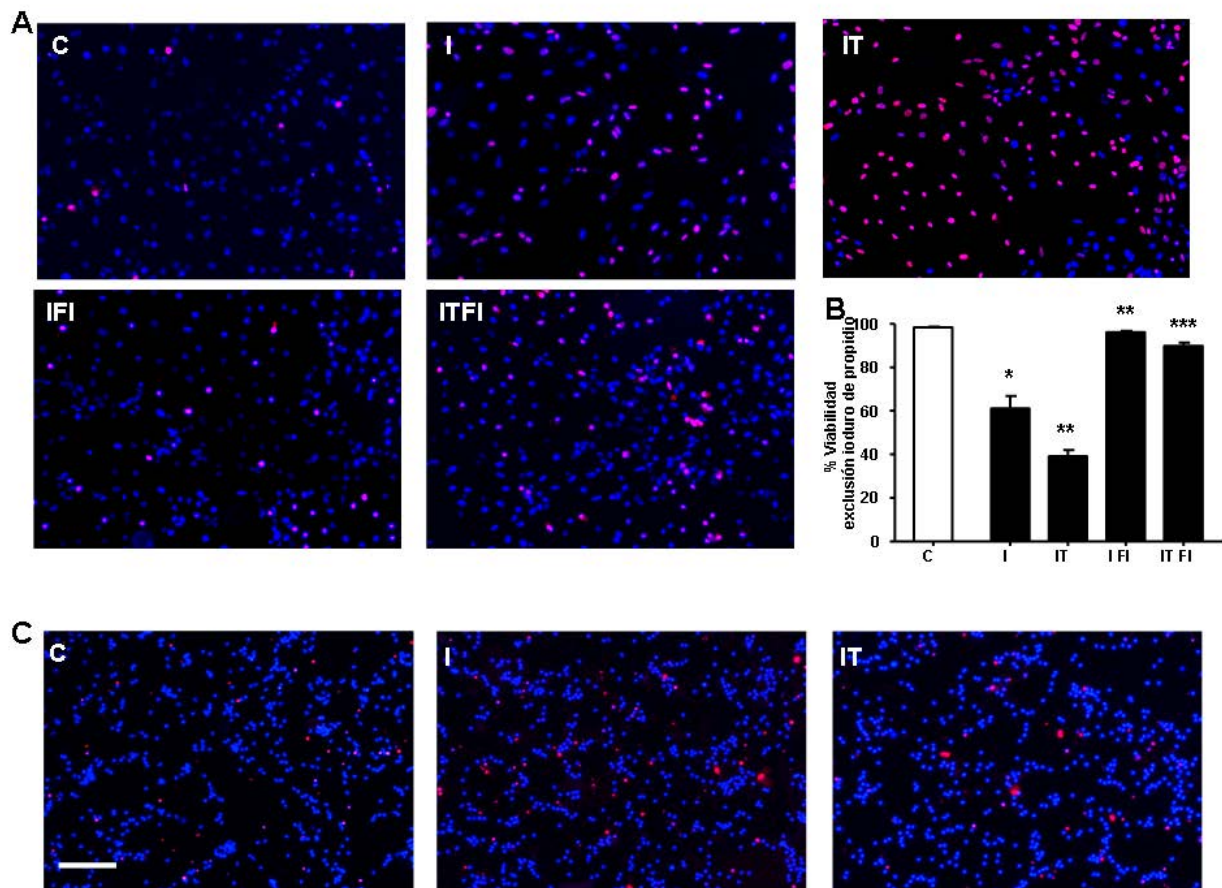
**C**



**Figura 7. La isquemia química es una condición de aumento en volumen en cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo, de hipocampo y de corteza. A, B y C.** La liberación curso temporal de <sup>3</sup>H-D-aspartato por la exposición a isquemia química por inhibición glicolítica y respiratoria (I). Los puntos representan la radioactividad liberada en cada fracción, expresada como el porcentaje liberado con respecto al total incorporado; el primer punto corresponde a la liberación basal, el estímulo I fue agregado al tiempo t=15, en presencia o ausencia de inhibidores. Las barras representan la radioactividad liberada en las tres principales fracciones del pico de liberación para cada condición. Los datos mostrados son la media ± error estándar. La significancia estadística se determinó con un ANDEVA seguido de una prueba de Tukey; significativamente diferente del control \*p<0.05, significativamente diferente de I \*\*p<0.05, significativamente diferente de IT \*\*\*p<0.05; n≥6.

### **6.2.3. Viabilidad celular**

Uno de los objetivos de esta investigación fue el de explorar los efectos del incremento en los niveles de glutamato (medido como D-aspartato) en la viabilidad de neuronas y astrocitos, así como la acción de la trombina al incrementar estos niveles por su efecto sobre la vía sensible a volumen. La viabilidad celular se determinó por la exclusión de yoduro de propidio, un marcador de muerte celular necrótica. En los astrocitos corticales el tratamiento de isquemia química durante 1 hora incrementó la muerte necrótica de un 4% en los controles a 39% y la adición de trombina a 60%. La floretina (100 µM), que redujo en la salida de D-aspartato a través de la vía sensible al volumen, previno la muerte de los astrocitos, tanto en ausencia como en presencia de trombina (figura 8A y B). A diferencia de lo observado en los astrocitos, en las neuronas granulares de cerebelo la proporción de neuronas con muerte por necrosis fue del 6.5% en las células expuestas a la condición de isquemia química (40 min) y de 6.1% en presencia de trombina (figura 8C), la viabilidad celular no se afectó significativamente en los tiempos en que se evaluó.



**Figura 8. La trombina promueve un aumento en la muerte por isquemia química en cultivos primarios de astrocitos de corteza. A y C.** La detección de células viables y células necróticas se hizo con la tinción de ioduro de propidio (rojo) y los núcleos se tiñeron con Hoechst (azul). Las microfotografías se obtuvieron con un microscopio de epifluorescencia. La barra de escala = 100  $\mu$ M. **B.** Las barras representan el porcentaje de mortalidad para cada condición. Los datos mostrados son la media  $\pm$  error estándar. La significancia estadística se determinó con un ANDEVA seguido de una prueba de Tukey; significativamente diferente de control \* $p < 0.05$ , significativamente diferente de I \*\* $p < 0.05$ , significativamente diferente de IT \*\*\* $p < 0.05$ ;  $n \geq 6$ .



## 7. DISCUSIÓN

El efecto de la trombina al incrementar la movilización osmosensible de glutamato fue descrito por primera vez por Pasantes y colaboradores en cultivos primarios de astrocitos de cerebelo de rata (Ramos-Mandujano et al., 2007). Los resultados de ese estudio mostraron un incremento muy notable sobre la liberación activada por hiposmolaridad en presencia de trombina, así como una disminución en el umbral de osmolaridad requerido para la movilización del glutamato. También se pudo demostrar que el efecto de la trombina se presenta únicamente cuando se ha activado previamente el canal osmosensible a través del cual se desplaza el glutamato.

Los resultados del presente estudio confirman y extienden estas observaciones previas, demostrando que la respuesta de los astrocitos corticales es similar en sus características a la observada en astrocitos cerebelares, en tanto que las neuronas muestran propiedades diferentes, entre sí y con relación a los astrocitos. Mientras que en las neuronas obtenidas del cerebelo se observó una clara potenciación de la salida de glutamato (marcado como D-aspartato) por trombina, en las neuronas de hipocampo, su magnitud fue menor, en tanto que las neuronas corticales tuvieron una escasa respuesta. Estas diferencias pueden vincularse con un menor hinchamiento en las neuronas ante el mismo cambio en la osmolaridad externa, que podría deberse a diferencias en la composición lipídica de la membrana y/o a diferencias en la densidad de las acuaporinas. Otro elemento que puede explicar estas diferencias es la magnitud del incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  debido a la trombina, notablemente mayor en los astrocitos que en las neuronas, y pudo establecerse una relación entre dicho incremento y la magnitud de liberación del glutamato por trombina. Es posible que sean estos dos elementos los que expliquen las diferencias observadas en los distintos tipos celulares con respecto a la acción de la trombina.

En la última década se ha acumulado evidencia que indica que la liberación de osmolitos dependiente de volumen en distintos tipos celulares incluyendo astrocitos y neuronas puede ser incrementada significativamente por la acción de otras moléculas que activan a los GPCRs (rev en Vázquez-Juárez et al., 2008). Tal es el caso de los neuropéptidos vasopresina, endotelina y oxitocina, de agonistas colinérgicos o adrenérgicos, de adenosina, ATP, trombina y lisofosfolípidos, en distintos tipos celulares. Se ha podido concluir que la acción de la trombina ocurre sobre el glutamato movilizado a través de la vía difusional que transloca a los osmolitos orgánicos. Esta vía se ha caracterizado en términos de su cinética y su farmacología. Se sabe que a través de ella el glutamato se mueve en función de su gradiente de concentración y que es sensible a los bloqueadores generales de canales de  $\text{Cl}^-$ . La evidencia hasta ahora indica que se trata de una vía distinta al canal de  $\text{Cl}^-$  activado por volumen por lo que la misma sensibilidad farmacológica sugiere una interdependencia de las dos vías. La dificultad para resolver estos aspectos radica en que no se ha logrado hasta ahora la caracterización molecular ni del canal de  $\text{Cl}^-$  sensible a volumen ni de la vía difusional de los osmolitos. Sin embargo lo que está claro es que la señalización activada por ligandos de algunos GPCR contiene elementos importantes que modulan positivamente a las vías de traslocación de los osmolitos y por ende, a la regulación del volumen celular.

En todos los estudios realizados previamente se ha investigado la potenciación de la liberación de osmolitos en respuesta a una condición hiposmótica mientras que la posibilidad de que ocurra durante el edema isosmótico ha sido poco estudiada. Esto es importante ya que la hiponatremia no se asocia, en general, con daño vascular, por lo que es difícil que concurren el edema celular hiposmótico y altas concentraciones de trombina en el cerebro. En cambio esta asociación se da consistentemente en patologías que llevan a isquemia. Los modelos experimentales usados en este trabajo simulan estas condiciones.

Un resultado interesante del presente estudio fue la caracterización temporal de los mecanismos de movilización del glutamato durante el progreso de la condición isquémica. Con distintos abordajes se pudo establecer la contribución de la liberación vesicular, en el caso de las neuronas y aquellas debidas al transportador y la vía sensible a volumen. Para la caracterización farmacológica se usó el TBOA, un bloqueador del transportador de glutamato. Para evaluar la contribución del canal activado por volumen, el DCPIB fue la primera elección ya que se considera específico para la inhibición del canal de Cl<sup>-</sup> sensible a volumen; sin embargo, en este modelo en los astrocitos, el DCPIB no redujo la liberación de glutamato sino por el contrario, la incrementó. Aunque hay pocas evidencias de que el DCPIB inhibe la liberación de glutamato por conexinas, la captura de glutamato vía GLT-1 (Bowens et al., 2013) y los canales TREK (Mineiri et al., 2013), ninguno de estos mecanismos podría explicar el incremento en la liberación de D-aspartato.

Otros agentes que inhiben al canal aniónico regulado por volumen, como el DIDS y la floretina, sí fueron eficaces previniendo la liberación de glutamato; el DIDS tuvo un efecto inhibitor en la primera y segunda fase, la floretina inhibió principalmente la liberación de D-aspartato en la segunda fase cuando hubo hinchamiento celular; estos resultados sugieren que el DIDS puede afectar otras vías de movilización de glutamato durante la isquemia química, como la liberación de glutamato y la liberación mediada por los receptores purinérgicos PY7 (Evanko et al., 2004; Malarkey y Parpura, 2008), si el DIDS bloquea una primera etapa no relacionada con el hinchamiento celular podría sugerir alguna contribución de estas vías.

Mediante este tipo de abordaje, combinado con el seguimiento del cambio en el volumen celular en los astrocitos, se identificó la contribución de los distintos mecanismos de movilización del glutamato a través del tiempo y se ubicó el momento y el mecanismo de acción de la trombina.

Se pudo demostrar que la liberación del glutamato en la condición isquémica, respondió a la operación reversa del transportador debido al colapso de los gradientes iónicos por la falla energética. El transportador del glutamato depende de la energía generada por los gradientes transmembranales de  $\text{Na}^+$  y de  $\text{K}^+$ . En condiciones fisiológicas, este transportador está a cargo de la acumulación del glutamato que permite el mantenimiento de las pozas normales en cada tipo celular. En las condiciones de isquemia, como las usadas en este estudio, los gradientes están colapsados debido a la falla energética y como consecuencia, el transportador dependiente de energía cesa su función para la acumulación intracelular del glutamato, e incluso opera en el sentido opuesto movilizándolo al glutamato del compartimiento intracelular hacia el espacio extracelular. En el momento en que se genera una situación de edema, alrededor de los 40 minutos de isquemia experimental, aparece la contribución de la vía sensible a volumen sobre la cual la trombina ejerce su efecto, lo que incrementa marcadamente el glutamato liberado, que alcanza cerca del 30% de la poza celular.

Pasantes y colaboradores (Vázquez-Juárez et al. 2009) describieron resultados similares en astrocitos corticales en otro modelo de isquemia química, alterando los gradientes iónicos transmembranales de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  mediante el uso de la ouabaína y la presencia de niveles de  $\text{K}^+$  extracelular similares a los observados en la isquemia *in vivo*. Los resultados confirman que la mayor liberación del glutamato y su potenciación por trombina ocurren asociado al edema celular. El modelo de  $\text{K}^+$ /ouabaína no puede utilizarse en neuronas porque no expresan los canales de  $\text{K}^+$  de tipo KIR, que median el amortiguamiento de los niveles de  $\text{K}^+$  extracelular y que cuando dicha capacidad es sobrepasada se genera hinchamiento celular por acumulación de  $\text{K}^+$  (Kofuji y Newman, 2004), además del provocado por la pérdida de los gradientes transmembranales.

Los resultados obtenidos en las neuronas fueron marcadamente distintos a los de los astrocitos en varios aspectos. El curso temporal en los tres tipos de neuronas muestra una

activación muy rápida de la salida del glutamato, que alcanza el pico en los primeros 10-15 minutos del tratamiento, en contraste con la movilización muy lenta en los astrocitos en ese intervalo. En los siguientes minutos la diferencia continúa, pues mientras que en las neuronas hay un decremento constante en el glutamato liberado, en los astrocitos hay por el contrario, un aumento creciente en función del tiempo. Esta diferencia puede explicarse en términos de los mecanismos que inducen la liberación del glutamato, mismos que difieren en los astrocitos y las neuronas. En las neuronas, durante los primeros minutos puede operar la liberación vesicular en respuesta a la despolarización inducida por el colapso de los gradientes iónicos y que depende de la activación de los canales de calcio del tipo N/P/Q (Katayama et al., 1991; Pocok y Nicolls, 1998; Nelson et al., 2003). El decremento en la liberación puede deberse al vaciamiento de la poza vesicular en las neuronas. La operación reversa del transportador tiene una contribución importante en el proceso de liberación del glutamato tanto en astrocitos como en neuronas, pero el componente que responde al hinchamiento es menor en las neuronas, mientras que es muy importante en los astrocitos, siendo el responsable de la mayor cantidad de glutamato movilizado. La diferencias en el efecto de la trombina en neuronas y astrocitos refleja estas diferencias en los mecanismos de liberación de glutamato.

Un resultado importante del presente estudio es que se pudo demostrar que el incremento en la muerte celular está relacionado con el glutamato liberado en forma sostenida durante el edema celular. Esta conclusión se basa en las diferencias observadas entre astrocitos y neuronas, siendo la muerte celular mayor en los primeros, y también en el hecho de que la floretina, que inhibe el movimiento de glutamato durante el edema inducido por isquemia, reduce también de manera muy importante la muerte celular. La muerte de los astrocitos podría deberse a la activación de receptores ionotrópicos del glutamato, cuya expresión ha sido demostrada en células gliales, incluyendo en astrocitos en cultivo (Verkhratsky and Kirchhoff, 2007). La activación de estos receptores incrementa el  $[Ca^{2+}]_i$  a

niveles que rebasan los mecanismos de amortiguamiento, iniciando la cadena de eventos lesivos que incluyen activación de proteasas, generación de radicales libres de oxígeno, cambios en la permeabilidad de la membrana y sobrecarga iónica. Todos estos elementos son conducentes a la muerte celular por necrosis, que fue la observada en este estudio. En las neuronas, la inactivación temprana de la liberación del glutamato y la ausencia de un componente importante en respuesta al edema, limita la extensión del glutamato extracelular que no alcanza a generar muerte por excitotoxicidad en las neuronas aisladas. Este resultado es similar al que han reportado en cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo tratadas con cianuro de sodio en el que la liberación de glutamato consecuente al tratamiento es de origen vesicular y no está relacionado al daño celular (Pocok y Nicholls, 1998). Además la anoxia y muerte celular inducidas por la azida de sodio depende de su concentración (Varming et al., 1998). Es muy probable que el glutamato liberado por los astrocitos en las condiciones *in vivo*, sea el responsable en su mayor parte de la muerte neuronal por excitotoxicidad. La trombina, al incrementar la liberación del glutamato en el momento en el que se genera el edema celular, que es el periodo de tiempo de mayor liberación del glutamato, constituye un elemento adicional de daño cerebral.

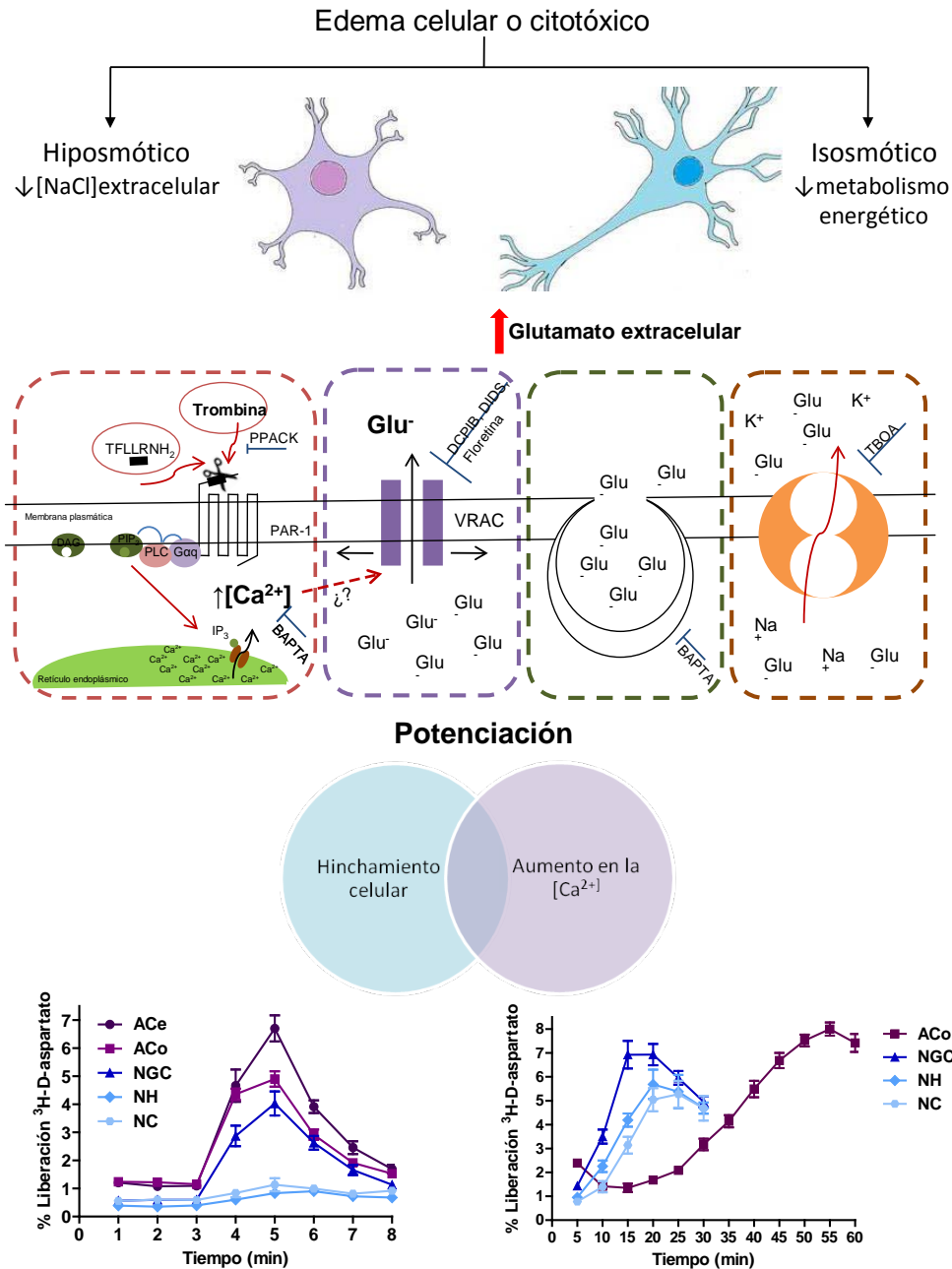
La magnitud del incremento inducido por trombina en la condición de isquemia fue marcadamente menor que en el caso de la hiponatremia. Entre las posibilidades que pudieran explicar esta diferencia están 1. La velocidad de activación de la vía que es mucho más rápida en la condición de hiponatremia, ya que ocurre después de 1-2 minutos después del estímulo, en tanto que en la condición de isquemia, es mucho más lenta y 2. El patrón de incremento en el  $[Ca^{2+}]_i$  observado en cada una de las condiciones, ya que en la condición de hiponatremia no hay un incremento significativo evocado por esta condición y el efecto de la trombina es rápido y de corta duración, en tanto que la condición de isquemia incrementa progresivamente los niveles de  $[Ca^{2+}]_i$  y el efecto de la trombina se suma progresivamente a este incremento.

La trombina tiene una serie de efectos en el cerebro que son muy distintos dependiendo de su concentración. A muy bajas concentraciones, la trombina tiene efectos neuroprotectores en astrocitos y neuronas, frente a una serie de estímulos nocivos incluyendo hipoglucemia, estrés oxidativo o exceso de  $\beta$ -amiloide (Vaughan et al., 1995; Pike et al., 1996; Striggow et al., 2000). La trombina muestra también efectos protectores en modelos de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson (Cannon et al., 2005, 2006). Las investigaciones recientes muestran la participación de las cinasas ERK1/ERK2 como mediadores de las acciones neuroprotectoras de la trombina (Luo et al., 2007). Por otra parte existe numerosa evidencia que apunta hacia efectos lesivos de la trombina en el cerebro cuando sus niveles se incrementan debido a daño vascular o a una alteración en la BHE. Se ha demostrado que la trombina a concentraciones altas produce un incremento en el volumen del daño causado por isquemia, un efecto que se reduce por bloqueadores de la acción de la trombina o en ratones con el receptor PAR-1 no funcional (PAR-1<sup>-/-</sup>) (Junge et al., 2003; Olson et al., 2004). Se ha relacionado a la trombina con la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas como las de Alzheimer y Parkinson (Suo et al., 2003; Hamill et al., 2007 ). Estos efectos se han propuesto mediados a través de reacciones inflamatorias (Luo et al., 2007). En células nerviosas en cultivo también se ha descrito el papel lesivo de la trombina, incrementando la muerte en neuronas y astrocitos (Junge et al., 2003; Xi et al., 2003; De Castro Ribeiro et al., 2006). Considerando por una parte, que la condición de isquemia se relaciona con un incremento en la liberación del glutamato y por la otra, que la trombina lo incrementa significativamente, puede esperarse que la conjunción de los dos factores lleve a un incremento en la muerte celular, siendo el presente estudio el primero que aborda esta cuestión con este enfoque.

## 8. CONCLUSIONES

En el presente estudio se demostró que el glutamato también se moviliza como parte de la respuesta al edema celular hiposmótico e isosmótico en neuronas y astrocitos en cultivo. Los resultados obtenidos indican que el efecto de la trombina sobre la movilización del glutamato es similar en los astrocitos corticales y de cerebelo, así como que las neuronas granulares de cerebelo responden a la trombina con un mecanismo muy parecido al observado en los dos tipos de astrocitos estudiados. El efecto de la trombina ocurre a través de su acción proteolítica sobre el receptor PAR-1, la vía de transducción que participa involucra principalmente la señalización de  $Ca^{2+}$  que provoca un aumento en la liberación de glutamato al potenciar su movilización a través de la vía activada por volumen. Las diferencias en el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  tras la activación del receptor PAR-1 ofrecen una posible explicación a las diferencias en la magnitud de la potenciación de la liberación del glutamato observadas entre los astrocitos y las neuronas evaluados en este estudio.





**Figura 9. La potenciación de la liberación osmosensible de glutamato es un fenómeno emergente que depende de la coincidencia de una condición de aumento en el volumen celular y un aumento en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>.** Esquema representativo de las vías de liberación evaluadas en neuronas y astrocitos en cultivo tras la exposición a condiciones experimentales de hiponatremia e isquemia. Durante el edema celular hiposmótico se activa el canal aniónico sensible a volumen que permite la liberación de glutamato como osmolito. La activación del receptor PAR-1, por el corte proteolítico de la trombina, potencia la liberación osmosensible de glutamato por un aumento en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, siendo de mayor magnitud en astrocitos que en neuronas por las diferencias entre el hinchamiento y el aumento en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> que presentan. En condiciones de edema celular isosmótico por inhibición glicolítica y respiratoria, además

de la vía de liberación activada por volumen, susceptible de ser potenciada por trombina, participan como mecanismos de liberación de glutamato la actividad reversa del transportador en astrocitos y neuronas, y la liberación vesicular en neuronas, que participan en momentos diferentes durante el progreso de la isquemia química. La participación conjunta de estas vías de liberación promueve un incremento sostenido y persistente en los niveles de glutamato extracelular que compromete la viabilidad celular.

## REFERENCIAS

- Bowens NH, Dohare P, Kuo YH, Mongin AA. 2013. DCPIB, the proposed selective blocker of volume-regulated anion channels, inhibits several glutamate transport pathways in glial cells. *Mol Pharmacol*. 83:22-32.
- Cannon JR, Keep RF, Hua Y, Richardson RJ, Schallert T, Xi G. 2005. Thrombin preconditioning provides protection in a 6-hydroxydopamine Parkinson's disease model. *Neurosci Lett*. 373:189-94.
- Cannon JR, Keep RF, Schallert T, Hua Y, Richardson RJ, Xi G. 2006. Protease-activated receptor-1 mediates protection elicited by thrombin preconditioning in a rat 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Brain Res*. 1116:177-86.
- Camacho A, Massieu L. 2006. Role of glutamate transporters in the clearance and release of glutamate during ischemia and its relation to neuronal death. *Arch Med Res* 37:11-8.
- Cardin V, Lezama R, Torres-Márquez ME y Pasantes-Morales H. 2003. Potentiation of the osmosensitive taurine release and cell volume regulation by cytosolic Ca<sup>2+</sup> rise in cultured cerebellar astrocytes. *Glia* 44:119-128.
- Coughlin SR. 2000. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature* 407:258-64.
- Coughlin SR. 2005. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J Thromb Haemost* 3:1800-14.
- Cruz-Rangel S, Gamba G, Ramos-Mandujano G, Pasantes-Morales H. 2012. Influence of WNK3 on intracellular chloride concentration and volume regulation in HEK293 cells. *Pflugers Arch* 464:317-30.
- De Castro Ribeiro M, Badaut J, Price M, Meins M, Bogousslavsky J, Monard D, Hirt L. 2006. Thrombin in ischemic neuronal death. *Exp Neurol* 198:199-203.
- 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* 134:1467-79.
- Evanko DS, Zhang Q, Zorec R, Haydon PG. 2004. Defining pathways of loss and secretion of chemical messengers from astrocytes. *Glia* 47:233-40.
- Fisher SK, Cheema TA, Foster DJ, Heacock AM. 2008. Volume-dependent osmolyte efflux from neural tissues: regulation by G-protein-coupled receptors. *J Neurochem*. 106:1998-2014.
- Fisher SK, Heacock AM, Keep RF, Foster DJ. 2010. Receptor regulation of osmolyte homeostasis in neural cells. *J Physiol* 15;588:3355-64.
- Grand RJ, Turnell AS, Grabham PW. 1996. Cellular consequences of thrombin-receptor activation. *Biochem J* 313 :353-68.

- Hamill CE1, Caudle WM, Richardson JR, Yuan H, Pennell KD, Greene JG, Miller GW, Traynelis SF. 2007. Exacerbation of dopaminergic terminal damage in a mouse model of Parkinson's disease by the G-protein-coupled receptor protease-activated receptor 1. *Mol Pharmacol.* 72:653-64.
- Hernández-Fonseca K, Massieu L. 2005. Disruption of endoplasmic reticulum calcium stores is involved in neuronal death induced by glycolysis inhibition in cultured hippocampal neurons. *Journal of neuroscience research* 82:196-205.
- Hoffmann EK, Lambert IH, Pedersen SF. 2009. Physiology of cell volume regulation in vertebrates. *Physiol Rev* 89:193-277.
- Hoffmann EK, Pedersen SF. 2011. Cell volume homeostatic mechanisms: effectors and signalling pathways. *Acta Physiol (Oxf).* 202:465-85.
- Hollenberg MD. 2003. Proteinase mediated signaling: proteinase-activated receptors (PARs) and much more. *Life Sci.* 74: 237-46
- Junge CE, Sugawara T, Mannaioni G, Alagarsamy S, Conn PJ, Brat DJ, Chan PH, Traynelis SF. 2003. The contribution of protease-activated receptor 1 to neuronal damage caused by transient focal cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:13019-24.
- Katayama Y, Kawamata T, Tamura T, Hovda DA, Becker DP, Tsubokawa T. 1991. Calcium-dependent glutamate release concomitant with massive potassium flux during cerebral ischemia in vivo. *Brain Res* 558:136-40.
- Kimelberg HK. 1995. Current concepts of brain edema. Review of laboratory investigations. *J Neurosurg* 83:1051-9. Review.
- Kovach IM, Kelley P, Eddy C, Jordan F, Baykal A. 2009. Proton bridging in the interactions of thrombin with small inhibitors. *Biochemistry.*4;48:7296-304.
- Kofuji P, Newman EA. 2004. Potassium buffering in the central nervous system. *Neuroscience.* 129:1045-56.
- Lang F, Busch GL, Ritter M, Völkl H, Waldegger S, Gulbins E, Häussinger D. 1998. Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol Rev.*;78:247-306.
- Lezama R, Ortega A, Ordaz B y Pasantes-Morales H. 2005. Hyposmolarity-induced ErbB4 phosphorylation and its influence on the non-receptor tyrosine kinase network response in cultured cerebellar granule neurons. *J Neurochem.* 93:1189-98.
- Luo W, Wang Y, Reiser G. 2007. Protease-activated receptors in the brain: receptor expression, activation, and functions in neurodegeneration and neuroprotection. *Brain Res Rev.* 56:331-45.
- Malarkey EB y Parpura V. 2008. Mechanisms of glutamate release from astrocytes. *Neurochem Int.* Jan 52: 142–154.

- Minieri L, Pivonkova H, Caprini M, Harantova L, Anderova M, Ferroni S. 2013. The inhibitor of volume-regulated anion channels DCPIB activates TREK potassium channels in cultured astrocytes. *Br J Pharmacol.* 168:1240-54.
- Mongin AA. 2007. Disruption of ionic and cell volume homeostasis in cerebral ischemia: The perfect storm. *Pathophysiology.* 14:183-93.
- Morán J, Patel AJ. 1989. Stimulation of the N-methyl-D-aspartate receptor promotes the biochemical differentiation of cerebellar granule neurons and not astrocytes. *Brain Res.*1;486:15-25.
- Nelson RM, Lambert DG, Richard Green A, Hainsworth AH. 2003. Pharmacology of ischemia-induced glutamate efflux from rat cerebral cortex in vitro. *Brain Res* 964:1-8.
- Niclou S, Suidan HS, Brown-Luedi M, Monard D. 1994. Expression of the thrombin receptor mRNA in rat brain. *Cell Mol Biol*40:421-8.
- Nilius B, Eggermont J, Voets T, Buyse G, Manolopoulos V y Droogmans G. 1997. Properties of volume-regulated anion channels in mammalian cells. *Prog Biophys Mol Biol.* 68:69-119.
- Olson EE, Lyuboslavsky P, Traynelis SF, McKeon RJ. 2004. PAR-1 deficiency protects against neuronal damage and neurologic deficits after unilateral cerebral hypoxia/ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 24:964-71.
- Okada Y. 1997. Volume expansion-sensing outward-rectifier Cl<sup>-</sup> channel: fresh start to the molecular identity and volume sensor. *Am J Physiol.* 273:C755-89.
- Ordaz B, Vaca L, Franco R, Pasantes-Morales H. 2004. Volume changes and whole cell membrane currents activated during gradual osmolarity decrease in C6 glioma cells: contribution of two types of K<sup>+</sup> channels. *Am J Physiol Cell Physiol.* 286:C1399-409.
- Pasantes-Morales H, Maar TE and Morán J. 1993. Cell Volume Regulation in Cultured Cerebellar Granule Neurons. *J Neurosci Res* 34:219-224.
- Pasantes-Morales H, Chacón E, Murray RA and Morán J. 1994. Properties of Osmolyte Fluxes Activated During Regulatory Volume Decrease in Cultured Cerebellar Granule Neurons. *J Neurosci Res* 37:720-727.
- Pasantes-Morales H, Cardin V, Tuz K. 2000. Signaling events during swelling and regulatory volume decrease. *Neurochem Res.* 25:1301-14.
- Pasantes-Morales H, Franco R, Ordaz B, Ochoa LD. 2002. Mechanisms counteracting swelling in brain cells during hyponatremia. *Arch Med Res.* 33:237-44.
- Pasantes-Morales H, Lezama RA, Ramos-Mandujano G and Tuz KL. 2006. Mechanisms of cell volume regulation in hypo-osmolality. *Am J Med.* 119 S4-11.
- Pasantes-Morales H, Tuz K. 2006. Volume changes in neurons: hyperexcitability and neuronal death. *Contrib Nephrol.* 152:221-40.

- Pasantes-Morales H, Cruz-Rangel S. 2010. Brain volume regulation: osmolytes and aquaporin perspectives. *Neuroscience*. 28;168:871-84.
- Pasantes-Morales H, Vázquez-Juárez E. 2012. Transporters and channels in cytotoxic astrocyte swelling. *Neurochem Res*. 37:2379-87.
- Pedersen SF, Beisner KH, Hougaard C, Willumsen BM, Lambert IH, Hoffmann EK. 2002 Rho family GTP binding proteins are involved in the regulatory volume decrease process in NIH3T3 mouse fibroblasts. *J Physiol*;541:779-96.
- Pedersen SF, Kapus A, Hoffmann EK. 2011. Osmosensory mechanisms in cellular and systemic volume regulation. *J Am Soc Nephrol*;22:1587-97.
- Pike CJ, Vaughan PJ, Cunningham DD, Cotman CW. 1996. Thrombin attenuates neuronal cell death and modulates astrocyte reactivity induced by beta-amyloid in vitro. *J Neurochem*. 66:1374-82.
- Pocock JM y Nicholls DG. Exocytotic and nonexocytotic modes of glutamate release from cultured cerebellar granule cells during chemical ischaemia. *J Neurochem* 70:806-13.
- Ramos-Mandujano G, Vázquez-Juárez E, Hernández-Benítez R, Pasantes-Morales H. 2007. Thrombin potently enhances swelling-sensitive glutamate efflux from cultured astrocytes. *Glia* 55:917-25.
- Rossi DJ, Brady JD, Mohr C. 2007. Astrocyte metabolism and signaling during brain ischemia. *Nat Neurosci* 10:1377-86.
- Sánchez-Olea R, Moran J, Schousboe A y Pasantes-Morales H. 1991. Hyposmolarity-activated fluxes of taurine in astrocytes are mediated by diffusion. *Neurosci Lett*. 13:233-6.
- 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* ;270:C1703-8.
- Strange K. 1992. Regulation of solute and water balance and cell volume in the central nervous system. *J Am Soc Nephrol*; 3:12-27.
- Strange K. 2004. Cellular volume homeostasis. *Adv Physiol Educ*. 28:155-9.
- Strigrow F, Riek M, Breder J, Henrich-Noack P, Reymann KG, Reiser G. 2000. The protease thrombin is an endogenous mediator of hippocampal neuroprotection against ischemia at low concentrations but causes degeneration at high concentrations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:2264-9.
- Strigrow F, Riek-Burchardt M, Kiesel A, Schmidt W, Henrich-Noack P, Breder J, Krug M, Reymann KG, Reiser G. 2001. Four different types of protease-activated receptors are widely expressed in the brain and are up-regulated in hippocampus by severe ischemia. *Eur J Neurosci*. 14:595-608.

- Suo Z, Wu M, Citron BA, Palazzo RE, Festoff BW. 2003. Rapid tau aggregation and delayed hippocampal neuronal death induced by persistent thrombin signaling. *J Biol Chem.* 278:37681-9.
- Tuz K, Ordaz B, Vaca L, Quesada O, Pasantes-Morales H. 2001. Isovolumetric regulation mechanisms in cultured cerebellar granule neurons. *J Neurochem* 79:143-51.
- Tuz K, Pasantes-Morales H. 2004. Edema cerebral: aportaciones de la investigación básica al manejo clínico. *TIP Revista especializada en Ciencias Químico-Biológicas.* 7:93-102.
- Vaughan PJ, Pike CJ, Cotman CW, Cunningham DD. 1995. Thrombin receptor activation protects neurons and astrocytes from cell death produced by environmental insults. *J Neurosci.* 15:5389-401.
- Vázquez-Juárez E, Ramos-Mandujano G, Hernández-Benítez R, Pasantes-Morales H. 2008. On the role of G-protein coupled receptors in cell volume regulation. *Cell Physiol Biochem* 21:1-14.
- Vázquez-Juárez E, Hernández-Benítez R, López-Domínguez A, Pasantes-Morales H. 2009. Thrombin potentiates D-aspartate efflux from cultured astrocytes under conditions of K homeostasis disruption. *J Neurochem* 111:1398-408.
- Varming T, Drejer J, Frandsen A, Schousboe A. 1996. Characterization of a chemical anoxia model in cerebellar granule neurons using sodium azide: protection by nifedipine and MK-801. *J Neurosci Res* 44:40-6.
- Verbalis JG, Gullans SR. 1991. Hyponatremia causes large sustained reductions in brain content of multiple organic osmolytes in rats. *Brain Res.* 567:274-82.
- Verbalis JG. 2010. Brain volume regulation in response to changes in osmolality. *Neuroscience.* 28;168:862-70.
- Verkhatsky A, Kirchhoff F. 2007. NMDA Receptors in glia. *Neuroscientist.* 13:28-37.
- Vu TK, Hung DT, Wheaton VI, Coughlin SR. 1991. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* 64:1057-68.
- Wehner F, Olsen H, Tinel H, Kinne-Saffran E, Kinne RK. 2003. Cell volume regulation: osmolytes, osmolyte transport, and signal transduction. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 148:1-80.
- Weinstein JR, Gold SJ, Cunningham DD, Gall CM. 1995. Cellular localization of thrombin receptor mRNA in rat brain: expression by mesencephalic dopaminergic neurons and codistribution with prothrombin mRNA. *J Neurosci.* 15:2906-19.
- Xi G, Reiser G, Keep RF. 2003. The role of thrombin and thrombin receptors in ischemic, hemorrhagic and traumatic brain injury: Deleterious or protective? *J Neurochem* 84:3-9.