

95



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Ciencias

“Mecanismos responsables del decre-
mento en el volumen en neuronas
durante la muerte por apoptosis”

T E S I S

Que para obtener el título de
B I O L O G O

presenta

XAVIER ENOCH HERNANDEZ PECH



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

México, D. F.

Director de Tesis:

Dra. Herminda Pasantes Ordoñez



2000

FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION BICULAR

287662



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



ESTADOS UNIDOS MEXICANOS
ESTADO LIBRE Y SOBERANO DE
MEXICO

México D.F. a 25 de Noviembre de 1999

MAT. MARGARITA ELVIRA CHAVEZ CANO
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias.
PRESENTE

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

“Mecanismos responsables del decremento en el volumen en neuronas durante la muerte por apoptosis”

realizado por Xavier Enoch Hernández Pech con numero de cuenta 9034691-2, pasante de la carrera de Biología.

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario

Dra. Herminia Pasantes Ordoñez

Propietario

Dr. Julio Morán Andrade

Propietario

Dr. Horacio Merchant Larios

Suplente

Q. Silvestre de Jesus Alavez Espidio

Suplente

Dra. Lourdes Massieu Trigo

Edna M. Suárez D.
Consejo Departamental de Biología

Dra. Edna María Suárez

**A MIS PADRES...
...GRACIAS**

**HAY HOMBRES QUE LUCHAN UN DIA Y SON BUENOS
HAY LOS QUE LUCHAN UN AÑO Y SON MEJORES
HAY LOS QUE LUCHAN MUCHOS AÑOS Y SON MUY BUENOS
PERO HAY, LOS QUE LUCHAN TODA LA VIDA
ESOS SON LOS IMPRESCINDIBLES**

Bertlot Brech

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Herminia Pasantes y al Dr. Julio Morán por la oportunidad que me dieron de trabajar en este proyecto.

Al Dr. Horacio Merchant por su valiosa colaboración al proyecto en la realización de la microscopía electrónica

A mis compañeros del 202 sur: Lenin, Rodrigo, Velia, Sandra, Marcela, Claudia Peña, Octavio, Benito, Alvaro, Karina y Karla.

A mis compañeros del 224: Silver, Toño, Dany, Andy y Lupita.

A Claudia Rodríguez por los cultivos de neuronas que fueron la base de mi trabajo. Y por su paciencia.

A ti Alma, por los momentos compartidos...

A mis amigos: Malinalli, Estuardo, Daniel, Adrian, Memo... etc por todos los momentos vividos en la Facultad.

ÍNDICE

1.Introducción.....	1
1.1 Apoptosis.....	1
1.2 Apoptosis vs Necrosis.....	2
1.3 Fragmentación internucleosomal.....	5
1.4 Activación del programa de muerte.....	6
1.5 Proteasas en la apoptosis.....	7
1.5.1 La estructura y actividad de caspasas.....	7
1.6 Volumen Celular.....	8
1.6.1 La respuesta de la célula a cambios en volumen.....	9
1.6.2 Osmolitos inorgánicos.....	11
1.6.3 Osmolitos orgánicos.....	12
1.6.3.1 Taurina.....	13
1.6.3.2 Otros aminoácidos.....	13
2. Antecedentes	14
2.1 El modelo de las Granulares.....	14
2.2 Volumen celular y la regulación del volumen durante la apoptosis.....	15
3. Objetivos.....	17
3.1 Objetivos particulares.....	17
4. Métodos.....	18
4.1 Obtención de cultivos primarios neuronales.....	18
4.2 Morfología.....	18

4.3 Liberación de osmolitos.....	19
4.4 Viabilidad celular.....	19
4.5 Actividad de caspasa-3.....	20
4.6 Análisis estadístico.....	20
5. Resultados.....	21
5.1 Morfología.....	21
5.2 Supervivencia.....	21
5.3 Actividad de caspasa-3.....	23
5.4 Liberación de osmolitos orgánicos.....	23
5.5 La vía difusional.....	23
5.6 Substitución del Sodio.....	25
6. Discusión.....	28
7. Conclusiones.....	30
8. Abreviaturas.....	31
9. Bibliografía.....	32

1. INTRODUCCION

1.1 Apoptosis

El término de apoptosis, fue usado por primera vez en 1972 por Kerr, Willie y Currie, quienes estudiando sistemas experimentales de roedores, señalaron que las características morfológicas de la muerte celular que ocurre de manera natural durante el desarrollo embrionario, la regeneración hepática, el balance entre proliferación y muerte en modelos de tumor *in vivo*; son diferentes a las que presenta la muerte que ocurre como resultado de patologías e intoxicaciones(8).

Inicialmente se le asignó el nombre descriptivo "**shrinkage necrosis**", pero el uso del termino necrosis para un fenómeno que ocurría bajo condiciones fisiológicas, pareció poco acertado, así que, a sugerencia de un colega del departamento de literatura, partieron de la palabra griega "αποπτωση" (que describe la caída de las hojas o el marchitar de una flor) y acuñaron el término de apoptosis para describir éste fenómeno, al que también se le ha comparado a un "suicidio celular" (8,36).

Si bien la muerte celular durante el desarrollo embrionario había sido descrita anteriormente, la contribución de Kerr, Wyllie y Currie consistió en proponer que durante la apoptosis, las células destinadas a morir participan activamente en su muerte, y, que éste proceso es determinante en el mantenimiento de la constitución celular de los tejidos.

Otros estudios sobre la muerte neuronal durante la formación de sinapsis funcionales y sobre la muerte de células precursoras β y T autorreactivas durante la selección negativa; pusieron de manifiesto la importancia de la muerte celular como mecanismo fisiológico de selección. Posteriormente estudios genéticos con el nemátodo *Caenorhabditis elegans*, demostraron la existencia de genes cuya expresión controla la muerte apoptótica. Entre éstos se identificó el gen *ced-9* y por similitud en la secuencia a su homólogo en humanos el gen *bcl-2*, cuya expresión resultó interferir con la muerte de neuronas deprivadas de factores tróficos así como con la muerte de células precursoras β y T.

La evidencia acumulada hasta ahora, sugiere que la gran mayoría de las células animales son capaces de seguir esta vía de muerte, aún aquellas en las que normalmente no se activa el programa. Este hallazgo implica que este programa genético de autodestrucción forma parte del repertorio de respuestas celulares a señales externas o a cambios en las condiciones celulares internas (8).

1.2 Apoptosis vs Necrosis

Uno de los primeros cambios morfológicos que presentan las células que inician el proceso apoptótico, consiste en la condensación del citoplasma, y **reducción del volumen celular**, acompañados de cambios en la estructura del núcleo. La cromatina se condensa y forma cúmulos densos adosados a la membrana nuclear; seguido de invaginaciones de la membrana nuclear y finaliza con la fragmentación del núcleo en estructuras membranosas con cantidades variables de cromatina. El ADN se fragmenta en múltiplos de 180 bases que corresponden a la longitud del ADN dispuesto alrededor de cada nucleosoma, característica hasta ahora considerada como exclusiva de la muerte por apoptosis.

De manera análoga, la membrana celular sufre invaginaciones que terminan por fragmentar a la célula formando racimos de vesículas de tamaño variable que contienen orgánulos intactos que no se fusionan con lisosomas. A estas vesículas se les ha denominado cuerpos apoptóticos, los cuales *in vitro* terminan por desintegrarse, mientras que *in vivo*, son rápidamente fagocitadas por células vecinas. Por tanto, una de las consecuencias fisiológicas más relevantes de la muerte por apoptosis, es que no se libera material intracelular al medio intersticial. Es importante destacar que este tipo de muerte está restringida a células individuales y nunca resulta en la muerte de células vecinas en las que no se haya activado el programa de muerte (8,12,36).

Por otra parte, la muerte celular por necrosis afecta no solo a la célula que muere, sino también a muchas células adyacentes. Al igual que en la muerte por apoptosis, también hay agregaciones de la cromatina nuclear, responsables del oscurecimiento del núcleo o "picnosis", que sin embargo, es menos denso y menos homogéneo que lo que se puede observar durante la muerte por apoptosis.

En ocasiones se puede observar fragmentación nuclear. A diferencia de la apoptosis los orgánulos se hinchan y **el volumen celular aumenta considerablemente**. Estos cambios han sido asociados con alteraciones del control osmótico, que resulta de una depleción de ATP y la consecuente disfunción de los transportadores iónicos de membrana como la ATPasa de Na^+/K^+ . Todo esto lleva a una pérdida del potencial de membrana y a un incremento en la permeabilidad membranal. Finalmente, las membranas de los orgánulos celulares se fusionan y se pierde la integridad de la membrana celular, permitiendo que el contenido citoplásmico se vacíe al espacio intersticial. La muerte por necrosis generalmente va acompañada de una respuesta inflamatoria, seguida de un proceso de cicatrización que en ocasiones se asocia al desarrollo de fibrosis. A diferencia de la apoptosis ninguno de estos cambios está determinado genéticamente y resulta, mas bien, de la pérdida de sincronización funcional entre los procesos bioquímicos y las estructuras macromoleculares que constituyen a la célula (8,12,36).

DIFERENCIAS ENTRE NECROSIS Y APOPTOSIS

CARACTERISTICA	NECROSIS	APOPTOSIS
Participación celular	Pasiva, carente de control genético	Activa, controlada por un programa genético
Volumen celular	Se incrementa	Disminuye
Cromatina nuclear	Condensación laxa y localización difusa	Condensación compacta con marginación nuclear
Núcleo	Fragmentado	Fragmentado
ADN	Fragmentación irregular, patrón de barrido	Fragmentación internucleosomal, patrón de escalera
ADN ribosomal	Degradación irregular	Fragmentación regular, aparición de bandas específicas
Orgánulos	Se hinchan y tienden a fusionarse con lisosomas	Permanecen íntegros y no se fusionan con lisosomas
Membrana celular	Conserva asimetría de fosfolípidos y se pierde la integridad	Aparición de fosfatidil serina en la lámina extracelular y se conserva la impermeabilidad
Citoesqueleto	Se desorganiza	Conserva su estructura
Citoplasma	Se vierte al espacio intersticial	Se conserva en los cuerpos apoptóticos
Activación de Proteasas	Inespecífica y asociada a disfunción lisosomal	Específica de la familia de las caspasas
Estrés oxidativo	Presente solo en etapas tardías	Presente desde etapas tempranas
Catabolismo Lipídico	Activación inespecífica de fosfolipasas	Producción de ácido araquidónico y metabolitos derivados. Producción de ceramida y metabolitos derivados
Reacción inflamatoria	Presente	Ausente
Cicatrización	Presente, a menudo con fibrosis	Ausente

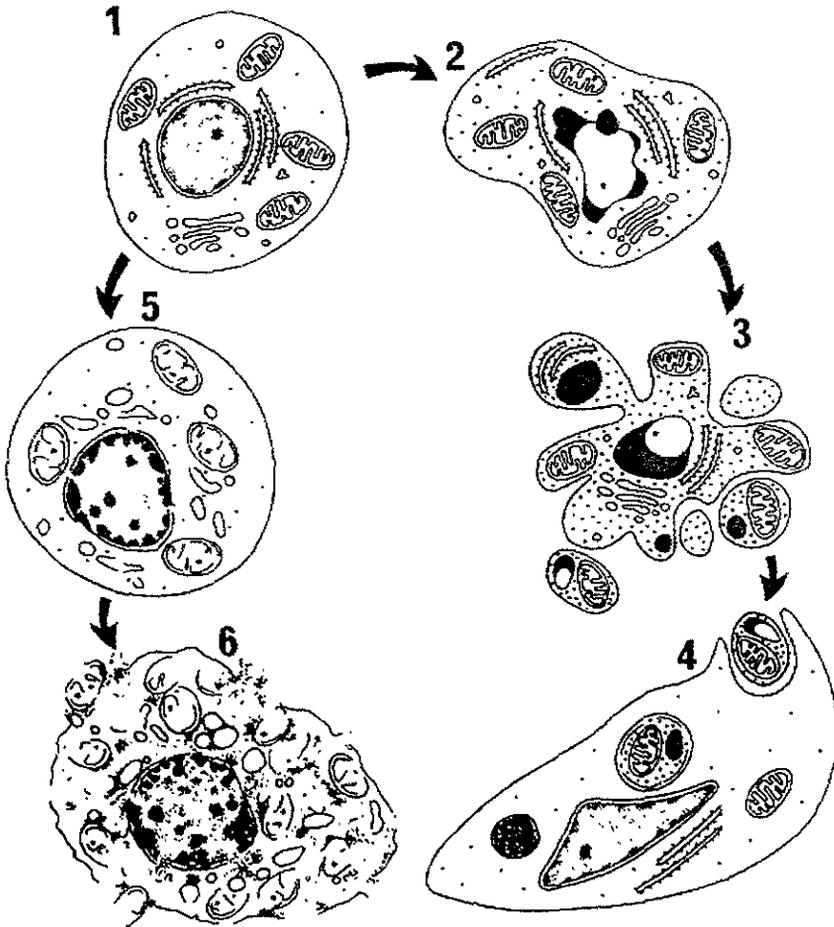


fig. 1 **Apoptosis vs Necrosis** : 1.- Célula normal . **VÍA APOPTÓTICA** (1-4) .- La célula se encoge y hay condensación tanto del citoplasma como de la cromatina. 3.- condensación y fragmentación del núcleo, encapsulamiento de organelos funcionales en cuerpos apoptóticos. 4.- fagocitosis por células vecinas. **VÍA NECRÓTICA** (1,5 y 6) .- la célula y organelos se hinchan, la cromatina se compacta de manera laxa y difusa, también hay fragmentación. 6.- La célula pierde la continuidad membranal vaciando su contenido al medio intersticial (Tomado de Tomei 1991).

Una de las características de mayor relevancia fisiológica de la muerte por apoptosis, radica en el hecho de que no induce una respuesta inflamatoria. En cambio, cuando una célula muere por necrosis, su contenido citoplásmico se vierte al medio intersticial exponiendo un gran número de antígenos que el sistema inmune reconoce como ajenos, frente a los cuales reacciona tratando de eliminarlos. Durante este proceso se activan varios componentes celulares del sistema inmune, como los macrófagos y los neutrófilos que liberan H_2O_2 dañando a cualquier célula con la que entran en contacto. El resultado es la destrucción de muchas células del tejido circundante (8,12).

Hay que resaltar que la formación de los cuerpos apoptóticos previene que el contenido citoplásmico pueda ser liberado al medio intersticial. Antes de que los cuerpos apoptóticos se desintegren, estos son fagocitados por células vecinas en un proceso en el que participan antígenos de superficie y fosfatidilserina que sólo en estas circunstancias se presenta en la lámina externa de la membrana celular de los cuerpos apoptóticos (fig.1). Estas moléculas son reconocidas por receptores específicos en colaboración con antígenos del sistema mayor de histocompatibilidad. La compartimentalización del contenido de la célula apoptótica previene que los antígenos intracelulares puedan evocar una reacción autoinmune. Esta característica de la muerte celular por apoptosis es responsable de que no se produzca una respuesta inflamatoria durante la remodelación y reabsorción tisular aún cuando éstas implican la desaparición de tejidos y órganos completos, como durante la metamorfosis de insectos y anfibios, o la reabsorción de los conductos müllerianos embrionarios en machos de vertebrados o del mesonefros en hembras (12).

1.3 Fragmentación Internucleosomal

Durante la muerte por necrosis el ADN se degrada por acción de endonucleasas y exonucleasas, y los nucleosomas parecen perder integridad ya que al separarse por electroforesis en geles de agarosa se observa un barrido sin que aparezcan bandas discretas. Esto refleja que en la muerte por necrosis el ADN se corta en fragmentos de una gran variedad de tamaños. Por el contrario, la degradación internucleosomal del ADN (característica que hasta ahora se considera como exclusiva de la muerte por apoptosis), al someterse a una separación por electroforesis en un gel de agarosa, se advierte un patrón de bandas discretas característico al que se denomina "patrón de escalera". Este patrón revela que durante la muerte por apoptosis los fragmentos producidos son múltiplos de 180 bases, correspondiente a la longitud del ADN que se enrolla alrededor de cada nucleosoma. Los nucleosomas, constituidos por un grupo de histonas rodeadas por dos asas de ADN, son elementos estructurales de la cromatina. Durante la apoptosis, la activación de proteasas específicas promueve la degradación de proteínas de los filamentos intermedios de la matriz nuclear como la lámina A y la lámina B (12). Se cree que ya que la cromatina se encuentra adosada a estos filamentos, la fragmentación de estas proteínas de la matriz nuclear promueve la desorganización de la cromatina (8). La subsecuente

activación de endonucleasas que tienen acceso a las regiones de ADN entre cada nucleosoma hidroliza el ADN produciendo fragmentos cuya longitud es un múltiplo del número de bases enrolladas en un nucleosoma.

Las endonucleasas que participan en la producción de fragmentos internucleosomales, son dependientes de calcio (Ca^{+2}), ya que la presencia de quelantes de Ca^{+2} como el EGTA, interfieren con la aparición de este patrón de degradación del ADN.

Si bien la fragmentación del ADN se considera como un elemento diagnóstico de una muerte celular por apoptosis, su ausencia no es necesariamente prueba de que no se trata de una muerte apoptótica. Por otra parte, es importante considerar que las células no mueren de manera sincrónica y que por tanto en un momento dado, esta fragmentación puede estar presente sólo en una pequeña fracción de la población celular en estudio. Los escenarios mencionados explicarían por que documentar la fragmentación internucleosomal puede ser más difícil de lo que inicialmente podría pensarse.

1.4 Activación del Programa de Muerte

La muerte celular programada es un mecanismo de selección en el que las condiciones microambientales que rodean a la célula determinan cuáles células deben morir, y el momento en el que esto debe ocurrir. El estudio de sistemas celulares en los que ocurre la muerte apoptótica sugiere que existen dos formas de activación del programa de muerte (8). En algunos tipos celulares el programa de muerte se encuentra apagado, por lo que se requiere un estímulo externo para activarlo. Señales parácrinas mediadas por moléculas pertenecientes al grupo de las citocinas como el TNF o el ligando de APO/FAS, son los ejemplos prototípicos de las señales que al unirse a sus receptores de membrana en las células blanco, activan el programa de muerte. Existe un creciente número de ligandos y receptores recientemente identificados con una función similar. Estos sistemas permiten eliminar células dentro de un tejido de forma selectiva. Mientras que el sistema APO/FAS parece estar asociado con la eliminación de clones de linfocitos T y B que responden a antígenos propios, el sistema de muerte dependiente de TNF participa en la muerte de células tumorales o de células infectadas con distintos tipos de virus (8).

El segundo mecanismo de activación del programa de muerte consiste en un encendido constitutivo como parte de las características del estado de maduración o diferenciación de un linaje celular. En estos casos la muerte se previene por la acción de factores de sobrevivencia, también denominado factores tróficos, que de estar presentes en el medio interfieren con la ejecución del programa de muerte. Tal es el caso de las neuronas dependientes del factor de crecimiento neural (NGF) o de los timocitos dependientes de interleucina 3 (IL-3). El sistema de NGF participa en la maduración neuronal y durante la selección de sinapsis funcionales

en el sistema nervioso (29). Mientras que el sistema de IL-3 es importante en la maduración hematopoiética.

1.5 Proteasas en la Apoptosis

Una parte importante de la apoptosis es la degradación de una serie clave de proteínas. La calpaina y las caspasas son proteasas predominantes que realizan ésta función. La calpaina es una proteasa calcio-dependiente, implicada en una serie de modelos de apoptosis y propuesta como mediador durante la isquemia cerebral (incluida la necrosis). Su actividad no está restringida al fenómeno apoptótico ya que se le ha implicado en la potenciación a largo plazo. Recientemente han sido descubierta una familia de proteasas llamadas caspasas, cuya activación precede a la degradación del ADN durante la apoptosis. En algunos casos de apoptosis en neuronas se ha observado la participación de ambas; calpaina y caspasas (13).

1.5.1 La estructura y actividad de Proteasas

En la proteólisis relacionada con la apoptosis ha sido ampliamente registrada una familia de al menos 11 proteasas, las cuales han sido llamadas caspasas, por el hecho de que son proteasas de cisteína con una actividad "Aspasa". Las caspasas están relacionadas con CED-3, el producto de un gen esencial en la muerte celular programada en el nemátodo *C. elegans*. La enzima convertidora de interleucina-1 β (ICE) fue el primer homólogo en mamíferos de CED-3. Desde entonces un número enorme de genes con la secuencia homóloga de CED-3/ICE han sido identificados en mamíferos (13).

Las caspasas aparecen como componentes esenciales de la maquinaria de muerte apoptótica. Ellas operan rompiendo el citoesqueleto, y proteínas nucleares necesarias para el mantenimiento de la estructura celular (β -actina, laminina B), enzimas involucradas en el metabolismo (proteína cinasa C) y enzimas de reparación.

Además de la presencia de una cisteína en el sitio activo, la característica más importante de las caspasas es la presencia de un asp en la posición P1 del sustrato. Existen diferencias en las preferencias para los residuos de aminoácidos en las posiciones P2-4 lo cual parece conferirles cierta especificidad a las caspasas. Estudios realizados para la especificidad de sustratos se han revelado tres grupos principales. El grupo I comprende a las caspasas 1,4 y 5 (las cuales juegan un papel preponderante en la repuesta inflamatoria y producción de citocinas) quienes tienen preferencias por secuencias de tetrapéptidos Trp-Glu-His-Asp. El grupo II de caspasas (2,3,7 y CED-3) tiene preferencia por Asp-Glu-x-Asp, mientras que las caspasas 6,8 y 9 (grupo III) prefieren la secuencia Ile-Glu-x-Asp (12).

1.6 Volumen Celular

Para poder sobrevivir, las células deben de ser capaces de mantener su volumen dentro de ciertos límites. Este volumen depende del flujo de agua a través de la membrana celular, la cual generalmente es altamente permeable a ésta, por lo que siempre que exista una diferencia en la concentración de los componentes celulares con el exterior, es decir, un gradiente osmótico entre el exterior y el interior de la célula, se observarán movimientos netos de agua.

En presencia de un gradiente de presión osmótica, el agua se moviliza del compartimento de menor al de mayor presión osmótica, y como consecuencia, el volumen celular aumenta en soluciones hiposmóticas y disminuye en soluciones hiperosmóticas.

Una gran cantidad de factores pueden modificar al volumen de una célula; las alteraciones en la osmolaridad extracelular son el ejemplo mas obvio, pero también la asimilación de nutrientes, la activación de canales iónicos y sistemas de transporte en la membrana celular, la formación o rompimiento de proteínas o glicógeno para la formación de monómeros osmóticamente más activos, las funciones de secreción, los movimientos de organelos intracelulares (de manera particular el citoesqueleto) y por supuesto durante las fases de crecimiento y división celular. En todas estas situaciones se crean gradientes osmóticos microscópicos que dan lugar a cambios locales y transitorios en el volumen celular. Posiblemente es por esta razón que los procesos de regulación de volumen se encuentran presentes en prácticamente todos los tipos celulares, independientemente de las características del medio externo en el que se desenvuelve el animal de que forma parte (18).

Un cambio en el volumen celular puede solamente ser revertido si el equilibrio osmótico a través de la membrana celular es mantenido por los mecanismos de regulación de volumen de la célula. Estos mecanismos reguladores incluyen el transporte iónico a través de la membrana por un lado y la disposición y síntesis de osmolitos orgánicos por el otro. Una gran cantidad de mecanismos para la regulación del volumen, son normalmente empleados en paralelo, además, distintos tipos celulares utilizan diferentes mecanismos de regulación de volumen. Como resultado el número de mecanismos de transporte iónico y de osmolitos orgánicos es extenso.

1.6.1 La respuesta de la célula a cambios de volumen

Cuando las células se exponen a soluciones hiposmóticas, se observa inicialmente un aumento rápido en el volumen celular, debido a la entrada de agua, seguido de una fase de recuperación más lenta, durante la cuál las células alcanzan un valor muy cercano al del volumen original. Este proceso se debe a la expulsión de solutos intracelulares osmóticamente activos, con lo cuál se reduce la presión osmótica intracelular y por lo tanto, el contenido de agua en la célula.

A la recuperación del volumen inicial después de un aumento producido por soluciones hiposmóticas se le denomina DRV o decremento regulatorio del volumen (18,32).

En forma semejante, pero en sentido opuesto, al exponer a las células a una solución hiperosmótica, ocurre una disminución en el volumen celular, directamente relacionada con la magnitud del gradiente osmótico impuesto. Sin embargo, la recuperación del volumen en soluciones hiperosmóticas parece ser menos frecuente que la regulación en condiciones hiposmóticas. A esta recuperación se le ha denominado como IRV (incremento regulatorio del volumen). La mayoría de las células animales expuestas a soluciones hiperosmóticas, se comportan como osmómetros perfectos, disminuyen rápidamente su volumen y no muestran un proceso de recuperación mientras permanezcan en condiciones de hiperosmolaridad.

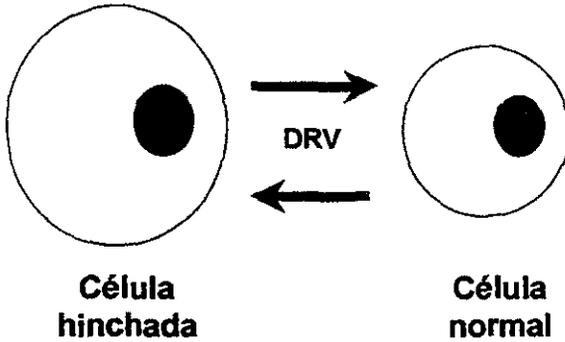
Sin embargo, la recuperación de volumen posterior a una disminución en la osmolaridad, se observa prácticamente en todos los tipos celulares, si las células son expuestas previamente a un medio hiposmótico y posteriormente se les regresa a un medio isosmótico. Durante la exposición a soluciones hiposmóticas, las células han perdido solutos, por lo que al incubarse en un medio isosmótico tiene lugar una disminución en el volumen celular. Esta reducción es seguida de una fase reguladora de aumento durante el cuál se recupera el volumen inicial.

De manera análoga a lo que ocurre durante la regulación en condiciones hiposmóticas, el aumento en el volumen de las células expuestas a soluciones hiperosmóticas se encuentra mediado por la modificación de la presión osmótica intracelular y el medio externo. Para reducir el gradiente osmótico en soluciones hipertónicas, las células tienen que aumentar los niveles internos de solutos osmóticamente activos (32).

En resumen, la capacidad de las células para ajustar su volumen modificado por cambios en la osmolaridad externa, se debe al manejo de la concentración de los niveles internos de solutos osmóticamente activos, en la dirección correcta. Los solutos osmóticamente activos son aquellos que se encuentran en forma libre, en solución, en el citoplasma. Estos solutos se denominan en conjunto osmolitos, a los cuales se les puede dividir en a) iones inorgánicos, principalmente el potasio, el cloruro y el sodio; y a) compuestos orgánicos pequeños como la urea, aminoácidos libres, polialcoholes y metilaminas.

Regulación del volumen celular

Medio Hipotónico



Medio Hipertónico

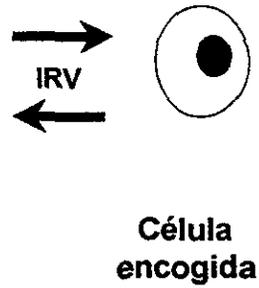


Fig 2. Regulación del volumen celular a cambios de concentración en el medio extracelular. En presencia de un medio hipotónico la célula se hincha activándose el DRV así como la salida de sustancias osmóticamente activas. En presencia de un medio hipertónico el proceso de IRV consiste en la entrada de osmolitos.

1.6.2 Osmolitos inorgánicos

El contenido celular de potasio y cloro disminuye en respuesta a la hiposmolaridad, como consecuencia de la activación de sistemas de transporte que expulsan estos iones al medio extracelular. El mecanismo de salida de K^+ y Cl^- varía según el tipo celular de que se trate. En algunas células, esta salida tiene lugar por la activación de un sistema de cotransporte electroneuro. En otros tipos celulares, la movilización de los iones se lleva a cabo por la activación simultánea de sistemas que intercambian aniones y cationes simultáneamente incluyendo el potasio y el cloro. Generalmente los que funcionan en la regulación del volumen, lo hacen intercambiando K^+/H^+ y Cl^-/HCO_3^- . El resultado neto es la salida de potasio y cloro y la formación de bicarbonato que es degradado en el interior de la célula, por lo que no contribuye osmóticamente.

A pesar de la existencia de estos sistemas de cotransporte electroneuro, el mecanismo más general para expulsar el potasio y el cloro, y corregir el aumento en el volumen celular, parece ser la activación de vías electrogénicas, constituidas por canales iónicos presentes en la membrana celular. El mecanismo utilizado para disminuir los niveles intracelulares de potasio y cloro, de entre los tres descritos determina el curso temporal de la recuperación de volumen de las soluciones hiposmóticas. Cuando se encuentra involucrado el sistema de cotransporte, el proceso es lento y tarda aproximadamente una hora; si se activan los sistemas de intercambio, el proceso regulador de volumen se completa en cerca de diez minutos y si se activan los canales de potasio y cloro, el volumen se recupera en un tiempo menor.

En el caso de la regulación del volumen en condiciones hiperosmóticas, tanto en los tipos celulares que presentan un aumento de volumen al exponerse directamente a soluciones hiperosmóticas, como en aquellas que requieren preincubación en soluciones hiposmóticas seguida de la restauración del medio isosmótico, la recuperación del volumen se encuentra asociada con un aumento en los niveles celulares de los iones sodio, potasio y cloruro, seguida de una entrada de agua a la célula.

La disminución en el volumen celular causado por condiciones hiperosmóticas, activa diversos sistemas de transporte a través de los cuáles que estos iones son internalizados. En algunos tipos celulares y en terminales nerviosas aisladas de cerebro, la hiperosmolaridad induce la activación del sistema de co-transporte $Na^+/K^+/2Cl^-$, por lo que el aumento de volumen es dependiente de la presencia conjunta de estos iones en el medio de incubación y se inhibe en presencia de fármacos que impiden al funcionamiento de este co-transportador, tales como la furosemida y la bumetanida. También se ha observado que en algunas células, el aumento en el contenido intracelular de iones, en respuesta a la hiperosmolaridad, ocurre a través de un sistema de co-transporte Na^+/H^+ y Cl^-/HCO_3^- . De esta manera, los fármacos que inhiben estos

sistemas de transporte como la amilorida y el DIDS, también inhiben el proceso de regulación de volumen.

El sodio que se introduce en la célula, ya sea a través del co-transportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ o del intercambiador Na^+/H^+ , posteriormente se intercambia por potasio a través de la ATPasa Na^+/K^+ .

1.6.3 Osmolitos Orgánicos

Como se mencionó previamente, algunos compuestos orgánicos pequeños también son utilizados por las células con fines de control osmótico. Entre estas moléculas, se encuentran la urea, los aminoácidos libres, compuestos cuaternarios de amonio, polialcoholes como el sorbitol y el mio-inositol, y metilaminas como la glicerofosforicolina y la betanina (17,18,32).

Entre los aminoácidos libres, la taurina es el más importante para una función osmorreguladora debido a que se encuentra presente en concentraciones muy elevadas en la mayoría de las células animales, constituyendo hasta el 70% de la poza total de aminoácidos libres. La taurina presenta características que la señalan como un osmolito ideal: se encuentra en concentraciones lo suficientemente elevadas (hasta 80mM en la retina, 28mM en linfocitos, 60mM en músculo esquelético y cardiaco), como para contribuir de manera importante a la presión osmótica total y es inerte desde un punto de vista fisiológico, ya que no participa en la estructura primaria de proteínas, ni en ninguna reacción del metabolismo primario de la célula. Esto permite que los niveles celulares del aminoácido se puedan modificar con el fin ajustar la presión osmótica sin que las variaciones en la concentración intra o extracelular, alteren otras funciones (32).

Se ha demostrado que en varios tipos celulares, el curso temporal de la liberación de taurina estimulada por soluciones hiposmóticas, es paralelo al proceso de regulación de volumen observado en estas células. La salida de taurina se incrementa con disminuciones crecientes en la osmolaridad del medio de incubación, lo que demuestra una relación muy estrecha entre la liberación del aminoácido y un aumento en el volumen celular. Así mismo en neuronas en cultivo se ha demostrado que los niveles intracelulares de aminoácidos aumentan (en particular la taurina) cuando son expuestas a condiciones hiperosmóticas. En estudios *in vivo* se ha demostrado que una condición de hipernatremia (aumento de los niveles del sodio en el plasma sanguíneo) aumenta el contenido interno de taurina en diversos tejidos. Como contraparte la hiponatremia (disminución de los niveles del sodio en plasma) da como resultado una disminución importante en los niveles de taurina en esos tejidos.

Diversos polialcoholes, como el sorbitol y el mio-inositol, también incrementan su concentración en las células renales cultivadas en medios hiperosmóticos. En otras líneas celulares, se observa un aumento en el contenido de las metilaminas, glicerofosforilcolina y betanina, pero no de sorbitol. La suma

de los compuestos orgánicos acumulados, es suficiente para compensar el aumento en la osmolaridad en el medio de cultivo.

1.6.3.1 Taurina

La taurina es acumulada dentro de las células, por un transportador dependiente de sodio. Después de que la célula se hincha, la taurina es rápidamente liberada, muy posiblemente a través de un canal aniónico. En ovocitos, la expresión del intercambiador aniónico banda-3/AE1 confiere el transporte de taurina para la regulación del volumen, pero en células de mamífero, la salida de taurina no es dependiente de la proteína banda-3. Por otro lado, el transporte de taurina es inducido por la inserción del péptido fosfolipasa en bicapas lipídicas (17).

1.6.3.2 Otros aminoácidos

Además de la taurina, la concentración celular de muchos otros aminoácidos y metabolitos aminoácidos es modificada por el volumen celular, incluyendo la glutamina, el glutamato, la glicina, prolina, serina, treonina, β -alanina, el aspartato, y el GABA. Aunque la concentración intracelular de muchos aminoácidos es muy baja, la suma de todos los aminoácidos contribuye significativamente a la osmolaridad celular en células expuestas a condiciones isotónicas. El encogimiento celular estimula transportadores dependientes de sodio de aminoácidos neutros, así como proteólisis y procesos de inhibición de la síntesis de proteínas. De manera contraria, el hinchamiento estimula el rompimiento de glutamina y glicina así como liberación celular de muchos aminoácidos, por lo menos parcialmente a través de canales aniónicos asociados a cambios en volumen.

Los aminoácidos son probablemente importantes durante la adaptación a cambios menores de osmolaridad. Su contribución es sin embargo indispensable para la adaptación a las osmolaridades excesivas en la médula renal.

Las células del sistema nervioso parecen constituir una excepción, en el sentido de que los iones no participan preferentemente en el proceso de regulación de volumen, sino en condiciones extremas de cambios en el volumen celular. Este comportamiento se explica al considerar el papel fundamental que tienen los iones cloro y potasio, en los mecanismos de comunicación entre neuronas y la excitabilidad nerviosa. Es posible entonces que en estas células la contribución de los osmolitos orgánicos sea mucho más importante que en otras (17).

2.ANTECEDENTES

2.1 Las células granulares de cerebelo (CGC)

El **cerebelo** participa en varias actividades que incluyen funciones motoras y de equilibrio, constituye el 10% del volumen total del cerebro, pero presenta más de la mitad de células nerviosas. Tiene una gran diversidad de interconexiones nerviosas tanto de entrada como de salida.

Histológicamente la corteza del cerebelo se divide en tres capas que están constituidas por cinco tipos celulares; las células esteladas, las células en canasta, las células de Golgi, las células de Purkinje, y las células granulares.

Las **Células Granulares** son las células más pequeñas del cerebelo pero también las más numerosas. Se localizan en la capa granular de la corteza del cerebelo y comprenden la mayor población neuronal de ese tejido. Tienen una identidad excitadora, siendo su neurotransmisor el L-glutamato.

En la rata, las células granulares se forman durante las 2 y 3 primeras semanas postnatales; durante su primer día pasan a la zona basal y a los 13 días alcanzan la capa granular.

Las granulares, reciben conexiones de las fibras musgosas y a su vez excitan a otras células de la corteza cerebelosa, dichas conexiones se establecen desde la primera hasta la tercera semana después del nacimiento. Los somas de estas células miden entre 5 y 8 μm de diámetro.

Las células granulares se han utilizado ampliamente como modelo para el estudio de la fisiología neuronal, esto se debe a una serie de ventajas que proporcionan para su estudio tanto *in vivo* como *in vitro*. Una ventaja importante, es que las células granulares son muy abundantes en el cerebelo y son relativamente fáciles de cultivar. Los cultivos que se obtienen de estas células son muy puros (90% de neuronas). Otra ventaja es que estas neuronas se desarrollan postnatalmente y esto proporciona la facilidad de estudiar procesos de diferenciación, migración y sobrevivencia que ocurren *in vivo* y que se reflejan en el cultivo.

2.2 Volumen celular y la regulación del volumen durante la apoptosis

Uno de los modelos donde mejor se ha caracterizado el fenómeno de apoptosis, es el de los linfocitos T, que también ha sido un sistema muy utilizado en el estudio de los mecanismos de regulación del volumen celular. Curiosamente los linfocitos-T expuestos a condiciones hipertónicas se encogen y permanecen en ese estado sin llevar a cabo un IRV, a pesar de que contienen los mecanismos para llevar a cabo una respuesta activa; sin embargo este solamente es observado cuando las células son sometidas previamente a condiciones de hiposmolaridad. Bortner y Cidlowsky en 1996 encontraron que la pérdida de volumen en células T inmaduras por exposición a condiciones de hiperosmolaridad puede producir apoptosis dependiente de la concentración y del tiempo de exposición. Así mismo, la exposición a condiciones de hiposmolaridad que por consiguiente llevan a un hinchamiento, no produjeron el mismo efecto.

Las pruebas realizadas en tipos celulares con respuestas activas de IRV a condiciones hipertónicas (células COS, HeLa, GH₃ y células L), no mostraron la respuesta de apoptosis. Estudios de citometría de flujo han revelado dos poblaciones celulares distintas, en donde solo las células que reducen su volumen (las apoptóticas) llevan a cabo una fragmentación del ADN, demostrando con esto que el volumen celular tiene un papel importante en el proceso apoptótico (4,6).

Se ha propuesto que la pérdida de volumen durante la apoptosis, pudiera ser un efecto de la pérdida de iones, por lo que muchos investigadores han comenzado a indagar en el papel de éstos. Siendo que el potasio es uno de los iones de mayor concentración dentro de la célula, se perfila como uno de los mejores candidatos a participar como osmolito. Potentes bloqueadores de canales de K⁺ como la espartenina y la quinidina inhiben el encogimiento en un 60% de eosinófilos que llevan a cabo la apoptosis en ausencia de citocinas, sin embargo, la muerte apoptótica no fue caracterizada en estos experimentos (6).

Benson y colaboradores en 1996 reporta una pérdida de potasio intracelular durante la apoptosis inducida por dexametasona en células CEM-C7A, sin embargo no observa cambio alguno en la densidad intracelular, por lo que propone un proceso similar a la excitocitosis para la pérdida del volumen.

Se han explorado los efectos del K⁺ en la actividad de las vías apoptóticas, Jonas (1994) y Cidlowski (1997) han observado que medios con altas concentraciones de K⁺ inhiben la producción de fragmentos internucleosomales, lo cual sugiere acción directa sobre nucleasas apoptóticas. En 1995 Walev demostró que una depleción de K⁺ intracelular estimula la conversión de proIL-1 a IL-1 (de la forma inmadura de ICE a la forma madura), y por el contrario cuando los niveles de potasio se aumentaban, esta conversión fue inhibida, sugiriendo una influencia ejercida por el K⁺ en la actividad de ICE. Cidlowsky propone que sin importar la naturaleza de la señal que lleve a la apoptosis, uno de los cambios iniciales en la vía de muerte, es la pérdida de K⁺ intracelular. Proponen la pérdida de volumen y la del K⁺ como procesos paralelos, al salir el potasio sale agua con él, forzando a

la célula a encogerse. Esta pérdida conjunta de volumen y potasio, inicialmente no resulta en un cambio neto de su concentración, sin embargo como el proceso continúa, la acción de moléculas impermeables de la célula (azúcares, proteínas...) menguarán la salida del agua movida por potasio y es hasta entonces que se notará la disminución de su concentración en la célula ya encogida.

En lo que respecta al Na^+ , Cidlowsky (5) también reporta una disminución de éste en células Jurkat que llevan a cabo la muerte por apoptosis al ser estimuladas con anti-Fas (si bien, no tan importante como la del K^+); Nina Tsao y Huan-Yao Lei (1996) reportan que un medio libre de Na^+ inhibe la apoptosis espontánea en timocitos, y altas concentraciones del mismo (en medio libre de Ca^{++}) la promueven. Proponen que la fuerza iónica del NaCl , el bicarbonato y calcio en el medio, inducen apoptosis espontánea en timocitos modificando el pH intracelular (que en células apoptóticas es más ácido) a través de la activación del anti-transportador Na^+/H^+ , el cotransportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^-$ y el intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ en timocitos.

En lo que respecta a los iones y su papel en la reducción del volumen durante la apoptosis faltan muchas interrogantes por resolver, sin embargo nada se sabe aún acerca de la participación de los osmolitos orgánicos, sobre todo en neuronas, donde los iones no son preferentemente usados como osmolitos. Es muy posible entonces, que los osmolitos orgánicos (principalmente la taurina) tengan también una participación importante en la reducción del volumen en la apoptosis que se lleva a cabo en las neuronas, y por que no, en otros tipos celulares.

3. OBJETIVOS GENERALES

1.- Determinar la participación de los osmolitos orgánicos en la reducción del volumen que llevan a cabo las células granulares de cerebelo durante la apoptosis.

2.- Explorar los posibles mecanismos por medio de los cuáles estos osmolitos son movilizados por las células.

3.1 Objetivos Particulares

1.- Determinar si bajo condiciones que inducen apoptosis (K5) las CGC movilizan osmolitos orgánicos tales como la taurina, el ácido glutámico y el GABA.

2.- En el caso de que la liberación de los osmolitos exista, estudiar si esta ocurre a través una vía difusional o de una vía activa de movilización de osmolitos.

3.- Relacionar esta liberación con el fenómeno apoptótico.

4. METODOS

4.1 Cultivos Celulares

Los cultivos de neuronas granulares fueron preparados como previamente describen Morán y Patel (1988). Brevemente, las suspensiones de células disociadas del cerebelo de ratas de 8 días de nacidas, fueron colocadas en cajas petri de plástico previamente tratadas con poly-L-lysina (5µg/ml). El medio de cultivo consistió de medio basal de Eagle suplementado con 10% de suero fetal de bovino inactivado con calor, 2mM de glutamina, 50 U/ml de penicilina, 50 µM de estreptomycin. Las cajas de cultivo fueron incubadas a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% CO₂/ 95% aire. Cuando los cultivos fueron mantenidos por mas de 2 días *in vitro* (DIV), fueron incubadas con citocina arabinosa (10 µM) aproximadamente 20 horas después de sembradas. Previamente se ha realizado en el laboratorio el conteo de células inmunoteñidas con anticuerpos policlonales específicos contra neuronas (Dakopatts, CA, USA) para observar el enriquecimiento neuronal del cultivo. Nuestros cultivos contenían cerca del 95% de neuronas, de las cuales el 90% son células granulares glutamatérgicas y el 5% restante representaron células GABAérgicas no granulares, como son neuronas esteladas y en canasta.

4.2 Morfología

Las células fueron sembradas en cubreobjetos a una densidad de 265×10^3 células/cm² y cultivadas en medios con concentraciones de 5mM o 25mM de K⁺ de 1-6 DIV. Después de éste tiempo fueron lavados con PBS fijadas con paraformaldehído al 4% e incubadas con 0.01% de Hoescht (colorante fluorescente nuclear) por 10 minutos en obscuridad. Las células fueron lavadas con PBS y los cubreobjetos fueron montados semipermanentemente con methanol-glicerol 1:1 v/v. La preparación fue analizada en un microscopio de epifluorescencia usando un filtro de fluoresceína y un objetivo UV o por contraste de fases en un microscopio invertido. Para la microscopía electrónica las células fueron fijadas en una solución Karnovsky de aldehído sin Ca⁺ (ph=7.4), para posteriormente ser nuevamente fijadas en buffer Zetterqvist con 1% de OsO₄, y enbebida en Epon 812. Cortes semifinos y finos (60-90 nm) fueron teñidos con azul de toluidina y acetato de uranilo, y dejados en citrato respectivamente. El proceso posterior a la primera fijación fue realizado por el Dr. Horacio Merchant Larios en el Instituto de Biomedicas de la UNAM, como una colaboración con el proyecto.

4.3 Liberación de Osmolitos

Para los experimentos de liberación de osmolitos los cultivos celulares fueron incubados durante una noche a 37°C con ³H-Taurina (20-40 Ci/mmol; 2.5 μCi/ml), ³H-D-aspartato (10.5 Ci/mmol; 1μCi/ml) o ³H-GABA (28.7 Ci/mmol; 1μCi/ml) en el medio de cultivo (27,30). Después de incubadas, las células fueron lavadas tres veces (durante 5 min.) con medio isosmótico. La salida de los osmolitos marcados fue medida mediante la colecta de alícuotas cada 30 min. durante 5 horas en medio isosmótico. Al final del experimento la radioactividad en las alícuotas colectadas así como la restante en las células fue medida en un espectrómetro de centelleo líquido. Los resultados están expresados como tasa de liberación como previamente ha sido descrito (30) usando la siguiente ecuación: $r = [\ln(R1) - \ln(R2)] / (t1 - t2)$, donde R1 y R2 son el porcentaje de cuentas remanentes en la capa celular al tiempo t1 y t2, respectivamente.

En paralelo a todos los experimentos, las células control fueron tratadas con el vehículo usado para preparar las soluciones que contenían los componentes a probar. Medio Krebbs Normal amortiguado con HEPES conteniendo (en mM) NaCl, 135; KCl, 5; MgSO₄, 0.6; CaCl₂, 1; KH₂PO₄, 1.7; glucosa, 10; HEPES, 10; pH 7.4. La osmolaridad de ambos medios (K5 y K25) fue ajustada a 320 mOsm con Myo-inositol y fue verificada en un osmómetro de congelación.

4.4 Viabilidad Celular

La viabilidad celular fue estimada usando el ensayo de colorimétrico de Mossman que mide la transformación de MTT [3-(3,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio]. El MTT se incorpora a las células y allí se reduce (mitocondrias) y se transforma en un producto colorido e insoluble de color azul, llamado azul de formazán. MTT (0.1 mg/ml) fue añadido a los cultivos neuronales por 1h a 37°C. Después el medio conteniendo el MTT fue removido para la adición de 100% DMSO a los platos de cultivo. Después de una incubación de 15 min a temperatura ambiente, el azul de formazán formado del MTT fue cuantificado espectroscópicamente a 570-630 nm de longitud de onda de excitación. Como previamente reporta Balázs et al (1990), se obtuvo una buena correspondencia entre la capacidad de convertir azul de formazán de MTT y la proporción de neuronas que aparecen intactas bajo microscopía de contraste de fases.

4.5 Actividad de Caspasa-3

Los cultivos de Neuronas Granulares de Cerebelo (CGC) fueron lavadas con PBS y homogeneizadas en un buffer de lisis. El homogenado fue diluido 1:1(v/v) con glicerol y guardado a -70°C. La actividad de Caspasas fue ensayada con un método fluorométrico (Thornberry, 1994) en un espectrofluorómetro de luminiscencia (LS50B, Perkin Elmer, UK), usando los tetrapéptidos Ac-DEVD-AMC como sustrato para la detección de la actividad de caspasa-3. La reacción fue seguida de 20-30 min después de la adición del sustrato (25µM) y los homogenados de células (30-60 µg/ml) en una solución estándar (100 mM HEPES; 10% (w/v) sacarosa; 0.1% w/v CHAPS; 10 mM DTT; 1 mM EDTA; 1 mM PMFS; 2 µg/ml aprotinina; 1 µg/ml pepstatina y 5 µg/ml leupeptina). Los resultados están expresados como cambio en la intensidad de fluorescencia $h^{-1}\mu g^{-1}$ de proteína en respuesta a la fragmentación del sustrato (DEVD).

4.6 Análisis Estadístico

Los datos fueron expresados como promedios \pm EE y la significancia estadística de los resultados fue calculada por medio de un análisis de ANOVA, con una significancia estadística $p < 0.05$.

5. RESULTADOS

5.1 Morfología

De acuerdo con reportes previos (1,10), cuando las CGC son cultivadas en medios que contienen 25 mM de KCl (K25) la sobrevivencia celular es mayor a la de neuronas mantenidas en medio con concentraciones fisiológicas de K (5 mM K⁺, K5). Durante los primeros 3DIV no hay aparentemente diferencias morfológicas entre ambas condiciones, sin embargo a partir de 4DIV, la morfología celular de neuronas cultivadas en un medio K5, muestran características de apoptosis, como el adelgazamiento de neuritas y un marcado encogimiento del soma seguido por muerte celular (Fig 1, superior derecha). La presencia de figuras apoptóticas en este modelo se identificó por una parte mediante la tinción con el colorante fluorescente nuclear Hoescht (.33258). Una característica compactación del núcleo así como la presencia de figuras apoptóticas tales como "medias lunas", fueron observadas con el tiempo, únicamente en cultivos de células crecidas bajo condiciones de K5 (fig. 1, inferior derecha). A nivel de microscopía electrónica se observaron los cambios ultraestructurales típicos de la apoptosis (fig. 2C y E). A los 5 DIV, las células sembradas en medio con K5 se encontraron encogidas, con aglutinamientos de la cromatina y una densidad electrónica mucho mas alta a la de las células cultivadas en K25. Como el resto de la célula las mitocondrias se encontraron encogidas bajo condiciones de K5 (comparar las fig. 2B y 2D). Antes de la completa fragmentación citoplásmica las células aparecieron redondeadas, casi vaciadas de organelos y con un núcleo con heterocromatina colapsada.

5.2 Sobrevivencia

Los cambios morfológicos observados en CGC mostraron una correlación con la viabilidad celular medida con el ensayo de transformación de MTT. Este procedimiento ha mostrado ser una manera confiable y reproducible de determinar la viabilidad neuronal en este sistema *in vitro* (2).

La figura 3A muestra que la sobrevivencia de CGC en medio K5 no fue significativamente diferente de células crecidas en medio K25 durante los primeros 3 DIV. Después de 5 días, la sobrevivencia celular disminuyó un 43% y solamente 35% después de 6 días en comparación a las células crecidas en medio K25 (fig. 3A)

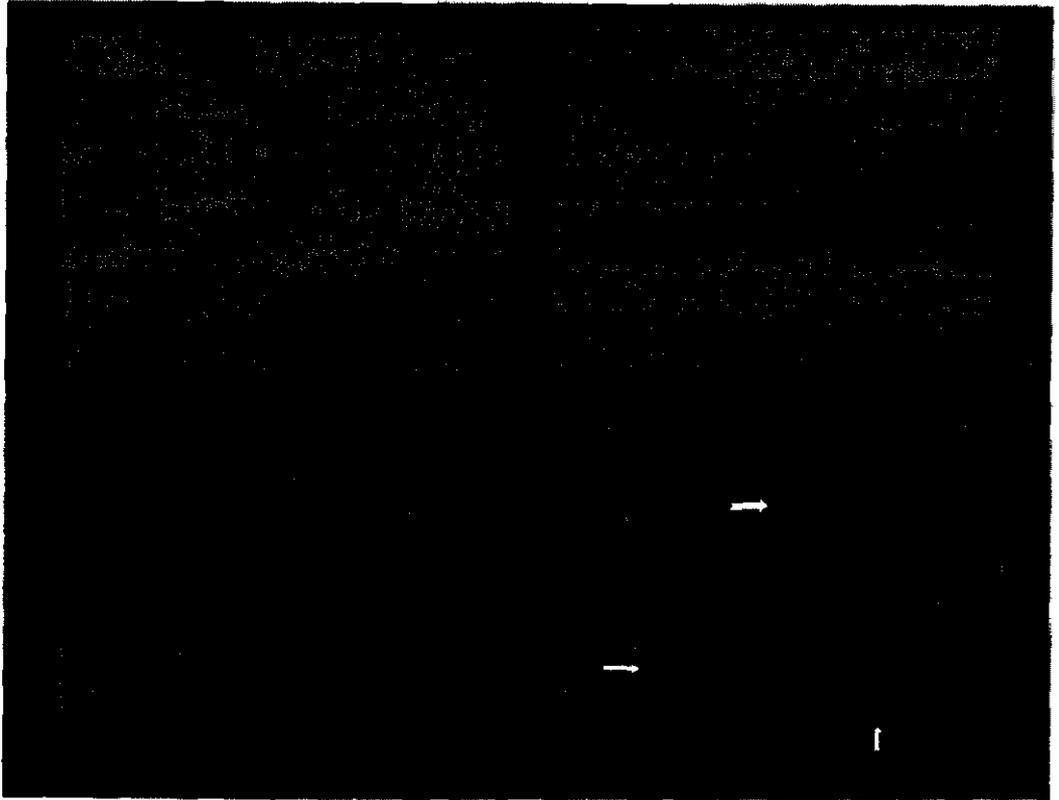


Fig.1. Efecto del medio con bajo potasio (5 mM) en los cambios morfológicos de CGC a 6 DIV. Las neuronas granulares de cerebelo fueron cultivadas como previamente se describe en los métodos y fueron crecidas de 1-6 DIV en un medio con 5 o 25mM de KCl (K5 y K25 respectivamente). Las células fueron incubadas con Hoescht 33258 y observadas bajo iluminación con UV (panel superior) o microscopía de contraste de fases (panel inferior). En la parte izquierda pueden observarse células granulares control crecidas en medio K25; bajo microscopía de contraste de fases (superior izquierda) y con microscopía de fluorescencia observamos los núcleos teñidos (inferior izquierda). A diferencia de las células control, las CGC crecidas en medio K5 presentan menor densidad en el cultivo, así como un mayor número de células con una marcada reducción en su volumen (superior derecha), mientras que en microscopía defluorescencia podemos apreciar núcleos condensados, así como la presencia de posible fragmentación nuclear, como indicadores clásicos de apoptosis.

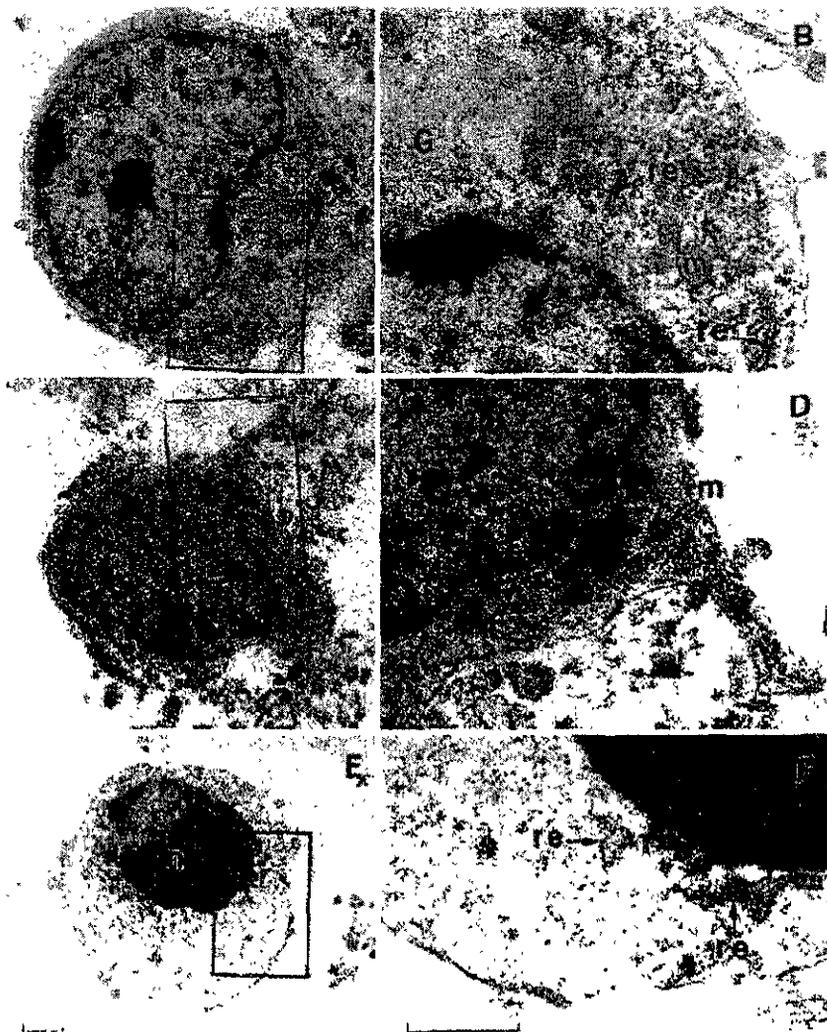


Fig. 2A-F. Microscopía electrónica de células granulares de cerebelo (CGC), fijadas después de 5 días en cultivo. **A** cultivos en medio K25. **B** Amplificación del recuadro mostrado en **A**, rotado 90° en contra a las manecillas del reloj; se puede observar el aparato de Golgi (G), mitocondria (m) y retículo endoplásmico rugoso (re). **C** Cultivos celulares en medio K5. Comparado con las células cultivadas en medio K25, estas células están encogidas y se puede apreciar una mayor densidad electrónica. **D** amplificación de **C** rotado 90° a favor de las manecillas del reloj; en la que se muestran mitocondrias con un volumen menor al normal (m). **E** Células cultivadas en medio K5 con forma redondeada y cromatina colapsada (n). **F** Amplificación de **E** rotado 90° a favor de las manecillas del reloj mostrando dos cisternas de retículo endoplásmico rugoso hinchadas. Escala de la barra = $1 \mu\text{m}$. La barra mostrada en **E** corresponde también en **A** y **C**, así mismo la barra en **F** corresponde a **B** y **D**.

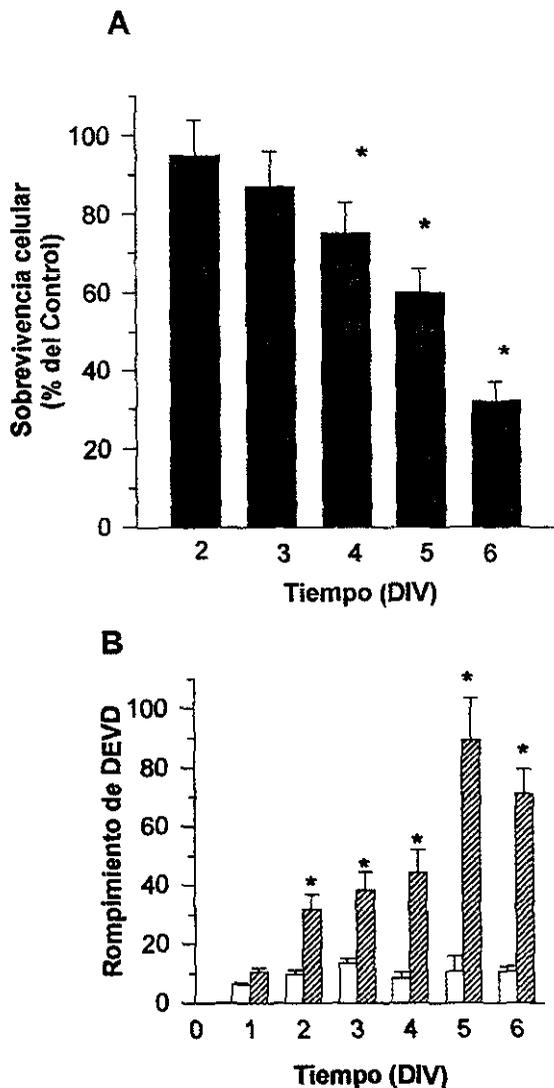


Figura 3. Curso temporal de supervivencia celular e inducción de capas en NGC. En A, células cultivadas por 1-6 DIV fueron incubadas con MTT y la viabilidad fue evaluada como se indica en métodos. Los resultados expresan la supervivencia de nuestras células y corresponde al porcentaje de los valores del control para una densidad óptica a 570 nm de cultivos hermanos crecidos en medio K25. Los asteriscos indican una diferencia significativa ($p < 0.05$) del control. En B CGC fueron cultivadas en medio K25 (barras blancas) o K5 (barras rayadas) por 1-6 DIV y el rompimiento de Ac-DEVD-AMC fue ensayado mediante un procedimiento fluorométrico en homogenados celulares. Los resultados están calculados como delta de fluorescencia/h/mg prot. Los valores están expresados como promedios de 3 experimentos independientes \pm EE. Los asteriscos indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

5.3 Actividad de Caspasa-3

Un parámetro bioquímico asociado con el fenómeno de apoptosis fue también ensayado en estas células. La activación de la proteasa caspasa-3, juega un papel clave en este proceso, particularmente en CGC apoptóticas (7,20,21). Los ensayos fluorométricos usando DEVD-AMC como sustrato de caspasa-3 mostraron que la actividad de ésta, en NGC fue incrementada con respecto al tiempo en cultivo en las células mantenidas en condiciones de K5. La máxima inducción fue alcanzado a 5 DIV (figura 3B), sin embargo la actividad comienza a ser significativa desde el segundo día.

5.4 Liberación de osmolitos marcados

Para examinar el movimiento de ^3H -taurina y otros aminoácidos en CGC, la liberación de las células previamente "cargadas" con los aminoácidos radioactivos fue seguida durante 5 horas y los resultados fueron calculados en tasa de liberación para cada DIV. La figura 4A muestra la tasa de liberación de NGC de 1-6 días. En células cultivadas en altas concentraciones de K (K25) no se observaron diferencias significativas de la liberación de Tau entre cultivos de células durante estos lapsos de tiempo.

En contraste, las células cultivadas en K5, mostraron con el tiempo, un marcado incremento en la tasa de liberación de ^3H -taurina mostrando un pico máximo a los 5 días en cultivo, el cuál fue 4 veces mayor que en las cultivadas en K25. Un incremento significativo se comenzó a observar desde los 3 DIV (20%) (fig. 4A). El cambio en la tasa de liberación de otros aminoácidos también conocidos por su función como osmolitos tales como el glutamato (^3H -D-aspartato) y el GABA, también exhibieron un incremento en el curso del tiempo similar al observado en la taurina, con la diferencia de que el incremento fue notablemente menor (fig. 4B).

5.5 La vía difusional

Una vía difusional; específicamente un canal aniónico no específico, es el mecanismo de salida de aminoácidos osmolitos en células granulares de cerebelo. Para investigar si este mecanismo está implicado en la salida de taurina en la apoptosis, se examinó el efecto de bloqueadores, conocidos para esta vía, como son el NPPB y el DIDS. Como se muestra en la tabla 1, el DIDS ($600\mu\text{M}$) no tuvo efecto alguno sobre la salida de taurina, mientras que se observó un marcado

incremento en presencia de $100\mu\text{M}$ de NPPB, $100\mu\text{M}$ de tamoxifén o $100\mu\text{M}$ de ácido niflúmico.

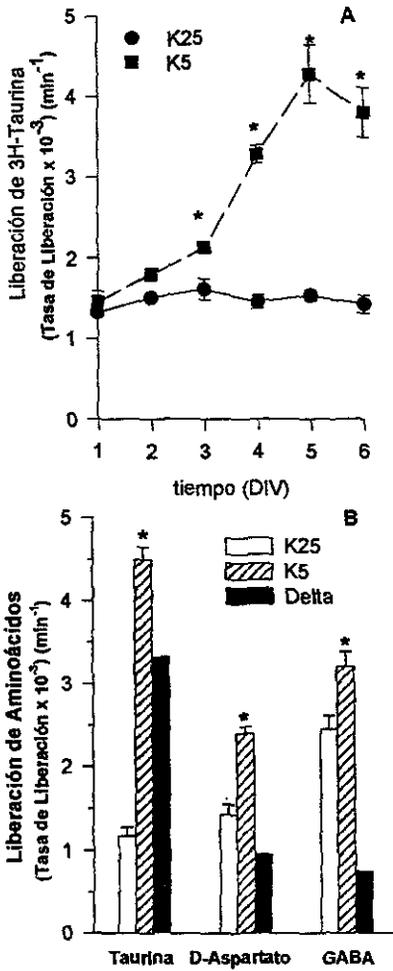


Fig 4. Liberación de ^3H -taurina, ^3H -D-aspartato y ^3H -GABA en CGC. Las células fueron cultivadas de 1-6 DIV en un medio con 5 y 25mM de KCl, e incubadas toda la noche con los osmolitos marcados. El proceso de perfusión se explica detalladamente en los métodos. **A:** Liberación de ^3H -taurina crecidas en medios con K5 y K25 de 1-6 DIV. Los resultados se expresan en tasa de liberación y las medias \pm SEM de 3-24 determinaciones. Los asteriscos indican una diferencia significativa ($p < 0.05$) del medio K25. **B:** Liberación de ^3H -taurina, ^3H -D-aspartato y ^3H -GABA de células crecidas en medios K5 y K25 por 5 DIV. Los resultados están expresados como tasas de liberación (barras vacías y ralladas) y como delta de esta tasa en medios K5 y K25. Las barras son promedios de 3-6 determinaciones \pm EE.

5.6 Substitución del Sodio

La sustitución de NaCl del medio por cloruro de colina, N-metil-D-glucamina (NMDG), y sorbitol, disminuyó de manera importante (70-80%) la salida de taurina en células sembradas en K5 (fig 5). Este tratamiento no tuvo efecto alguno en controles K25. La remoción del Na^+ podría modificar los niveles de Ca^{++} citosólico al afectar el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ y esto en consecuencia, afectar la salida de taurina (pensando en el calcio como un segundo mensajero). Experimentos realizados en cultivos control (K25), la sustitución del sodio con colina, aumentó los niveles de Ca^{++} de $190 \pm 8 \text{ nM}$ a $300 \pm 12 \text{ nM}$ ($n=4$) (datos no mostrados). Sin embargo, el flujo de taurina no fue modificado de manera significativa al incrementar el calcio celular a 300 nM en la presencia de ionomicina o por quelar el Ca^{++} con EGTA-AM (tasa de liberación $\times 10^3 \text{ min}^{-1}$: control: 1.28 ± 0.14 ; ionomicina: 1.31 ± 0.092 ; EGTA-AM: 1.14 ± 0.18) El efecto de la disminución en la salida de taurina por la remoción del Na^+ no fue afectado en la presencia de un medio libre de Ca^{++} . La sustitución del Cl⁻ en el medio por NO_3^- o Br^- no tuvo efecto alguno en la liberación de taurina. Sin embargo, la sustitución con gluconatos, resultó en un incremento significativo en la liberación de taurina (tabla 1).

El efecto de la sustitución del sodio sugiere la participación de acarreadores dependientes de energía, como un mecanismo para la liberación de aminoácidos durante la apoptosis. Para probar esta hipótesis, se examinó el efecto de un bloqueador del transporte de taurina (sulfonato de guanodinoetano, GES) y del acarreador de glutámico (DHK). El GES no tuvo efecto alguno en la tasa de liberación de la taurina ($4.63 \times 10^{-3} \pm 0.7 \times 10^{-3}$ y $5.02 \times 10^{-3} \pm 0.7 \times 10^{-3}$ en la presencia de GES ($n=4$). Así mismo el DHK tampoco tuvo efecto en el D-aspartato (tasa de liberación en células apoptóticas 2.39×10^{-3} y 2.83×10^{-3} en presencia del DHK; $n=8$)

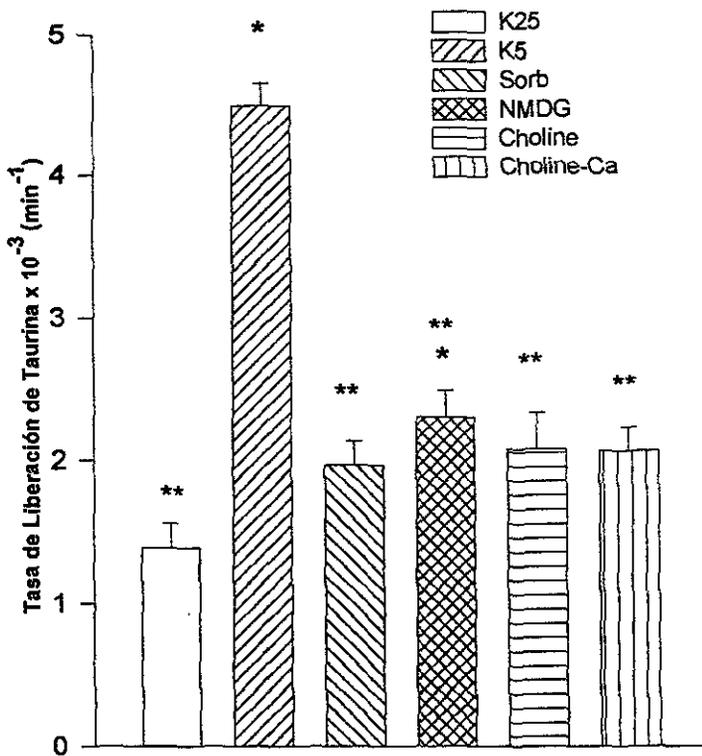


Fig 5. Efecto de la sustitución del sodio en la salida de [³H]-taurina en CGC. Las células fueron cultivadas por 5 DIV en medio K5 o K25 e incubadas con [³H]-taurina durante una noche. Después de retirar el medio, fueron lavadas 3 veces (5 min cada una) y fue medida la salida de la taurina marcada mediante la colecta de fracciones de medio cada 30min durante 5 horas. El cloruro de sodio fue remplazado por concentraciones equimolares de las sales cloradas indicadas. La liberación de taurina marcada en cultivos K25 control fue siempre probada en paralelo (barras vacías). Al final del experimento, la radioactividad en las fracciones colectadas, así como la remanente en las células fue medida por espectrometría de centelleo. Los resultados están expresados como tasas de liberación y las barras son promedios de 3-12 experimentos. los asteriscos indican diferencia significativa (p<0.05) de experimentos en K25 (*) o solo K5 (**)

Tabl 1. Efecto de la sustitución del Cl⁻ y de los bloqueadores de canales de Cl⁻ en la liberación de taurina en CGC.

Condicion	Tasa de liberación de Taurina($\times 10^{-3}$)
Control (Cloruro de Sodio)	4.46 \pm 0.50 (36)
Bromuro de Sodio	4.28 \pm 0.31 (11)
Nitrato de Sodio	3.76 \pm 0.12 (6)
Gluconato de Sodio	6.33 \pm 0.14 (7)
DIDS (600 μ M)	4.88 \pm 0.33 (8)
NPPB (100 μ M)	6.06 \pm 0.34 (6)
Acido Niflumico (600 μ M)	5.22 \pm 0.48 (4)
Tamoxifen (100 μ M)	10.06 \pm 0.91 (6)
Dideoxiforskolina (100 μ M)	3.57 \pm 0.39 (4)

Las CGC fueron cultivadas por 5 DIV en medio K5 e incubadas con [³H]-taurina durante una noche. Después de retirar el medio de incubación, las células fueron lavadas 3 veces (de 5min cada una) y la salida de la taurina marcada fue medida mediante la colecta de fracciones cada 30 min durante 5 horas en el medio indicado. En los experimentos en donde se omitió el cloro y el cloruro de sodio, la sustitución fue de manera equimolar con las sales que se indican. La salida de [³H]-taurina de células crecidas en medio K25 ($1.53 \times 10^{-3} \pm 0.07 \times 10^{-3}$) siempre fue medida en paralelo. Al final del experimento, la radioactividad contenida en las fracciones colectadas y el remanente en las células fue medido por espectrometría de centelleo. Los resultados son expresados como tasas de liberación y con medias \pm EE del número de experimentos en los paréntesis.

7. DISCUSION

Los presentes resultados demuestran una asociación de la salida de taurina con el fenómeno de apoptosis que sufren las células granulares de cerebelo (CGC), en ausencia de concentraciones depolarizantes de K. Este modelo de muerte apoptótica en CGC está bien documentado. La muerte celular inicia a partir de 3 DIV y tiene su manifestación máxima está alrededor de 5-7 DIV. El incremento observado en la salida de taurina está altamente correlacionado ampliamente con este curso temporal, así como con otros parámetros bioquímicos de la muerte apoptótica tales como la activación de caspasas, de la cuál cabe mencionar su importante relación con la muerte apoptótica. El mecanismo de salida de la taurina es hasta ahora desconocido. Sin embargo sabemos que esta salida no fue consecuencia de daño celular, ya que la microscopía electrónica mostró las membranas celulares íntegras así como preservación celular. También, la salida de taurina fue notablemente más alta que la salida en otros aminoácidos también presentes en el citosol como el GABA. Esta liberación tampoco se debió a la recaptura del aminoácido, como lo demuestra la falta de efecto del GES, un bloqueador muy efectivo de la acumulación de la taurina vía acarreador sodio dependiente. Estos resultados confirman los así obtenidos en un estudio realizado en linfocitos Jurkat después de la inducción de apoptosis por estimulación del receptor Fas(CD95) (16), el cuál fue el primer reporte de liberación de taurina asociada a la apoptosis. La activación de los receptores Fas en estas células, también activa canales de Cl^- (17) sensibles a volumen. Debido a que un gran número de células que presentan canales de cloro activados por cambio en el volumen también son capaces de translocar taurina durante la regulación del volumen, esta vía aparece como candidato para el transporte de taurina que ocurre durante la apoptosis. Sin embargo, ninguno de los agentes bloqueadores de la liberación de taurina por este mecanismo, fue efectivo para el flujo asociado con la apoptosis. Esto claramente muestra que la liberación de taurina activada por hinchamiento ocurre por un mecanismo diferente al de la salida de taurina durante la apoptosis. Es notable que tanto en el modelo de linfocitos Jurkat como en el de células granulares alguno de estos bloqueadores también aumenta la liberación, sin embargo en nuestro caso es necesario mencionar un componente tóxico debido al tiempo tan prolongado de exposición a los fármacos. También la liberación fue aumentada en células expuestas a medios donde el Cl^- fue substituído por gluconatos. Esto sugiere que los gradientes transmembranales de cloro pueden de alguna manera afectar la liberación de taurina en la apoptosis. En contraste, la remoción del sodio del medio externo, redujo notablemente la liberación de taurina durante la apoptosis en CGC.

Mientras que en linfocitos Jurkat el flujo de taurina fue inhibido al disminuir la temperatura (16). Estas observaciones podrían sugerir una implicación de un acarreador de taurina dependiente de Na^+ y energía, el cual en condiciones normales sirve para acumular taurina dentro de la célula en contra de un gradiente de concentración. Sin embargo, en células Jurkat los niveles intracelulares de Na^+ disminuyen durante la apoptosis (5), con lo cual se toma poco probable que el

mecanismo mediado a través del proceso reversa del acarreador sodio-dependiente sea responsable de la salida de taurina durante el proceso apoptótico. En adición, el bloqueador competitivo del acarreador de taurina (GES) y el bloqueador no competitivo del transportador de glutámico, el ácido dihidrokainico, no tuvieron efecto en la salida de aminoácidos asociada con apoptosis. Otro sitio donde la remoción del sodio podría influenciar la salida de taurina, es por el aumento del calcio citosólico a través del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$. Sin embargo, aún cuando la propia remoción del sodio incrementó la concentración de Ca^{++} citosólico, esta condición no afectó de manera significativa la liberación de taurina (datos no mostrados). Así, el mecanismo responsable de la translocación de la taurina durante la apoptosis es aún desconocido.

El notable efecto inhibitorio del medio libre de sodio en la liberación de taurina pudiera estar relacionado con el retraso o inhibición de la apoptosis bajo estas condiciones, como se ha observado ocurre en timocitos y en un modelo de muerte apoptótica en linfocitos T de humano tratados con la α -toxina de estafilococos (15). Este efecto ha sido atribuido a una acidificación intracelular debida a la remoción del NaCl , posiblemente por la alteración del contra-transportador Na^+/H^+ (timocitos) o a un decremento de la concentración de Ca^{++} citosólico bajo éstas condiciones (15). Un mecanismo alternativo de translocación selectiva de osmolitos propuesto para el encogimiento celular en la apoptosis, establece un decremento en agua y solutos por reorganización citoplásmica, y subsecuente extrusión de porciones citoplásmicas a través de un tipo de exocitosis (3). Esto ha sido observado en células CEM-C7A. Aunque algunos de éstos fragmentos citoplásmicos fueron observados en preparaciones CGC apoptóticas, su ocurrencia fue substancialmente baja como para considerar la pérdida de taurina por esta vía. En CGC la cantidad de citoplasma que rodea al núcleo es muy pequeña, y como consecuencia el cambio mayor en volumen esta dado por el decremento en el volumen nuclear. La taurina está presente en el núcleo y parte de la taurina que se libera durante la apoptosis posiblemente proviene de pozas nucleares. Si este es el caso, la taurina podría estar participando en el mecanismo de reorganización de la cromatina al disminuir los espacios intranucleares de agua. El momento preciso dentro de la cascada de reacciones que llevan a la apoptosis, en que la liberación de taurina ocurre, permanece aún desconocido para las CGC. Siendo que la taurina está ampliamente reconocida como osmolito, el significado funcional de su liberación está obviamente relacionado al típico encogimiento de la célula apoptótica. Se sugiere que un decremento en la fuerza iónica, debido principalmente al decremento del K, juega un papel funcional en la apoptosis, posiblemente afectando la actividad de proteasas y nucleasas (5). En apoyo a esta hipótesis, la aplicación de valinomicina o la cromakalina como activadores de canales de K^+ , induce apoptosis bajo ciertas condiciones (19,37). Si este es el caso, un decremento en la taurina intracelular podría contribuir a reducir la fuerza iónica, directamente, debido a su naturaleza de zwitterión, y/o indirectamente por reducir la cantidad de agua celular como consecuencia de su liberación, incrementando la concentración neta de iones y consecuentemente la fuerza iónica.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

8. CONCLUSIONES

En conclusión, los resultados del presente trabajo muestran que la liberación de taurina puede participar en los mecanismos de encogimiento que caracterizan a la muerte por apoptosis. Este es el primer trabajo que demuestra este fenómeno de liberación de taurina en el modelo de muerte de células granulares, y coincide en muchos aspectos con el único otro reporte realizado recientemente en linfocitos Jurkat. Estos resultados sugieren que la salida de la taurina puede ser un hecho general de importancia en el proceso de encogimiento celular durante la apoptosis, la cual parece jugar un papel en el desarrollo de este fenómeno (25)

8. ABREVIATURAS

Asp	Aspartato
CGC	Células Granulares de Cerebelo
DIV	Días <i>In Vitro</i>
DRV	Decremento Regulador de Volumen
Glu	Glutamato
Hist	Histidina
Ile	Isoleucina
IRV	Incremento Regulador de Volumen
K25	Medio con 25 mM de K ⁺
K5	Medio con 5 mM de K ⁺
μM	micro Molas
mM	mili Molas
mOsm	mili Osmolas
Trp	Triptofano

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Balazs, Gallo R, Kingsbury A (1988) Effect of depolarization on the maturation of cerebellar granule cells in culture. *Dev Brain Res* 40;269-279
2. Balazs R, Hack N, Jorgensen OS (1990) Selective stimulation of excitatory amino acid receptor subtypes and the survival of cerebellar granule cells in culture. *Neuroscience* 37; 251-258.
3. Benson RSP, Heer S, Dive C, Watson AJM (1996) Characterization of cell volume loss in CEM-C7A cells during dexamethasone-induced apoptosis. *Am J Physiol* 270:C1190-1203
4. Bortner CD, Cidlowski JA (1996) Absence of volume regulatory mechanism contributes to the rapid activation of apoptosis in thymocytes. *Am J Physiol* 40:C950-C961
5. Bortner CD, Huges FM, Cidlowski JA (1997) A primary role for K^+ and Na^+ efflux in the activation of apoptosis. *J Biol Chem* 272;32436-32442
6. Bortner CD, Huges FM, Cidlowski JA (1997) Cell Volume Regulation, ions, and apoptosis. **En: Programmed Cell Death.** Plenum Press New York and London p. 63-70
7. Cohen GM (1997) Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 326;1-16.

8. Duke RC, Ojcius DM y Young DE (1996) Cell suicide in health and disease. *Sci Amer.* 52:48-55
9. D'Mello SR, Galli C, Ciotti T, Calissano P (1993) Induction of apoptosis in cerebellar granule neurons by low potassium: inhibition of death by insulin-like growth factor I and cAMP. *Proc Natl Acad Sci USA* 90;10989-10993
10. Gallo V, Kingsbury A, Balazs R, Jorgensen OS (1987) The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture. *J Neurosci* 7;2203-2213
11. García JJ, Sánchez-Olea R, Pasantes-Morales H (1990) Taurine release associated to volume regulation in rabbit lymphocytes. *J Cell Biochem* 45;207-212
12. Gómez E, Zentella A (1998) Apoptosis y Muerte Celular Programada. *Boletín de Educación Bioquímica.* 17(3) 105-114
13. Gorman AM, Orrenius S, Ceccatelli S (1998) Apoptosis in neuronal cells: role of caspases. *Neuro Report* 9(10); R49-R55
14. Huges FM, Bortner CD, Purdy GD, Cidlowsky AJ (1997) Intracellular K⁺ suppresses the activation of apoptosis in lymphocytes. *J Biol Chem* 272;30567-30576
15. Jonas D, Walev I, Berger T, Liebetrau M, Palmer M, Bhakdi S (1994) Novel path to apoptosis: small transmembrane pores created by staphylococcal alpha-toxin in T lymphocytes evoke internucleosomal DNA degradation. *Infect-Immun* 62;1304-1312

16. Lang F, Madlung J, Uhlemann AC, Risler T, Gulbins E (1998) Cellular taurine release triggered by stimulation of the Fas (CD95) receptor in Jurkat lymphocytes. *Pflügers Arch-Eur J Physiol* 436;377-383
17. Lang F, Busch GL, Ritter M, Völk H, Waldegger S, Gulbins E, Häussinger D (1998) Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiological Rev.* 78(1); 247-274
18. Lang F, Busch GL, Völk H (1998) The diversity of volume regulatory mechanisms. *Cell Physiol Biochem* 8; 1-45
19. Lauritzen I, De Weille JR, Lazdunski M (1997) The potassium channel opener (-)-Cromakalim prevents glutamate-induced cell death in hippocampal neurons. *J Neurochem* 69;1570-1579
20. Martin SJ, Green DR (1995) Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? *Cell* 82;349-352.
21. Morán J, Itoh T, Reddy UR, Chen M, Alnemri ES, Pleasure D (1999) Caspase-3 expression by cerebellar granule neurons is regulated by calcium and cyclic AMP. *J Neurochem* 73; 568-577
22. Morán J, Patel AJ (1989) Effect of potassium depolarization on phosphate-activated glutaminase activity in primary cultures of cerebellar granule neurons and astroglial cells during development. *Dev Brain Res* 46;97-105.
23. Nardi N, Avidan G, Daily D, Zilkha-Falb R, Barzilai A (1997) Biochemical and temporal analysis of events associated with apoptosis induced by lowering the extracellular potassium concentration in mouse cerebellar granule neurons. *J Neurochem* 68;750-759

24. Oppenheim RW (1991) Cell death during development of the nervous system. *Ann Res Neurosci* 14;453-501
25. Orlov SN, Dam TV, Tremblay J, Hamet P (1996) Apoptosis in vascular smooth muscle cells: role of cell shrinkage. *Biochem Biophys Res Comm* 221;708-715
26. Pasantes-Morales H (1996) Volume regulation in brain cells: cellular and molecular mechanisms. *Met Brain Res* 11: 187-204.
27. Pasantes-Morales H, Alavez S, Sánchez-Olea R, Morán J (1993) Contribution of organic and inorganic osmolytes to volume regulation in rat brain cells in culture. *Neurochem Res* 18;445-452
28. Pasantes-Morales H, Schousboe A (1988) Volume regulation in astrocytes: a role for taurine as osmoeffector. *J Neurosci Res* 20: 505-509
29. Raff MC (1992) Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 356:397-400.
30. 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-C1708
31. Sánchez-Olea R, Pasantes-Morales H, Lázaro A, Cerejido M (1991) Osmolarity-sensitive release of free amino acids from cultured kidney cells (MDCK). *J Membrane Biol* 121;1-9
32. Sánchez-Olea R, Pasantes-Morales H (1993) El control del Volumen: Una propiedad fundamental para la supervivencia de las células animales. *Ciencia* 44; 473-485

33. Sánchez-Olea R, Peña C, Morán J, Pasantes-Morales H (1994) Inhibition of volume regulation and efflux of osmoregulatory amino acids by blockers of Cl^- transport in cultured astrocytes. *Neurosci Lett* 156;141-144
34. Strange K, Emma F, Jackson PS (1996) Cellular and molecular physiology of volume-sensitive anion channels. *Am J Physiol* 270; 711-730
35. Tsao N, Lei HY (1996) Activation of the Na^+/H^+ antiporter, $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ cotransporter, or $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger in spontaneous thymocyte apoptosis. *J Immunol* 157;1107-1116
36. Tomei LD, Cope FO, (1996) Apoptosis, the molecular basis of cell death. *Current Communications in cell and Molecular Biology*(3).
37. Yu SP, Yeh CH, Sensi SL, Gwag BJ, Canzoniero LMT, Farhangrazi ZS, Ying HS, Tian M, Dugan LL, Choi WD (1997) Mediation of neuronal apoptosis by enhancement of outward potassium current. *Science* 278;114-117