

00322



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

50

"Papel del pH intracelular en la muerte apoptótica de neuronas granulares de cerebelo de rata"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

OMAR ARIFRANCO CEA



DIRECTOR DE TESIS:
Dr. JUISO MORAN ANDRADE.



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A



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.

PAGINACION

DISCONTINUA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MEXICO

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Omar Ari Franco Cea

FECHA: 11 JUNIO 2003

FIRMA: [Firma manuscrita]

DRA. MARÍA DE LOURDES ESTEVA PERALTA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: "Papel del pH intracelular en la muerte apoptótica de neuronas granulares de cerebelo de rata"

realizado por Omar Ari Franco Cea

con número de cuenta 9523965-7, quien cubrió los créditos de la carrera de: Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dr. Julio Morán Andrade

Propietario Dr. Silvestre de Jesús Alavez Espidío

Propietario Biól. Rodrigo Franco Cruz

Suplente Biól. Lenin David Ochoa de la Paz

Suplente M. en I.B.B. Alette Ortega Gómez

[Firmas manuscritas de los propietarios y suplentes]

Consejo Departamental de BIOLOGÍA

[Firma manuscrita]
M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA

B

AGRADECIMIENTOS. . .

A mi mamá y mi papá, quienes más allá de haberme apoyado en todo lo humanamente posible, me han inspirado (?), motivado y servido de ejemplo para llevar una vida lo menos torcida posible...

Gracias mis queridos viejos.

A mis hermanos Alfredo y Luz, simplemente por haber estado ahí.

A todos mis amigos (que no voy a nombrar individualmente para evitar omisiones), que hicieron de mi paso por la Facultad una experiencia única en mi vida.

A todos mis compañeros del laboratorio: amigos entrañables que tuve la suerte de encontrarme en el camino.

A los Hurdy Gurdies, sin quienes probablemente ya no estaría cuerdo.

A la vida...

C

En algunos de los ratos azules que tuve de vez en vez durante los últimos cuatro años, encontré alguna vez ánimos para superarlos, en este poema. Es por esta razón que quise compartirlo con quienquiera que lea esta tesis...

Si...

*Si logras conservar intacta tu firmeza
cuando todos vacilan y tachan tu entereza;
si a pesar de esas dudas mantienes tus creencias
sin que te debiliten extrañas sugerencias;
si puedes esperar, e inmune a la fatiga
y fiel a la verdad, reacto a la mentira,
el odio de los otros te deja indiferente,
sin creerte por ello muy sabio o muy valiente...*

*Si sueñas, sin por ello rendirte ante el ensueño;
si piensas, mas de tu pensamiento sigues dueño;
si triunfos o desastres no menguan tus ardores
y por igual los tratas como dos impostores;
si soportas oír la verdad deformada
y cual trampa de necios por malvados usada
o mirar hecho trizas de tu vida el ideal
y con gastados útiles recomenzar igual...*

*Si toda la victoria conquistada
te atreves a arriesgar en una audaz jugada,
y aún perdiendo, sin quejas ni tristeza,
con nuevos bríos reiniciar puedes tu empresa;
si entregado a la lucha con nervio y corazón,
aún desfallecido persistes en la acción
y extraes energías, cansado y vacilante,
de heroica voluntad que te ordena: ¡Adelante!...*

*Si hasta el pueblo te acercas sin perder tu virtud
y con reyes alternas sin cambiar de actitud;
si no logran turbarte ni amigo ni enemigo,
pero en justa medida pueden contar contigo;
si alcanzas a llenar el minuto sereno
con sesenta segundos de esfuerzo supremo,
lo que existe en el mundo en tus manos tendrás.
¡Y además hijo mío, un hombre tú serás.*

Rudyard Kipling.

D

Poder vivir un par de horas en un mundo y alejar nuestros pensamientos de las exigencias del presente inmediato, es un privilegio que deben envidiar aquellos que se encuentran presos en sus cárceles corporales

Lin Yutang

Ley de Harvard:

Bajo las condiciones más rigurosamente controladas de presión, temperatura, humedad, pH, y otras variables, el organismo siempre se comportará como le dé la gana..

**Arthur Block en
Ley de Murphy para médicos**

Ley Freivald sobre los "refritos" en investigación:

Solo un tonto puede reproducir el trabajo de otro tonto.

**Arthur Block en
Ley de Murphy para médicos**



CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Muerte celular programada y apoptosis	1
1.1.1. Muerte celular en el desarrollo del Sistema Nervioso	5
1.1.2. El cerebelo como modelo de estudio de la muerte celular	6
1.2. Participación del pH en la apoptosis y otros procesos celulares	7
1.3. Generalidades del pH	8
1.3.1. Mecanismos de regulación de pH intracelular	11
1.3.1.1. Amortiguadores Biológicos	11
1.3.1.2. Transportadores y bombas	12
1.4. Homeostasis iónica y pH	14
1.5. Potasio y Muerte	14
2. ANTECEDENTES	15
2.1. Modelos de muerte en Neuronas granulares de cerebelo de rata (NGC)	15
2.2. pH y Apoptosis	16
3. HIPÓTESIS	18
4. OBJETIVOS	19
5. MATERIALES Y MÉTODOS	20
5.1. Reactivos y materiales	20
5.2. Cultivo de Neuronas Granulares de Cerebelo de rata	20
5.3. Tratamiento de los cultivos	21
5.4. Cuantificación de la viabilidad celular	21
5.4.1. Transformación de MTT	21
5.4.2. Tinción con Diacetato de Fluoresceína (FDA)	22
5.5. Evaluación de la condensación nuclear	22
5.6. Mediciones intracelulares de pH	23



5.7. Mediciones de actividad de caspasas	24
5.8. Western Blots	25
6. RESULTADOS	26
7. DISCUSIÓN	41
8. CONCLUSIONES	46
9. BIBLIOGRAFÍA	47



1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Muerte Celular Programada y Apoptosis.

Los animales multicelulares inician su vida como una célula única que eventualmente llega a ser un individuo completamente formado. Para ello es necesario que ocurra un proceso complejo de proliferación y de diferenciación celular. Resulta interesante que asociado a estos procesos se requiera la eliminación una gran cantidad de células en ciertos periodos críticos del desarrollo y durante el estado adulto. Así, contrario a lo que se podría pensar, la muerte celular es relevante tanto en la formación y eliminación de estructuras, como en el control del número de células y en la eliminación de las células con anomalías (Fig. 1) (Baehrecke, 2002). Por ejemplo, tanto el sistema nervioso como el inmune se originan por una sobreproducción de células seguida por la eliminación de las que fallan en el establecimiento de conexiones sinápticas funcionales, en el caso del primero, o que resultan peligrosamente autorreactivas como ocurre en el sistema inmune (Vaux *et al.*, 1999; Jacobson y Weil, 1997; Meier y Finch, 2000). Por otro lado, durante la vida adulta de los vertebrados, el mantenimiento de un organismo en estado óptimo, requiere que alrededor de 10 000 millones de células mueran normalmente por día sólo para compensar el número de células nuevas que se originan por mitosis. Esta destrucción masiva de células no sólo es normal, sino que es esencial para el desarrollo normal de los individuos como lo demuestran una serie de estudios genéticos en nemátodos, insectos y vertebrados. Estos estudios sugieren además que alteraciones en la regulación fina de este proceso, están asociadas a desórdenes como el cáncer (Soengas, 2001; Vaux, 1988), autoinmunidad (Krammer, 2000; Stassi, 2002), neurodegeneración (Yuan y Yanker, 2000) y síndromes mielodisplásicos.

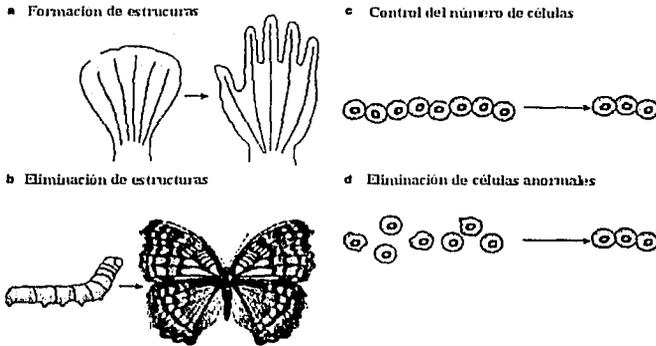


Fig 1. Procesos que involucran la muerte celular programada. La muerte celular programada está involucrada en procesos como a. formación de estructuras, b. eliminación de estructuras, c. control del número de células y d. eliminación de células anormales y/o que tienen dañado su material genético. (Modificado de Baehrecke, 2002).

Todas las variantes de esta muerte fisiológica parecen responder a la activación de un programa genético de eliminación controlada o "suicidio celular" por lo que este tipo de muerte se ha denominado muerte celular programada (Lockshin y Williams, 1965). La muerte programada presenta algunas variantes, pero en todos los casos diferentes de la muerte necrótica o "accidental" que ocurre en respuesta a algún tipo de estímulo o trauma que conduce al liberamiento del contenido intracelular induciendo, generalmente, un proceso inflamatorio (Fig. 2).

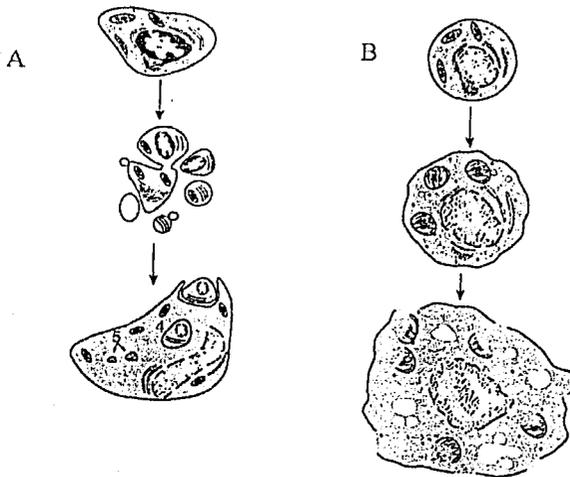


Fig. 2. Diferencias morfológicas entre necrosis y apoptosis. En la apoptosis (A) se mantiene la integridad de la membrana citoplasmática y no se observa hincharse de las estructuras subcelulares como ocurre en la necrosis (B). A pesar de esto, en la apoptosis, son apreciables alteraciones que eventualmente llevan a la formación de los cuerpos apoptóticos, que finalmente son fagocitados. (Modificada de Kerr y Hamon, 1991)

Uno de los tipos de muerte celular progra-

mada más común y de particular interés para este trabajo, es la apoptosis que se puede definir por una serie de características bioquímicas genéticas y morfológicas particulares. Estas últimas incluyen el encogimiento celular, la condensación de la cromatina, la compactación de organelos citoplasmáticos, la reducción del volumen celular y finalmente la formación de estructuras llamadas cuerpos apoptóticos que eventualmente son fagocitados por células vecinas. Todas estas características morfológicas han sido utilizadas como marcadores apoptóticos (Gorman *et al*, 1995). Dentro de las características bioquímicas de la apoptosis se encuentran la fragmentación internucleosomal del DNA, la externalización de la fosfatidilserina y la activación de familias de proteínas encargadas de regular y efectuar el proceso apoptótico. Esta serie de eventos a nivel morfológico y bioquímico resultan de la expresión y activación o inhibición de una gran cantidad de moléculas pro y antiapoptóticas. Algunas



de las moléculas que juegan un papel crítico en este proceso son las proteasas de la familia de las caspasas (Gorman *et al*, 1995).

Las caspasas son proteasas que tienen una cisteína en su sitio activo y que cortan substratos en enlaces Asp-XXX. Estas moléculas son responsables de la mayor parte del desensamblaje de estructuras subcelulares. La especificidad de cada una de las diferentes caspasas está dada por los cuatro residuos siguientes (dirección amino-terminal) al sitio de corte (Hengartner, 2000).

Todas las caspasas, 14 hasta el momento, se expresan como zimógenos o procaspasas no activos de 30 – 50 kDa que contienen un prodominio, una subunidad grande de ~20 kDa y una subunidad pequeña de ~10 kDa (Thornberry y Lazebnik, 1998). En general, se acepta que la activación de estas enzimas requiere de un corte proteolítico en los sitios de fragmentación específicos (aspartatos) entre los tres dominios. Posteriormente, se forma un heterodímero activo que consta de dos subunidades grandes y dos pequeñas (Fig. 3a) (Earnshaw *et al*, 1999). Se han propuesto tres mecanismos generales de activación de caspasas, el primero comprende el procesamiento de la procaspasa por otra caspasa activa (Hengartner, 2000). El segundo está mediado por receptores de muerte, que en respuesta a una señal se agregan formando complejos membranales que reclutan moléculas de una procaspasa iniciadora inactiva, generalmente la caspasa-8. La proximidad de estas procaspasas induce un autoprosesamiento y la formación de caspasas iniciadoras activas (Fig. 3b) (Salvesen y Dixit, 1999). Finalmente, un tercer mecanismo, descrito hasta ahora sólo para la caspasa-9, requiere la asociación de la procaspasa a citocromo c, ATP y una molécula conocida como Apaf-1 para activarse (Rodríguez y Lazebnik, 1999; Stennicke *et al*, 1999) (Fig. 3c)

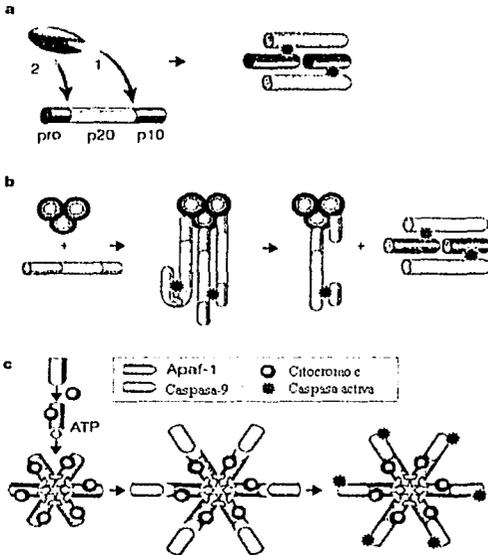


Figura 3. Mecanismos de activación de caspasas. a. Las caspasas se sintetizan como zimógenos inactivos que al ser proteolisados liberan el fragmento p10 y p20 y forman un heterodímero activo. b. En el mecanismo de proximidad las caspasas se agregan y se activan al autoprocresarse por la actividad basal del zimógeno c. La caspasa-9 se activa al unirse a la unidad reguladora Apaf-1, al cofactor citocromo c y a ATP para activar a la caspasa. (Modificada de Hengartner, 2000)

1.1.1. Muerte celular en el desarrollo del Sistema Nervioso

Durante el desarrollo del Sistema Nervioso ocurren algunos eventos que permiten el establecimiento correcto de conexiones necesarias para el buen funcionamiento del sistema en cuestión. Entre estos eventos destacan la proliferación, la migración, la diferenciación, la formación y establecimiento de contactos y, particularmente, la muerte celular que ocurre de manera masiva, como es el caso de la eliminación de ~50 % de las motoneuronas que se generaron durante el desarrollo de la médula espinal (Oppenheim, 1991). Esta muerte celular parece ser principalmente de naturaleza apoptótica y, debido al papel que juega en la morfogénesis y sinaptogénesis del sistema nervioso, está finamente regulada en tiempo y espacio (Kuida *et al.*, 1996).



Tanto la muerte como otros eventos asociados al desarrollo, tales como diferenciación, migración y sinaptogénesis, está regulada por señales tróficas (Oppenheim, 1991; Balázs *et al.*, 1998). Las señales tróficas no son sólo aportadas por los factores neurotróficos clásicos, sino también por la actividad eléctrica de las células vecinas y las influencias presinápticas mediadas por neurotransmisores liberados por las terminales aferentes (de la Rosa y de Pablo, 2000). En el caso particular de las neuronas granulares del cerebelo se ha propuesto que las aferencias presinápticas excitadoras provenientes de las fibras musgosas representan una señal trófica que promueve su diferenciación y sobrevivencia en etapas críticas del desarrollo del cerebelo.

1.1.2. El cerebelo como modelo de estudio de la muerte celular

Las células granulares, que representan aproximadamente el 80 % de las neuronas del cerebelo, constituyen la corteza cerebelar junto con las neuronas en estrella, en canasta, de Golgi y de Purkinje. Estas neuronas se distribuyen en tres capas: molecular, de Purkinje y granular (Fig. 4). Esta estratificación bien delimitada y el hecho de que parte de su desarrollo ocurre de manera postnatal, hacen del cerebelo un excelente modelo de estudio del desarrollo del sistema nervioso y particularmente de la muerte programada (Burgoyne y Cambay, 1988).

Es debido a esto que uno de los modelos experimentales más empleados para estudiar los mecanismos de la muerte programada son los cultivos de neuronas granulares de cerebelo (Balász *et al.*, 1988; Morán *et al.*, 1988, 1992, 1999). Para que las neuronas granulares sobrevivan en cultivo por más de 5 días deben mantenerse despolarizadas crónicamente con concentraciones altas de potasio (25 mM KCl, lo que se supone mimetiza la despolarización inducida por las fibras glutamatérgicas presinápticas *in vivo*).

Por otra parte, se ha demostrado que la privación de potasio extracelular en cultivos de neuronas granulares que se han mantenido despolarizadas por más de 5 días *in vitro*, induce un proceso de muerte neuronal (D'Mello *et al.*, 1993; Morán *et al.*, 1999; Valencia *et al.*, 2001; Schulz *et al.*, 1996) semejante a lo que pasa *in vivo* (Monti *et al.*, 2001) cuando se establecen la competencia entre las conexiones de las fibras musgosas con las neuronas granulares. Por esta razón este modelo de muerte se ha utilizado ampliamente para conocer los mecanismos moleculares y celulares de este proceso durante el desarrollo.

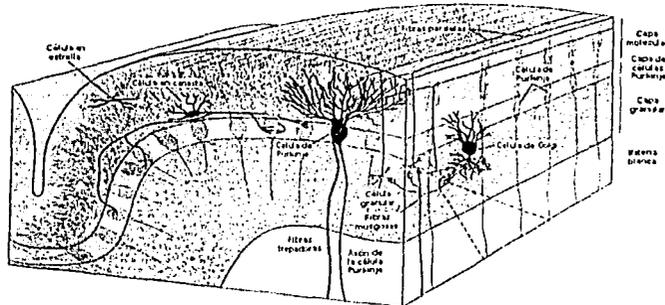


Fig. 4. Arreglo histológico de la corteza del cerebelo. La corteza cerebelar está constituida por cinco tipos neuronales: las células granulares, las estradas, las de canasta, las de Golgi y las de Purkinje. Estas se acomodan en una capa granular externa, una capa de Purkinje y una capa granular interna. (Modificado de Ghez y Tach, 2000)

1.2. Participación del pH en la apoptosis y otros procesos celulares.

Se ha propuesto que existen algunos eventos celulares donde el pH intracelular juega un papel fundamental, ya sea modulando o incluso disparando dichos procesos celulares. Tal es el caso de la carcinogénesis y de particular importancia para este trabajo, la apoptosis (Shrode *et al.*, 1997). En el



caso del cáncer, se sabe que con frecuencias se genera un ambiente ácido en torno a los tumores sólidos, y que a pesar de esto el pH intracelular de estas células tiende a ser alcalino (Stubbs *et al.*, 1995). Se ha demostrado que la alcalinización citosólica inducida de manera artificial, lleva a la transformación de células normales, posiblemente como resultado del cambio en el pH interno (Perona y Serrano, 1988). La alcalinización que ocurre durante la transformación neoplásica, así como en la proliferación y diferenciación, se ha asociado con uno de los principales mecanismos de regulación de pH intracelular, el intercambiador Na^+/H^+ , (Shrode *et al.*, 1997). En lo que respecta a la muerte celular programada, se sabe que los tratamientos inductores de apoptosis en diferentes tipos celulares producen una acidificación intracelular y que algunos de los agentes que protegen de esta muerte, inhiben este cambio en el pH interno (Shrode *et al.*, 1997), lo que podría apoyar la participación del pH en la muerte celular programada.

1.3. Generalidades del pH.

Normalmente una de cada 10^7 moléculas de H_2O a 25°C se encuentra ionizada formando H_3O^+ (ión hidronio, usualmente denominado H^+ o protón) y OH^- (ión hidróxido). El producto de estas dos especies es siempre constante y se conoce como producto iónico del agua. Esta cantidad inicial de H^+ , procedente de la ionización de las moléculas de agua, se puede modificar al disolver ácidos o bases, incrementando o reduciendo la concentración de protones, respectivamente. La concentración total de protones procedentes de estas fuentes se expresa como el pH de la solución, y equivale a el logaritmo negativo de la concentración en moles/l del ión hidronio ($\text{pH} = -\log [\text{H}^+]$) (Nelson y Cox, 2000).

La disociación de un ácido en un medio acuoso, puede ser expresada como una reacción reversible donde el ácido se disocia en su base conjugada más un protón de la siguiente manera:



Si consideramos que los compuestos que se comportan como ácidos débiles en soluciones acuosas donando protones sólo se ionizan parcialmente (los ácidos denominados fuertes como el sulfúrico, clorhídrico y nítrico se ionizan completamente), tenemos entonces que el equilibrio de la reacción anterior se rige por una constante de equilibrio (K_{eq}) que refleja la tendencia de cada ácido a liberar su protón (Nelson y Cox, 2000). Esta K_{eq} , en el caso de las reacciones de ionización de ácidos en solución, se denomina constante de disociación y está representada por el símbolo K_a que se puede expresar como $\text{p}K_a$ y equivale a el logaritmo negativo de K_a ($\text{p}K_a = -\log K_a$). De lo anterior se deriva que mientras más pequeño sea este valor, mayor será la tendencia a liberar su protón y más fuerte se considerará el ácido. Si se disuelve entonces un ácido débil en agua éste se disociará según su $\text{p}K_a$. Al adicionar gradualmente una solución de algún hidróxido, los iones OH^- añadidos se combinarán con los H^+ libres en la solución formando H_2O hasta reestablecer el producto iónico del agua -que no es otra cosa que la constante de disociación que rige la reacción de ionización del agua- alterado momentáneamente por la adición de iones hidróxido. Al ser "secuestrados" estos protones libres, el ácido tenderá a disociarse más a fin de mantener el equilibrio dictado por su K_a (Nelson y Cox, 2000). El resultado neto de la adición de una base es que en la solución, ahora a un pH diferente, se encuentra una proporción mayor del ácido disociado que en la solución al pH original.

Es así como el pH determina el estado de ionización de cualquier soluto en una solución acuosa y es precisamente por esta razón que la estructura, y por lo tanto la función de las macromoléculas biológicas, depende directamente de la concentración de H^+ . Un ejemplo claro de esto, es la fuerte dependencia de pH de la actividad catalítica de las enzimas (Fig. 5), que contienen, entre otros, grupos



amino y carboxilo (con sus respectivos pK_a) potencialmente ionizables, cuyo estado dependerá directamente del pH del medio circundante. Las interacciones iónicas que puedan o no darse dependiendo del estado iónico de las enzimas, influyen en la estabilidad de las mismas y, en última instancia, permitirán que puedan reconocer y unirse a su sustrato. Es por esto que las células tienen que mantener un pH citosólico constante, alrededor de 7.4, que permita mantener a sus biomoléculas en un estado iónico óptimo (Nelson y Cox, 2000).

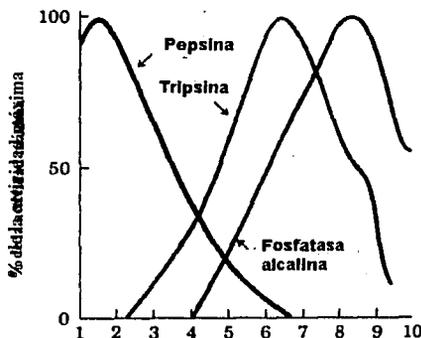


Fig 5. Dependencia de pH de la actividad enzimática. pH óptimo para la actividad catalítica de Pepsina, Tripsina y Fosfatasa alcalina. La actividad de las 3 enzimas decae de manera abrupta hacia ambos lados del pH óptimo, evidenciando que pequeños cambios en el pH intracelular pueden modificar de manera significativa reacciones catalizadas por enzimas. (Modificado de Nelson y Cox, 2000).



1.3.1. Mecanismos de regulación del pH intracelular

1.3.1.1. Amortiguadores Biológicos

Dada la importancia que tiene para las células mantener un pH citosólico constante, existe una serie de mecanismos dirigidos a controlar esta condición, incluidos los amortiguadores o buffers biológicos.

Como se revisó anteriormente, en una solución acuosa de un ácido débil se forman principalmente dos especies: las moléculas que no están disociadas, que son potencialmente donadoras de protones (ácidos), y las moléculas que se encuentran disociadas y que pueden ser eventualmente protonadas (sus bases conjugadas). Esta mezcla de un ácido débil con su base conjugada se conoce como amortiguador y tiene la particularidad de amortiguar los cambios del pH de la solución cuando se añaden pequeñas cantidades de ácidos o bases. Esta resistencia al cambio del pH ocurre debido a que el ácido en cuestión (que es débil) no está totalmente ionizado y tiene una "reserva" de H⁺ en las moléculas no disociadas que pueden ser liberados para neutralizar los OH⁻ que sean añadidos al sistema y formar H₂O. De igual manera, las moléculas que si están ionizadas (la base conjugada) pueden capturar los protones que se adicionen a la solución (Nelson y Cox, 2000). En los organismos multicelulares, estos sistemas no sólo son importantes a nivel intracelular sino que también regulan el pH de los fluidos extracelulares. Tal es el caso del sistema de ácido carbónico-bicarbonato, que en vertebrados pulmonados mantiene el plasma sanguíneo a un pH de 7.4. Al disolverse el CO₂ gaseoso en el plasma sanguíneo, éste reacciona con el agua del plasma formando H₂CO₃. Este ácido carbónico es un ácido débil y por lo tanto funciona como amortiguador (Fig. 6) (Nelson y Cox, 2000).

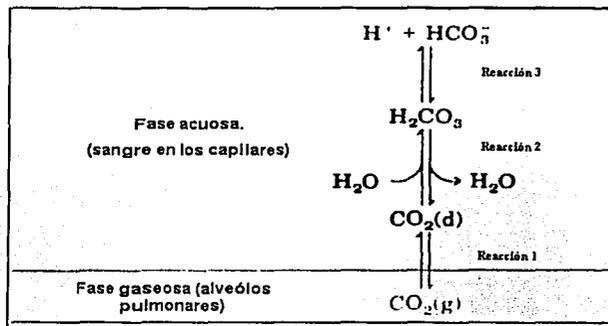


Fig 6. Sistema de buffer de bicarbonato. El CO_2 gaseoso presente en los alveólos pulmonares se disuelve en el plasma sanguíneo (reacción 1), donde reacciona con el agua formando H_2CO_3 (reacción 2) y este al disociarse funciona como buffer manteniendo el plasma a pH 7.4 (reacción 3). (Modificado de Nelson y Cox, 2000).

1.3.1.2. Transportadores y bombas

Durante la evolución, las células han desarrollado algunos mecanismos alternos a los sistemas de buffers que les permiten enfrentar cambios en el pH de magnitudes tales que los sistemas de amortiguadores no pueden regular. La mayoría de las células poseen en su membrana plasmática transportadores que utilizan energía proveniente del gradiente de sodio (Na^+) para extraer el exceso de protones que se forman normalmente por el metabolismo o que entran a la célula debido a que el medio extracelular tiende a ser más ácido (Alberts, 2000).

La actividad de estos sistemas de transportadores está regulada por el pH, incrementándose al acidificarse el citosol. El primero de estos mecanismos es el intercambiador Na^+/H^+ , que acopla la



entrada de sodio con la salida de protones. Estos intercambiadores son inhibidos por amilorida y más eficientemente por sus derivados N-5-disustituídos (Sánchez-Armass *et al*, 1994).

Existe un segundo tipo de transportadores que también utilizan el gradiente de sodio, en este caso para meter un ión bicarbonato (HCO_3^-) y sacar un ión cloruro (Cl^-) junto con un protón (H^+). Este intercambiador se denomina $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ y es más eficiente debido a que saca un protón y neutraliza otro por cada sodio que entra a la célula, en contraste con el primero que sólo saca un H^+ por cada Na^+ que ingresa en la célula. Por esta razón es el principal mecanismo de regulación de pH intracelular cuando existe HCO_3^- disponible, que es generalmente el caso. Estos transportadores son inhibidos por estilbenos sustituidos, como el SITS y el DIDS (Sánchez-Armass *et al*, 1994).

Adicionalmente a estos transportadores, existe también un intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ independiente de Na^+ que juega también un papel importante en la regulación del pH intracelular. Al igual que los transportadores dependientes de sodio, este intercambiador también es regulado por pH, pero funciona sacando iones HCO_3^- a favor de su gradiente electroquímico, cuando el citosol se torna demasiado alcalino (Alberts *et al*, 2002).

Además de los transportadores mencionados, todas las células expresan en sus endosomas, lisosomas y aparatos de Golgi, bombas de protones vacuolares (tipo-V). Algunas células como los osteoclastos, las células del epitelio urinario y los macrófagos, expresan estas bombas incluso en la membrana plasmática (Shrode *et al.*, 1997). Estas bombas de protones pueden estar moduladas por segundos mensajeros y participan en procesos como la acidificación de compartimentos subcelulares cerrados, transporte de solutos y regulación del pH citosólico (Shrode *et al.*, 1997) mediante la extrusión de protones (Boyle *et al.*, 1997; Rajotte *et al.*, 1992). Existen reportes de que en el sistema nervioso la expresión de estas bombas juega un papel importante en la regulación del pH intracelular en células gliales (Volk *et al.*, 1998; Pappas y Ransom, 1993); mientras que su distribución en las



vesículas sinápticas de neuronas de hipocampo de rata (Zhou *et al.*, 2000), de corteza de borrego (Goncalves *et al.*, 1998) y de corteza de rata (Benzi *et al.*, 1996) permiten la generación de un gradiente electroquímico, que aporta la energía necesaria para el llenado de estas vesículas.

1.4. Homeostasis iónica y pH

Finalmente, es importante mencionar que el equilibrio iónico de la célula es también un factor importante para mantener el pH intracelular. Con respecto a esto, existen reportes donde tanto la modulación farmacológica de canales y transportadores aniónicos, como la depleción de ciertos iones en el medio de cultivo, pueden inducir *per se* cambios en el pH citosólico y en el volumen celular en distintos modelos como las células de glioma (Ringel *et al.*, 2000) o en sinaptosomas de cerebro de rata (Sánchez-Armass *et al.*, 1994; Martínez-Zaguilán *et al.*, 1994).

1.5. Potasio y Muerte

Adicionalmente a la participación del pH en los procesos de muerte, hay que mencionar que también se han implicado en este proceso a las alteraciones del volumen celular y las modificaciones en la concentración intracelular de potasio (Poppe *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 1997; Bortner *et al.*, 1997; Hughes *et al.*, 1997). Con respecto este último, una serie de estudios indican que durante la apoptosis en líneas celulares de linfomas (Bortner *et al.*, 1997) y en neuronas corticales de ratón (Yu *et al.*, 1997) los niveles basales de K^+ intracelular disminuyen a través de una salida de K^+ , que si se evita previene la muerte celular.



2. ANTECEDENTES

2.1. Modelos de muerte en neuronas granulares de cerebelo de rata (NGC).

Las neuronas granulares de cerebelo de rata (NGC) de 7-8 días de nacidas, mantenidas en cultivo con concentraciones altas de K^+ (KCl 25 mM; K25), se diferencian adquiriendo muchas de las características morfológicas, bioquímicas y electrofisiológicas de las neuronas maduras (Lasher et al., 1972; Levi et al., 1987). Estas células degeneran y mueren de manera apoptótica al ser cambiadas de este medio despolarizante (K25) a uno con la concentración fisiológica de potasio (KCl 5 mM; K5), de forma similar a lo observado durante el desarrollo del sistema nervioso cuando las neuronas requieren de entradas sinápticas como señal trófica para sobrevivir (D'Mello, 1993).

Por otro lado, el alcaloide bacteriano estaurosporina, un inhibidor no específico de proteínasas, se ha sido utilizado ampliamente como un inductor de apoptosis en varios tipos neuronales (Wang et al., 2000; Thomas y Mayle, 2000; Krohn et al., 1998; Mc Carthy et al., 1997; Koh et al., 1995). En las CGN se ha demostrado que la estaurosporina 30-500 nM induce muerte celular con características apoptóticas. Es importante mencionar que aunque ambas condiciones, K5 y estaurosporina, inducen apoptosis los mecanismos moleculares involucrados parecen ser diferentes; la disminución de potasio involucra un cambio en los niveles de calcio intracelular y una acumulación de especies reactivas de oxígeno como dos de los primeros eventos observados durante la apoptosis (Prehn et al., 1997; Kruman et al., 1998; Morán et al., 1999; Valencia y Morán, 2001), mientras que la acción de la estaurosporina es independiente de calcio y activa un grupo distinto de caspasas (Caballero-Benítez y Morán, 2003)



2.2. pH y Apoptosis.

Como se mencionó, uno de los eventos asociados a la muerte apoptótica es un cambio en el pH citosólico. Esto ha sido estudiado en diferentes tipos celulares y con distintos estímulos de muerte. Si bien este fenómeno es algo más bien generalizado en los modelos de muerte estudiados, no queda muy claro el significado que este evento tiene en el proceso general de muerte apoptótica. Es decir, no se ha determinado si las alteraciones del pH juegan algún papel iniciando, modulando o promoviendo la cascada bioquímica de eventos apoptóticos, o bien si sólo representa un epifenómeno resultante de otras circunstancias como una eventual depleción energética durante la apoptosis.

Actualmente existe un número importante de evidencias que apoyan la idea de que los cambios en el pH intracelular tienen una participación crítica para el desarrollo de la muerte apoptótica (Li y Eastman, 1995; Pérez-Sala *et al.*, 1995; Furlong *et al.*, 1997; Matsuyama *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2000; Barriere *et al.*, 2001 y Jeong *et al.*, 2001). En la gran mayoría de estos estudios se ha detectado una acidificación intracelular en respuesta a los estímulos empleados, lo que ha permitido sugerir que el ambiente ácido podría permitir o facilitar la activación de caspasas o DNAsas, cuyos pH de activación óptimos se encuentran en el rango de pH de 6.3-6.8, y que son responsables de cambios morfológicos (Furlong *et al.*, 1997 y Matsuyama *et al.*, 2000) y de la fragmentación internucleosomal del DNA, eventos, asociados a la muerte apoptótica (Collins *et al.*, 1996; Pérez-Sala *et al.*, 1995). Existen también otros estudios donde se ha detectado una alcalinización intracelular o bien la ausencia de cambios significativos en el pH durante las etapas críticas del proceso de muerte (Fujita *et al.*, 1999).

Existen también algunos trabajos en el Sistema Nervioso en los que se atribuye una participación importante del pH intracelular en el proceso apoptótico. En el caso de un episodio de



isquemia, como consecuencia de una reducción en el flujo sanguíneo cerebral, ocurre una acidificación intracelular transitoria temprana, que eventualmente lleva a una pérdida neuronal tanto por necrosis como por apoptosis (Ding *et al.*, 2000). Esto mismo se observa en un sistema *in vitro* cuando se someten rebanadas de hipocampo a un ambiente ácido (Ding *et al.*, 2000). Vincent y colaboradores (1991) describieron, que al inducir apoptosis con óxido nítrico (NO), ocurre una acidificación durante los primeros 30 min después de la adición del NO, seguida de una alcalinización sostenida durante las siguientes 6 horas. Cuando estas células se mantienen en un medio alcalino durante los primeros 30 min de tratamiento con ON se reduce la muerte neuronal. Utilizando el mismo modelo, se ha propuesto que la activación de receptores metabotrópicos de glutamato protegen de la muerte neuronal al modular al transportador Na^+/H^+ , lo que provoca alteraciones en el pH intracelular que reducen la acidificación observada en la apoptosis de estas células (Vincent *et al.*, 1999).



3. HIPÓTESIS

Si el pH intracelular participa en la muerte apoptótica de las NGC inducida por K5 y estaurosporina, entonces alterar el pH citosólico en estas neuronas, ya sea mediante la exposición de las células a diferentes pH o bien el tratamiento con fármacos que alteran el equilibrio iónico de las células o el funcionamiento de los transportadores relacionados con el pH intracelular, tendrá consecuencias directas sobre la sobrevivencia de las NGC mantenidas en condiciones normales y tratadas con K5 o estaurosporina.



4. OBJETIVOS

- Determinar si existen alteraciones en el pH intracelular de las NGC durante la muerte apoptótica inducida por K5 y estaurosporina 500 nM.
- Estudiar el efecto del pH extracelular en la viabilidad de las NGC y en la acción del K5 y estaurosporina sobre estas células.
- Evaluar el efecto de inhibidores de canales y transportadores aniónicos en la sobrevivencia de las NGC, en presencia y ausencia de los estímulos de muerte, K5 y estaurosporina.
- Conocer si el pH extracelular y los inhibidores de transportadores alteran el pH citosólico de las NGC.
- Estudiar si el pH y los inhibidores de los transportadores aniónicos afectan la activación de la caspasa-3 como parte del mecanismo que modifica la muerte celular inducida por K5 y estaurosporina en estas células.



5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Reactivos y Materiales

El suero fetal bovino y la penicilina / estreptomicina se obtuvieron de GIBCO (Grand Island, NY). El sustrato de caspasa-3 fue de Peptide Intl. (Louisvill, KY). El Hoechst 33258 y el BCECF [2',7'-bis-(2carboxyethyl)-5-(and 6)-carboxyfluorescein] fueron de Molecular Probes (Eugene, OR). La Poly-L-lisina (peso molecular > 300,000), tripsina, DNAsa, MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide], diacetato de fluoresceina (FDA) y citosina arabinosa fueron de Sigma (St. Louis, MO). Los fármacos 4,4'-Diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS), 4-acetamido-4'-isothiocyanato-stilbene-2,2'-disulfonic acid (SITS), 5-(N-Ethyl-N-isopropyl)amiloride (EIPA), 3-(Aminosulfonyl) - 5 - (butylamino) - 4 - phenoxybenzoic acid (Bumetanide), 5 - Nitro - 2 - (3-phenylpropylamino) benzoic acid (NPPB), 5-(Aminosulfonyl)-4-chloro-2-[(2-furanyl)methyl]amino benzoic acid (Furosemide), N-Ethylmaleimide (NEM) y Tamoxifen fueron también de Sigma (St Louis, MO).

5.2 Cultivos de Neuronas Granulares de Cerebelo de rata (NGC)

Se disecaron cerebelos de ratas Wistar de 8 días y las células se disociaron con tripsina y DNAsa. Las células se suspendieron y se sembraron a una densidad de 265×10^3 células/ml en cajas de plástico, con o sin cubreobjetos, previamente cubiertas con poli-L-lisina (5 µg/ml). El medio de cultivo contiene medio basal Eagle suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino inactivado por calor, 2 mM de glutamina, 25 mM de KCl, 50 U/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomicina. Las células sembradas en estas cajas fueron incubadas a 37° C en una atmósfera saturada de vapor de agua, con una presión parcial de CO₂ del 5% (95% aire). Para evitar la proliferación de células no neuronales, 20 horas después de sembrar, se añadió citosina arabinosa 10 µM. Los cultivos de NGC así obtenidos



contienen aproximadamente 95% de neuronas. Las células fueron mantenidas por 7-8 días *in vitro* (DIV).

5.3 Tratamiento de los cultivos

Todos los cultivos fueron tratados a lo 7-8 días *in vitro* (DIV). Se utilizaron 2 estímulos inductores de muerte apoptótica, el KCl 5 mM (K5) (D'Mello et al., 1993; Armstrong et al., 1997; Ni et al., 1997;) y la estaurosporina 500 nM (St) (Jacobson et al., 1996; Krohn et al., 1998). Se probaron fármacos y condiciones diversas para evaluar su efecto sobre la muerte. La transferencia de las CGN a medio K5 se efectuó retirando por completo el primer medio y sustituyéndolo por un medio fresco sin suero conteniendo 5mM de KCl a 37° C. La estaurosporina se disolvió en DMSO. El DIDS, SITS, EIPA Bumetanida, NPPB, Furosemida NEM y Tamoxifen, fueron disueltos en agua o en DMSO. En los experimentos diseñados para cambiar el pH extracelular se añadieron directamente al medio de cultivo soluciones de NaOH y HCl. Todas las células control se trataron con la misma cantidad de vehículo (agua o DMSO).

5.4 Cuantificación de la viabilidad celular

5.4.1 Transformación de MTT

La viabilidad celular fue estimada por e transformación de MTT de la siguiente manera: se añadió MTT (0.5 mg/ml) a los cultivos celulares y después de 15 min de incubación a 37° C se extrajo el azul de formazán formado con DMSO al 100 % lo que fue cuantificado espectroscópicamente excitando a una longitud de onda de 560 nm. Como se ha demostrado (Balázs et al., 1990; Morán et al., 1999) en este modelo existe una muy buena correlación entre la capacidad de transformar el MTT y la proporción de neuronas que aparecen intactas en microscopía de contraste de fases.



5.4.2 Tinción con Diacetato de Fluoresceína (FDA)

La sobrevivencia neuronal también fue medida incubando los cultivos de NGC con 5 μ M del fluoróforo permeable Diacetato de Fluoresceína (FDA), que una vez dentro de las células es procesado por lipasas en las células metabólicamente activas, tornándose fluorescente al excitarse a una longitud de onda de aproximadamente 520 nm. Se obtuvieron fotografías en un microscopio invertido de epifluorescencia utilizando un filtro Nikon B-2A y un objetivo de fluorescencia 40x (Nikon) para detectar a las células positivas a FDA. Para la cuantificación de la viabilidad del cultivo se escogieron tres campos aleatoriamente por experimento para cada condición y se contó el número de células totales (imágenes en contraste de fases) y las células metabólicamente activas (positivas a FDA). Los resultados se expresan como promedio de los porcentajes de células metabólicamente activas con respecto a las totales de tres experimentos independientes.

5.5 Evaluación de la condensación nuclear

La condensación nuclear de las NGC, fue evaluada tiñendo con el colorante fluorescente Hoechst. Los cultivos celulares sembrados en cubreobjetos, con las diferentes condiciones utilizadas, fueron fijados con p-formaldehído (4 %) durante 20 min, lavadas con PBS, incubadas con Hoechst (0.1 %) durante 10 min, lavadas con PBS dos veces y montadas en portaobjetos con una gota de PBS-glicerol (30:70). Las fotografías fueron obtenidas en un microscopio invertido de epifluorescencia, utilizando un objetivo de fluorescencia 40X de inmersión en aceite y un filtro Nikon UV-2A.



5.6 Mediciones intracelulares de pH

Recientemente han sido sintetizados indicadores fluorescentes que se unen a algunos iones y que son excitados o emiten a longitudes de onda ligeramente diferentes dependiendo de si están o no unidos al ión en cuestión. Algunos de estos indicadores son específicos para iones H^+ y por lo tanto son útiles para medir el pH intracelular e incluyen compuestos como el 2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxyfluorescein (BCECF), la piranina y el [5'(and 6')-carboxy-10-dimethylamino-3-hydroxy-spiro [7H-benzo [c] xanthene-7,1'(3H)-isobenzofuran]-3'- one (carboxi-SNARF-1). Los dos primeros se excitan a diferentes longitudes de onda dependiendo de su estado iónico, y emiten a una sola, mientras que en el último, ambas especies iónicas se excitan a la misma longitud de onda y cada una de éstas emite a diferentes λ (Fig. 7).

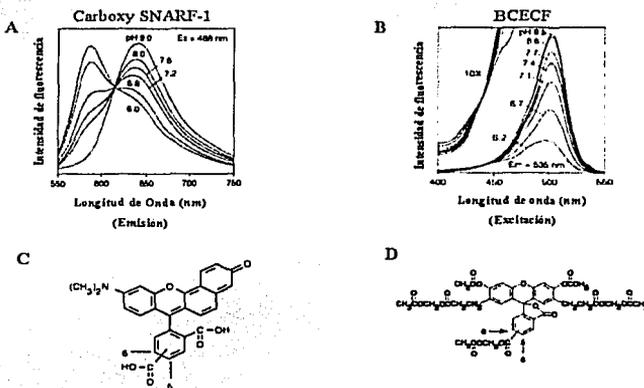


Fig 7. Estructura y sensibilidad al cambio de pH de Carboxi SNARF-1 y BCECF. Dependencia de pH en la intensidad de fluorescencia emitida a diferentes longitudes de onda, excitando a 488 nm, para carboxy SNARF-1 A. y. Dependencia de pH en la intensidad de fluorescencia emitida 335 nm para BCECF B. Fórmulas moleculares del carboxy SNARF-1 y BCECF respectivamente C y D. (Tomado de www.molecularprobes.com)

Los cambios en el pH intracelular [pHi] de NGC fueron registrados utilizando el fluoróforo sensible a pH de la siguiente manera: las NGC sembradas sobre cubreobjetos durante 7-8 DIV se incubaron con 5 μM de BCECF durante 30 min en el medio de cultivo. Posteriormente, los cubreobjetos fueron colocados en una cámara y perfundidos a una velocidad de aproximadamente 1 ml/min con un medio Krebs-HEPES



con los tratamientos inductores de muerte (KCl 5 mM o estaurosporina 500 nM). Las mediciones de [pH_i] se llevaron a cabo excitando a 501 nm y 480 nm conectando por medio de fibra óptica, la salida de un espectrofluorómetro SLM 8000 (SLM Aminco-Bowman, Rochester, NY) a un microscopio invertido con un filtro Nikon B-2A, para fijar la longitud de onda de emisión a 520 nm[±]10nm. Utilizando un objetivo de fluorescencia Nikon 40x de inmersión en aceite y una cámara amplificadora (c-2400-87), se digitalizaron campos conteniendo células cargadas con el fluoróforo. Las longitudes de onda de emisión a que trabajó el espectrofluorómetro, la digitalización de las imágenes y la determinación de las áreas donde las mediciones se llevaron a cabo, fueron controladas con el software Image-1 / FL (Universal Imaging Corp. West Chester, PA). Este sistema permite mediciones continuas del cociente de ambas longitudes de onda a intervalos de aproximadamente 2 s.

5.7 Determinación de la actividad de la caspasa-3

Después de los diferentes tratamientos, las NGC fueron lavadas con PBS y homogenizadas en un buffer de lectura [100 mM HEPES; 10 % (p/v) sacarosa; 0.1 % (p/v) CHAPS; 10 mM DTT; 1 mM EDTA; 1 mM PMSF; 1 mM NaF; 2 µg/ml aprotinina; 1 µg/ml pepstatina; y 5 µg/ml leupeptina]. La actividad de la caspasa-3 fue medida mediante una técnica fluorogénica (Thornberry, 1994) en un espectrofluorómetro (SLM Aminco-Bowman, Rochester, NY) usando un sustrato preferentemente procesado por caspasa-3 (25 µM) acoplado a metilcuomarina (Ac-DEVD-AMC). La actividad de caspasa-3 fue seguida por 10 min después de la adición del sustrato y el homogenado celular a 2 ml de la misma solución standard en la que se homogenizaron las células, pero con una concentración 10 veces menor de inhibidores de proteasas. Los resultados están expresados como el cambio en intensidad de fluorescencia /hora/µg de proteína.



5.8 Western Blots

Las proteínas totales presentes en los homogenados de cultivos de NGC fueron separadas a través de una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE por sus siglas en inglés) y posteriormente transferidas a una membrana de PVDF (Polyvinylidene fluoride). La membrana se bloqueó 1 h con leche descremada al 5% y se incubó a 4° C durante toda la noche con un anticuerpo policlonal de conejo anti-caspasa-3 p20 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., cat. sc-7148, dilución 1:30) que reconoce el precursor (32 KDa) y los fragmentos activos. Finalmente las membranas se incubaron con un anticuerpo secundario acoplado a fosfatasa alcalina, contra IgG de conejo (BIO-RAD Laboratories, Cat. 172-1016, Dilución 1:15 000) durante una hora a temperatura ambiente. La detección de esta proteína se llevó a cabo utilizando un sustrato quimioluminiscente para fosfatasa alcalina (CDP-Star, BioLabs, Inc., Cat. 7001).



6. RESULTADOS

La muerte celular inducida por St 500 nM (St) o por el cambio de medio de cultivo conteniendo KCl 25 mM (K25) por otro similar conteniendo KCl 5mM (K5) fue comprobada cuantificando la transformación de MTT en cultivos de neuronas granulares de cerebelo (NGC) de rata de 7-8 días *in vitro* (DIV) después de 24 h del tratamiento con los estímulos mencionados. Bajo estas condiciones y de acuerdo a lo descrito en otros trabajos, encontramos una reducción significativa en la transformación de MTT del 44.7 ± 12.9% para K5 y del 41 ± 7.11.1% para St en relación a las células control (fig 8).

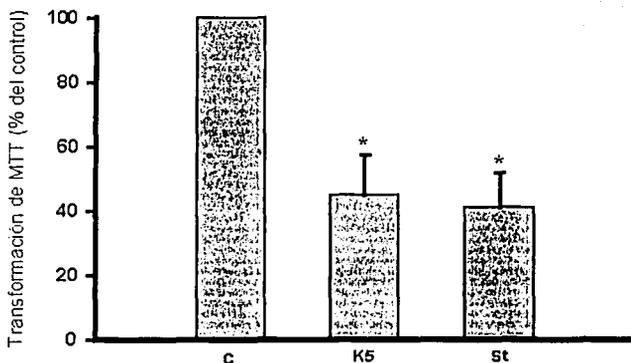


Fig 8. Efecto de los KCl 5mM (K5) y estaurosporina 500 nM (St) en la transformación de MTT de cultivos de neuronas granulares de cerebelo de rata. Los cultivos de NGC fueron evaluados 24h después del tratamiento. Los resultados se expresan como porcentajes del control [25 mM de KCl (C)].

La figura 9 muestra las mediciones de pH intracelular (pH_i), evaluado como la relación de fluorescencia a 501 y 450 nm emitida por el BCECF, en NGC tratadas con los distintos estímulos de muerte. Cuando las NGC se profundieron con un medio K25 y posteriormente se trataron con medio K5 se observó una alcalinización prácticamente inmediata con respecto a la medición basal en K25 la



que se mantuvo constante hasta regresar a las células a un medio K25. De acuerdo a las curvas de calibración efectuadas previamente bajo estas mismas condiciones, un cambio de 0.25 en la relación 501/450 equivale a una modificación de ~ 0.2 unidades de pH, equivalente a la alcalinización inducida por K5 (fig. 9a)

Contrario a lo observado con K5, cuando las NGC se profundieron con St no se detectó ningún cambio en la fluorescencia emitida por el BCECF durante el tiempo en el que se efectuaron los registros (fig 9b). En todos los casos, al final de la medición, las células respondieron de forma adecuada a una carga de NH_4Cl (fig. 9b), sugiriendo que la falta de efecto de la St no se debió a una falla técnica.

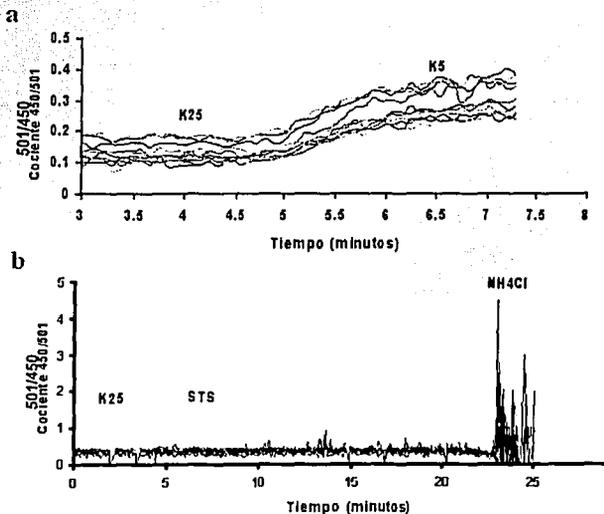


Fig 9. Efecto de K5 y St en el pH intracelular de NGC. Los cultivos de NGC de 7-8 DIV previamente cargados por 30 min con el fluoróforo sensible a pH BCECF, fueron perfundidos con un medio Krebs-Hepes con 25 mM de KCl (K25) y analizadas en un espectrofluorómetro a 450 nm y 501 nm. La fluorescencia se detectó en 15-20 neuronas individuales a 529 nm. Cuando el cociente de estas longitudes de onda se estabilizó (~ 5 min), las células fueron profundidas con a. un medio con 5 mM de KCl (K5) o b. Un medio con St 500 nM por un tiempo de 20-30 min. Al final del análisis se utilizó NH_4Cl para inducir una alcalinización y una acidificación intracelulares, como control de la sensibilidad del sistema.



Con el fin de conocer si una modificación del pH, afectaría la viabilidad de las NGC sometidas a los dos estímulos de muerte se estudió el efecto de drogas que directa o indirectamente podrían modificar el pH, así como otros iones que podrían estar implicados en este proceso de muerte. La tabla 1 indica las distintas drogas estudiadas y los mecanismos reportados en distintas preparaciones. La drogas empleadas incluyen Bumetanida, Furosemida, Tamoxifen, NPPB, SITS, DIDS y NEM; fármacos moduladores de la actividad de canales y transportadores aniónicos que podrían cambiar el pH_i de las células.

Abreviatura	Nombre	Mecanismo
Bumetanida	3-(Aminosulfonyl)-5-(butylamino)-4-phenoxybenzoic acid	Inhibidor del cotransportador Na ⁺ -K ⁺ -2Cl ⁻ y K ⁺ / Cl ⁻
Furosemida	5-(Aminosulfonyl)-4-chloro-2-([2-furanyl-methyl]amino) benzoic acid	Inhibidor no específico del cotransportador Na ⁺ -K ⁺ -2Cl ⁻ y del transporte aniónico
Tamoxifen	Tamoxifen	Bloqueador de canales de cloro
NPPB	5-Nitro-2-(3-phenylpropylamino) benzoic acid	Bloqueador de canales de cloro
SITS	4-acetamido-4'-isothiocyanato-stilbene-2,2'-disulfonic acid	Inhibidor del cotransportador Na ⁺ -HCO ₃ ⁻ y del intercambiador Cl ⁻ /HCO ₃ ⁻ y canales de cloro.
DIDS	4,4'-Diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid	Inhibidor del intercambiador Cl ⁻ /HCO ₃ ⁻ , del cotransportador Na ⁺ -HCO ₃ ⁻ y de canales de cloro.
EIPA	5-(N-Ethyl-N-isopropyl)amiloride	Inhibidor del intercambiador Na ⁺ /H ⁺
NEM	N-Ethylmaleimide	Potenciador del cotransportador K ⁺ / Cl ⁻

Tabla 1. Moduladores de la actividad de canales y transportadores aniónicos utilizados en el tratamiento de los cultivos de NGC de rata.



Se probaron distintas concentraciones de las drogas en la viabilidad, medida como transformación de MTT, en NGC tratadas con K5 y St. En el caso del tratamiento con K5, sólo la bumetanida 13.33 μM y la furosemida (40-200 μM) redujeron significativamente la muerte de NGC (fig. 10a) de ambos estímulos. Por otro lado, DIDS 500 μM , bumetanida (13.33 μM) y SITS (1 mM) redujeron la muerte inducida por St (fig 10b). El resto de los fármacos utilizados no mostró protección alguna. Ninguna de las concentraciones utilizadas de DIDS tuvo algún efecto significativo en los cultivos celulares tratados con K5.

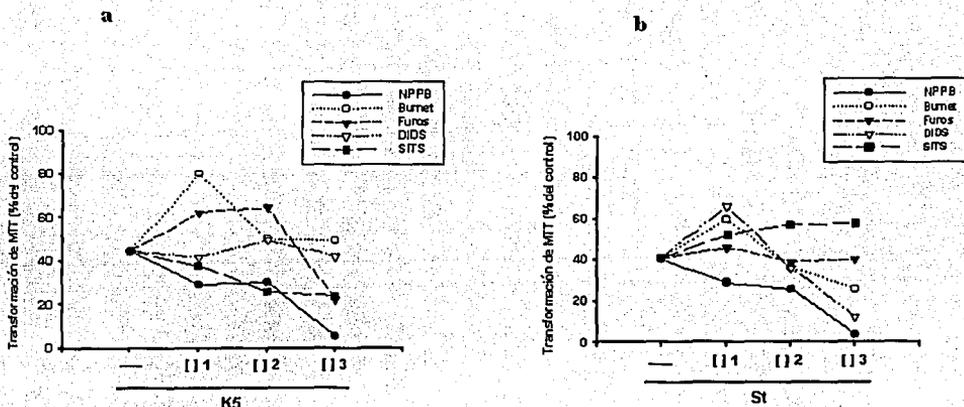
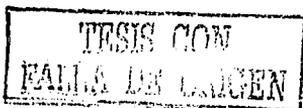


Fig. 10 Efecto de inhibidores de canales y transportadores aniónicos en la muerte celular de Neuronas Granulares de cerebelo de rata (NGC). La muerte fue inducida por a) KCl 5 mM (K5) y b) St 500 nM (St) [—]. Las concentraciones utilizadas para cada fármaco son: [1]; NPPB 2 μM , Bumetanida 13.33 μM , Furosemida 40 μM , DIDS y SITS 500 μM . [2]; NPPB 20 μM , Bumetanida 100 μM , Furosemida 200 μM , DIDS y SITS 1 mM. [3]; NPPB 200 μM , Bumetanida y Furosemida 1 mM, DIDS y SITS 1.5 mM. La cuantificación se llevó a cabo a las 24 h de haber tratado a las células con el estímulo apoptótico, mismo tiempo que estuvieron presentes las drogas.





Lo mismo ocurrió para el EIPA en la muerte inducida por cualquiera de los dos estímulos. En presencia de K5, el SITS, la furosemida y, particularmente, el NPPB tuvieron efectos tóxicos prácticamente a todas las concentraciones utilizadas. Cuando estas drogas se probaron en cultivos tratados con St, ninguna concentración de furosemida tuvo efecto alguno y el NPPB, al igual que con las neuronas en presencia de K5, resultó ser tóxico a las concentraciones empleadas. Para ambos casos (K5 y St) el NEM y el Tamoxifén resultaron tan dañinos a las concentraciones probadas, que la transformación de MTT fue nula en todos los casos.

Aunque normalmente se acepta que la transformación de MTT correlaciona muy bien con el estado del cultivo evaluado según su morfología en microscopía de contraste de fases (Balázs et al., 1990; Morán et al., 1999), se sabe que algunas condiciones pueden influir en la actividad mitocondrial o en el estado metabólico en general de las células, provocando una mayor transformación de MTT por parte de neuronas poco viables, produciendo un artificio que podría complicar la interpretación de los datos. Por esta razón se evaluó la viabilidad de las NGC con una tinción con Diacetato de Fluoresceína (FDA), mediante la cual se pueden contar las células vivas (positivas a FDA) y expresarlas en proporción a las neuronas totales. Los datos obtenidos con esta técnica fueron similares a los obtenidos por el ensayo de MTT observándose una sobrevivencia a las 24 h de 54.3 % para K5 y de 46.5 % para St. También fue corroborado el efecto protector del DIDS sobre la muerte inducida por St; sin embargo, también se encontró un efecto protector del DIDS en NGC tratadas con K5. Por otro lado, encontramos que la bumetanida 13.33 μM no tuvo efecto en las NGC tratados tanto con K5 como St (fig 11 y 12).

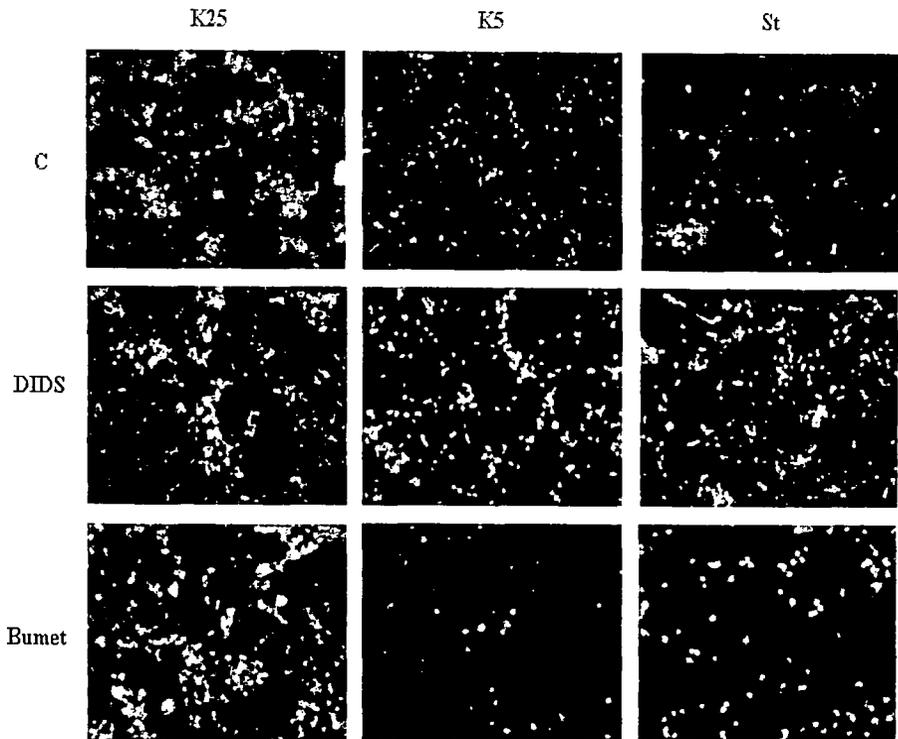


Fig 11. Imágenes de microscopía de fluorescencia de cultivos de NGC teñidas con FDA. La tinción se realizó a las 24 h d haber sido tratadas con K5 o St 500 nM en presencia o ausencia (C) de DIDS 500 μ M y Bumetanida 13.33 μ M.

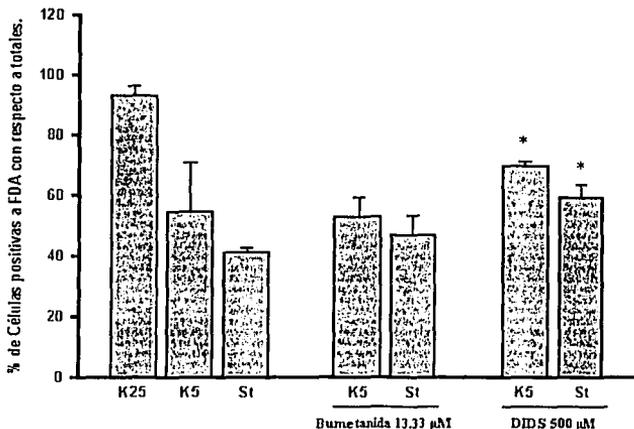


Fig 12. Porcentaje de células vivas (positivas a FDA) con respecto a células totales (células totales contadas en contraste de fases), de cultivos de NGC tratados con DIDS 500 μ M y Bumetanida 13.33 μ M en presencia de K5 o St. Las células fueron contadas en tres campos por experimento escogidos aleatoriamente, y los datos son la media de tres experimentos independientes \pm DS. * $p < 0.05$ contra K5 y St solos.

De manera paralela a estos experimentos evaluamos la condensación de la cromatina y la fragmentación nuclear bajo estas mismas condiciones. Como se mencionó antes este es un parámetro característico de la apoptosis y, aunque ha sido utilizado muy a menudo como sinónimo de apoptosis, no hay que perder de vista que podrían existir eventos celulares no relacionados con la muerte celular, donde hay normalmente condensación de cromatina, por lo que se entiende que estén descritos eventos apoptóticos donde no exista condensación nuclear y viceversa. En relación a esto, la figura 13 muestra que el DIDS disminuyó la condensación y fragmentación nuclear inducida por K5 y St (fig 13).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

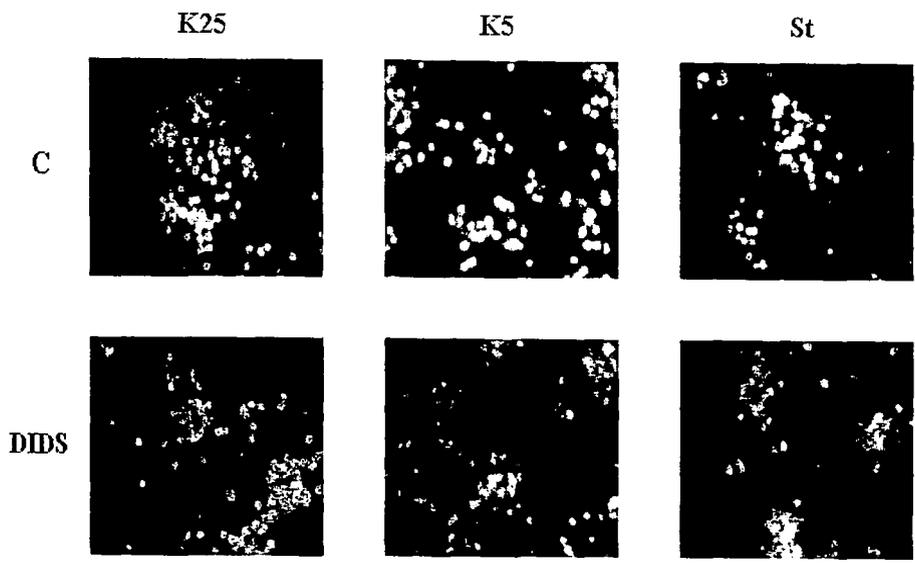


Fig 13. Efecto de DIDS 500 μ M en la condensación nuclear de Neuronas granulares de cerebelo de rata (NGC). Las células fueron tratadas con K5 o St 500 nM (St) y teñidas con Hoechst. La tinción se realizó a las 24 h de haberse dado el estímulo apoptótico y el DIDS estuvo todo el tiempo presente.



Uno de los objetivos de este trabajo fue evaluar el efecto de condiciones que podrían alterar el pH, en la muerte apoptótica de NGC, por lo que estudiamos la viabilidad de NGC tratadas con K5 o St en medios con diferentes pH. Los Δ pH reportados en este trabajo se calcularon de manera indirecta con base en una curva de titulación con NaOH del medio de cultivo (fig 14). Para esto, la temperatura del medio se mantuvo constante a 37 ° C durante las mediciones, que se efectuaron después de ajustar el pH inicial a 7.4, burbujear CO₂/aire (5 / 95%) directo en el medio. Debido a la imposibilidad técnica de medir el pH del medio de cultivo dentro de la incubadora donde se mantienen las células en este trabajo las condiciones que involucran cambios en el pH extracelular se reportan como Δ pH en relación al control que se calculó de 7.41.

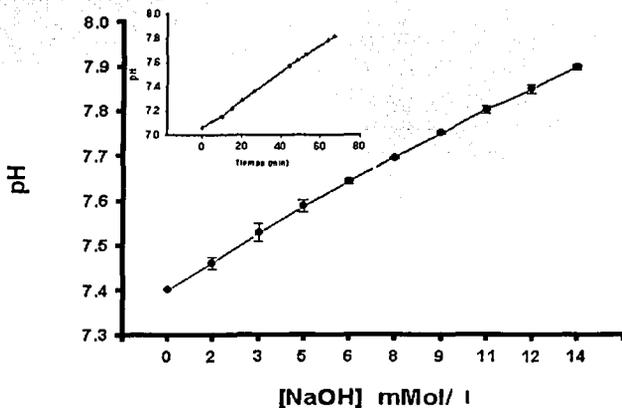


Fig 14. Curva de titulación de medio de cultivo. El pH de un volumen conocido de medio a 37° C fue ajustado a 7.4 burbujear directamente CO₂/aire, y en ese momento se añadieron alícuotas de NaOH hasta obtener la concentración indicada para cada lectura de pH. Inserto. La curva completa fue realizada en ~10 min, en los cuales el cambio en el pH del medio por desprendimiento de CO₂ es de alrededor de 0.10 unidades de pH. En el orden de magnitud del pH utilizado, este cambio es despreciable.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Para ajustar el pH del medio de cultivo se añadieron diferentes volúmenes de NaOH o HCl hasta obtener un pH -0.2, -0.38 ó -0.35 unidades por arriba del control (pH 7.41). En el caso de medios ácidos se añadió HCl hasta tener un pH con 0.07, 0.12 y 0.3 unidades por debajo del control (pH 7.41).

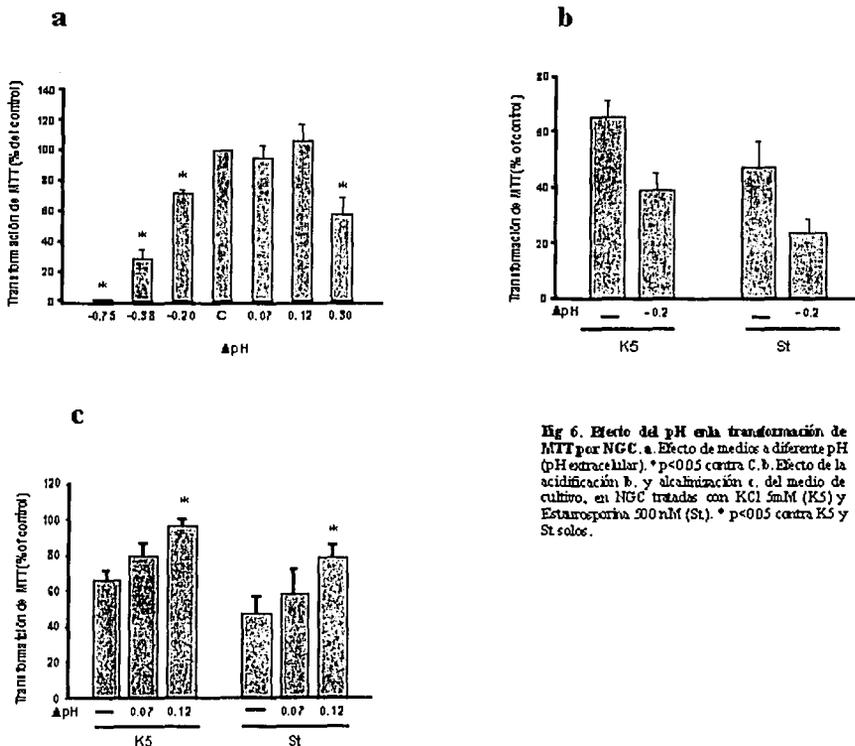


Fig 6. Efecto del pH en la transformación de NTI por NGC. a. Efecto de medios a diferente pH (pH extracelular). * $p < 0.05$ contra C. b. Efecto de la acidificación b. y alcalinización c. del medio de cultivo, en NGC tratados con KCl 5mM (K5) y Estaropirina 500 nM (St). * $p < 0.05$ contra K5 y St solos.



En la figura 15a se muestra que una acidificación extracelular es potencialmente más dañina que la alcalinización. Todas las concentraciones de HCl disminuyeron significativamente la transformación de MTT. La alcalinización del medio de cultivo 0.07 y 0.12 unidades de pH por encima del control (pH 7.41) no tuvo ningún efecto significativo en la transformación de MTT y sólo una alcalinización de de 0.3 unidades de pH resultó nociva para las células.

También se analizó el efecto del pH extracelular en la viabilidad de las NGC tratadas con K5 y St y se observó que acidificar el medio de cultivo 0.2 unidades de pH, potencia la disminución de la viabilidad de NGC inducida tanto con K5 como con St (fig 15 b). Por el contrario, alcalinizar el medio de cultivo 0.07 unidades de pH reduce de manera importante la muerte inducida por ambos estímulos (fig 15 c), mientras que una alcalinización de 0.12 unidades de pH, la protección es estadísticamente significativa y casi completa, particularmente para el K5 (fig 15c). Estos resultados se confirmaron completamente utilizando la tinción con FDA: la alcalinización del medio por 0.12 unidades de pH incrementó la sobrevivencia de las NGC de 44.1 % a 78.6 % para el K5, mientras que para la St la viabilidad aumentó de un 40.9 % a un 65.6 % (fig 16).

Con respecto a la condensación nuclear, encontramos que la alcalinización extracelular redujo parcialmente la condensación de la cromatina inducida por K5 y St (fig 17).

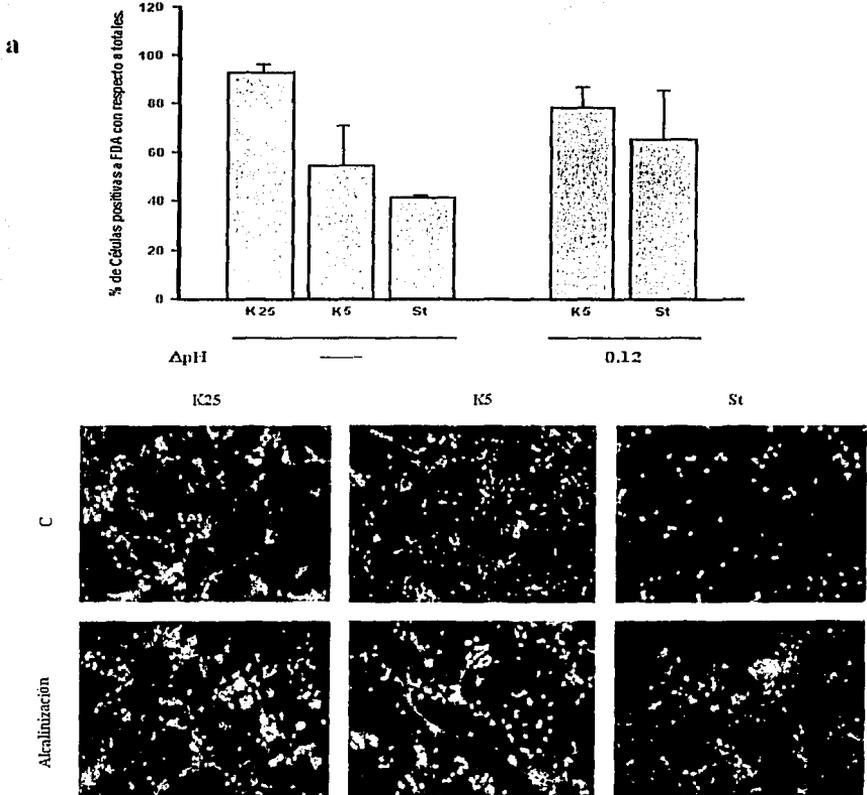


Fig 16. Efecto de la alcalinización extracelular en la viabilidad celular evaluada como tinción con FDA. a. Porcentaje de células vivas (positivas a FDA) con respecto a células totales (contadas en imagen de contraste de fases) en cultivos de NGC en un medio de cultivo 0.12 unidades de pH más básico en presencia de K5 o St. Las células fueron contadas en tres campos escogidos aleatoriamente por experimento, y los datos son la media de tres experimentos independientes \pm DS. * $p < 0.05$ contra K5 y St solos. b. Imágenes de microscopía de fluorescencia, de cultivos de NGC teñidas con FDA a las 24 h de haber inducido apoptosis con KCl 5 mM (K5) o St 500 nM (St) en un medio control (C) o 0.12 unidades de pH más básico (alcalinización).

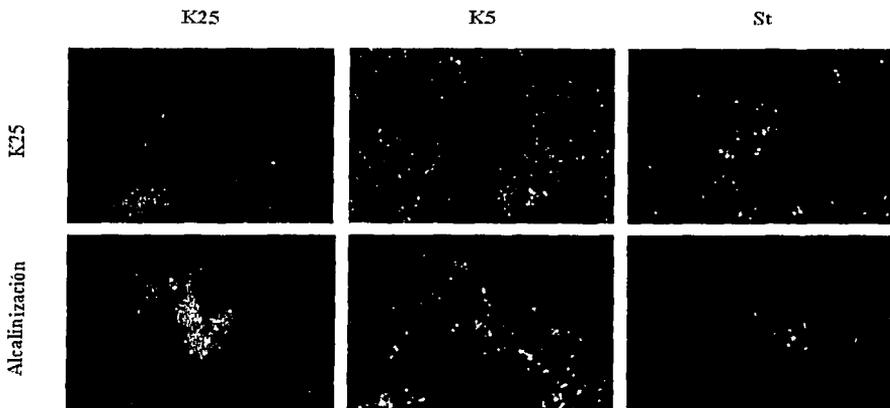


Fig 17. Efecto de una alcalinización del medio de cultivo en la condensación nuclear de Neuronas granulares de cerebelo de rata (NGC) tratadas con KCl 5mM (K5) y St 500 nM (St). Las células fueron teñidas con el colorante fluorescente Hoechst. La tinción se realizó a las 24 h de después del estímulo de apoptótico, y la alcalinización se mantuvo todo el tiempo.

Finalmente, medimos bajo estas mismas condiciones la activación de caspasa-3, una caspasa efectora que participa frecuentemente en procesos apoptóticos. Por un lado, analizamos la fragmentación de la procaspasa-3 mediante ensayos tipo Western blot para determinar de manera indirecta si ocurre una activación de la caspasa. Los resultados obtenidos muestran por un lado que tanto el K5 como la St inducen la generación del fragmento activo de la caspasa-3 (~ 20 kDa) y que el tratamiento con bumetanida $13.333 \mu\text{M}$ lo reduce marcadamente, mientras que con DIDS $500 \mu\text{M}$ el fragmento desaparece completamente en ambas condiciones (fig 18 a). Estos resultados se confirmaron al medir la actividad de esta caspasa, utilizando un sustrato sintético (Ac-DEVD-AMC procesado preferentemente por la caspasa-3. La actividad de esta proteasa fue muy baja en K25 y se incrementó

Resultados

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



marcadamente bajo las condiciones de K5 y St. Esta actividad de la caspasa-3 disminuyó significativamente al en homogenados de células tratadas con DIDS 500 μM y en menor medida con Bumetanida 13.33 μM (fig 18 b).

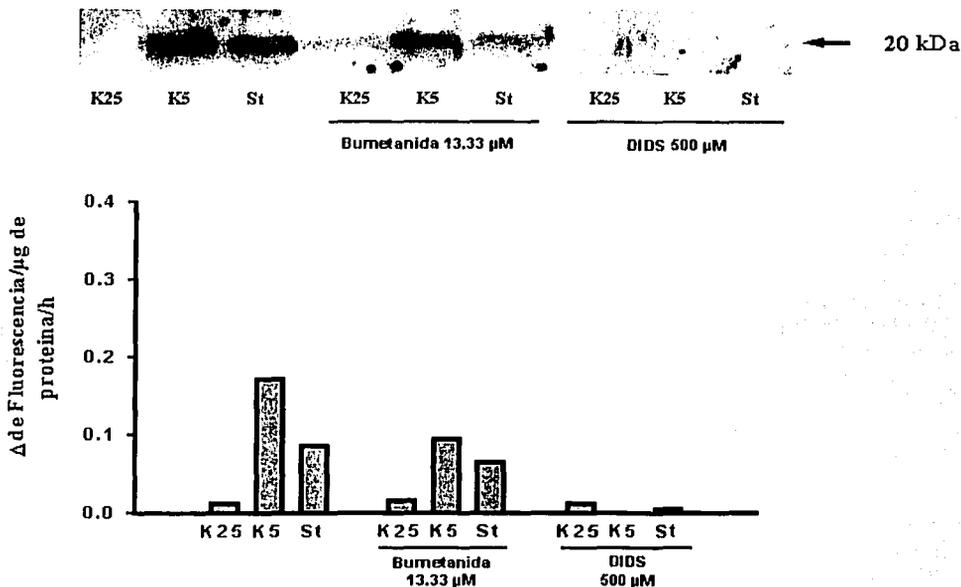


Fig 18. Evaluación de la fragmentación y actividad de la caspasa-3. a. Western blot mostrando el fragmento activo (\sim p 20) de la caspasa-3 en homogenados de cultivos de NGC tratados con Bumetanida 13.33 μM o DIDS 500 μM en presencia o ausencia de los estímulos apoptóticos K5 y St 500 nM por 8 h. b. Actividad de caspasa-3 medida como aumento en la fluorescencia producto del rompimiento del sustrato preferentemente procesado por caspasa-3, Ac-DEVD-AMC, en neuronas tratadas como en a. (Datos obtenidos de un experimento representativo)



De manera adicional, medimos la actividad de la caspasa-3 a diferentes pH en homogenados de células tratadas con K5 ó K25 por 8 h (K5, 8 h), condiciones con una actividad muy alta y muy baja, respectivamente. La figura 19 muestra que la caspasa-3 activa funciona de manera muy similar en un rango de pH de 7.1 a 7.7, sin embargo en pH fuera de este rango hubo una tendencia a disminuir la actividad. La procaspasa inactiva (K25) no modifica su actividad a los pH medidos.

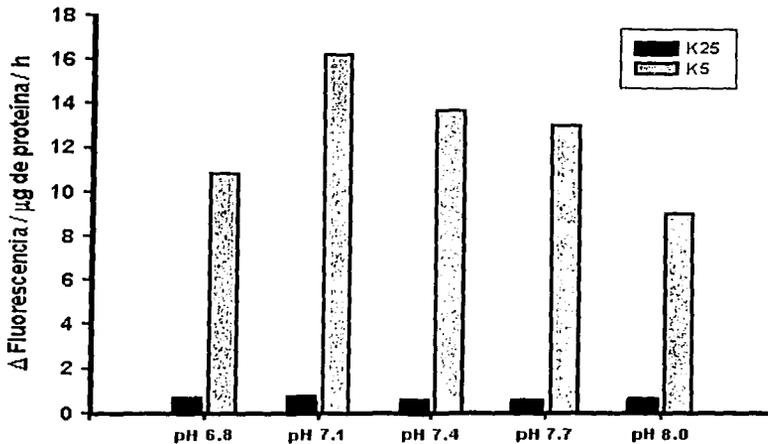


Fig. 19. Actividad de caspasa-3 medida como aumento en la fluorescencia producto del rompimiento del sustrato preferentemente procesado por caspasa-3, Ac-DEVD-AMC. Las mediciones fueron realizadas en soluciones con los pH indicados. Los homogenados se obtuvieron de NGC tratadas con KCl 5mM 8 h (K5) y cultivos controles (K25) (Los datos corresponden a un experimento representativo).



7. DISCUSIÓN

Uno de los principales mecanismos reguladores de pH en muchos tipos celulares es el transportador $\text{Cl}^- / \text{HCO}_3^-$ que funciona sacando iones cloro (junto con protones) y metiendo iones bicarbonato (que neutralizan protones dentro de la célula) en situaciones donde el citosol se vuelve muy ácido. Se sabe también que este transportador se inhibe de manera efectiva por DIDS. Por otro lado, parece existir una relación entre el proceso de muerte apoptótica y el pH intracelular en diversos modelos de estudio, sin que exista un consenso sobre la naturaleza del cambio de pH y la muerte celular observada. Así, basados en estas evidencias, en el presente trabajo evaluamos el efecto del DIDS y otros fármacos, relacionados directa o indirectamente con el pH_i , en la muerte apoptótica neuronal. Uno de los resultados más interesantes del presente trabajo fue que el DIDS protegió de manera significativa contra la muerte inducida por K5. Este efecto protector se reflejó en la viabilidad medida como tinción con FDA, así como en la preservación de la morfología neuronal.

En relación a los resultados mencionados anteriormente, es interesante indicar que el efecto protector del DIDS no fue tan evidente cuando se evaluó como transformación de MTT. En este sentido, la cuantificación de la transformación de MTT puede alterarse por diversas causas que no reflejan necesariamente la viabilidad celular y que van desde diversos estados metabólicos de las células hasta circunstancias como interferencias en la cuantificación espectroscópica del azul de formazán debidas a las características de los fármacos empleados. Es por esta razón que decidimos darle prioridad al análisis morfológico, incluyendo la tinción con FDA, sobre la transformación de MTT. En el caso particular de la falta de efecto del DIDS sobre la reducción de MMT inducida por K5 no parece relacionarse con un problema técnico pues el DIDS sí incrementó la transformación de MTT en células tratadas con estaurosporina, por lo que es posible que el efecto observado se deba a una



acción directamente relacionada con los mecanismos iniciados por el K5 en la muerte celular y no a un artefacto producido por el fármaco utilizado.

Una de las primeras consecuencias del tratamiento de las NGC con K5 fue una alcalinización intracelular. Estos resultados coinciden con los estudios de Fujita *et al.*, (1999) quienes encontraron una alcalinización del citosol de células endoteliales y cardiomiocitos asociada a la muerte inducida por estaurosporina. En ese estudio tanto la alcalinización como la muerte se previno con DIDS por lo que proponen que el aumento en el pH intracelular, parece estar mediado por la entrada de HCO_3^- a la célula utilizando el transportador $\text{Cl}^- / \text{HCO}_3^-$, y no por bombas de protones o el intercambiador Na^+ / H^+ dado que sus inhibidores no modificaron la alcalinización observada ni el proceso de muerte (Fujita *et al.*, 1999). Otros estudios, sin embargo, han demostrado que el DIDS es incapaz de modificar el pH_i tanto en condiciones basales como en presencia de estímulos apoptóticos como la St o el K5 (Himi *et al.* 2002). Por ello, sería interesante evaluar si el DIDS modifica el pH_i bajo nuestras condiciones experimentales.

En el caso de la estaurosporina el DIDS protegió marcadamente a las NGC en todas las pruebas de sobrevivencia efectuadas. También encontramos, de acuerdo a Himi *et al.* (2002), pero contrario a lo encontrado por Fujita *et al.* (1999), que la estaurosporina no generó ningún cambio en el pH_i de las NGC durante los primeros 30 minutos de tratamiento. No se puede descartar la posibilidad, sin embargo, de que exista algún cambio importante en el pH citosólico a tiempos más largos y que la protección del DIDS esté también relacionada con la inhibición de cambios en el pH. Con relación a esto, sabe que ocurren cambios en el pH_i alrededor de 7 h post-inducción de la muerte (Furlong *et al.*, 1997). También se ha descrito en neuronas una respuesta bifásica compuesta por una acidificación a tiempos cortos seguida de una alcalinización prolongada (Vincent *et al.*, 1999), lo que pudiera estar mediado por un mecanismo similar al aquí propuesto.



Por otro lado, esto podría ser congruente con el modelo propuesto en el sentido de que la actividad de las bombas de protones tipo V está regulada entre otras cosas por cinasas (Boyle *et al.*, 1997; Rajotte *et al.*, 1992), de manera que la St –un inhibidor de amplio espectro de cinasas- podría afectar la actividad de bombas de protones que revertieran la alcalinización inicial observada en la muerte inducida por K5. De ser este el caso, tanto la ruta de muerte inducida con St, como el mecanismo de protección del DIDS, se antojarían independientes de pH.

Cuando utilizamos SITS, un compuesto con propiedades farmacológicas similares al DIDS, no observamos protección alguna contra el K5 y sólo una protección parcial a concentraciones muy elevadas en el caso de la estaurosporina. Parte de estas diferencias con la acción del DIDS podría deberse a la posibilidad de que el SITS esté actuando más directamente sobre el intercambiador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ como se ha reportado.

Como se mencionó anteriormente, en la mayoría de los trabajos que asocian cambios en el pH_i con la muerte apoptótica se ha observado una acidificación citosólica (Li y Eastman, 1995; Pérez-Sala *et al.*, 1995; Furlong *et al.*, 1997; Matsuyama *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2000; Barriere *et al.*, 2001 y Jeong *et al.*, 2001). Esta condición podría promover u optimizar la activación de proteasas –particularmente caspasas- y/o endonucleasas, ambas estrechamente relacionadas con la apoptosis. Tomando en cuenta esto, ¿cuál podría ser el papel de la alcalinización intracelular observada en el caso de la estimulación con K5 en nuestro modelo? Una de las posibles respuestas a esta pregunta, es que quizá esta alcalinización ocurra sólo de manera transitoria y funcione como un estímulo que podría estar relacionado con la regulación negativa de los sistemas que mantienen la homeostasis de pH_i, cuya actividad está modulada entre otras cosas por el mismo pH. Esta disminución hipotética en la actividad de estos mecanismos podría ser causante de una acidificación posterior que eventualmente permitiría la activación de caspasas y endonucleasas que terminarían ejecutando la muerte celular. Con respecto a



esta especulación, podemos decir que obtuvimos resultados concernientes a la dependencia de pH de la actividad de caspasa-3, donde observamos una tendencia de esta proteasa a aumentar su actividad a un pH relativamente ácido (7.1) lo que coincide con lo reportado por Furlong *et al.* (1997) y Matsuyama *et al.* (2000). Paralelamente a esto también observamos que el DIDS inhibió casi por completo tanto la actividad como la fragmentación de la caspasa-3, inducidas por K5 y St. Lo que sugiere que la acción del DIDS ocurre en una etapa previa al inicio de la activación de las caspasas, lo que se sabe ocurre dentro de las primeras 4 h del proceso apoptótico (Morán *et al.*, 1999). En relación a lo anterior, una de las condiciones que resultó efectiva en la protección de la muerte inducida por las NGC fue la alcalinización del medio extracelular. Aunque no evaluamos las consecuencias de esta condición en el pH_i, es posible que este tratamiento modifique el pH_i *per se* y que se reviertan o modifiquen los cambios observados con K5. Por otra parte, podríamos también especular utilizando el mismo mecanismo pH-dependiente propuesto para el DIDS: una alcalinización extracelular podría provocar un aumento del pH intracelular y esto podría inhibir el transportador Cl⁻/HCO₃⁻ de manera que el citosol se acidificaría y revertiría el efecto alcalinizante del K5 lo que reduciría el eventual funcionamiento de proteasas y DNAsas relacionadas con la apoptosis.

Una de las condiciones que consistentemente protegió contra la muerte apoptótica inducida por K5 y St fue el tratamiento con bumetanida y, en menor grado, furosemida. Esto se reflejó de manera significativa en la actividad y fragmentación de la caspasa-3. El efecto protector observado para ambos fármacos probablemente esté relacionado con su acción inhibitoria del cotransportador Na⁺-K⁺-2Cl⁻ y K⁺-Cl⁻ por lo que podrían influir en la homeostasis de potasio intracelular. Esta observación está de acuerdo con lo sugerido por distintos grupos en una serie de modelos en el sentido que la concentración intracelular de potasio y su liberación están implicados en la regulación de proteasas, DNAsas y, consecuentemente, en la muerte apoptótica.



Es pertinente mencionar que el hecho de que algunos fármacos o condiciones probadas en este trabajo tengan algún efecto diferencial en la muerte inducida para cada uno de los 2 estímulos utilizados, confirma el hecho de que diferentes inductores de muerte emplean diferentes vías, al menos en una fase inicial. Es posible que estas vías puedan convergir en algún punto de la cascada bioquímica de muerte, como podrían ser las caspasas efectoras, incluida la caspasa-3. Estas consideraciones nos sugieren pensar que es probable que la participación del pH_i en la muerte apoptótica no sea un evento de carácter universal, sino que juegue un papel importante en alguna de las posibles rutas que las células, o algunas de ellas, sigan para morir. Finalmente, hay que entender que cualquiera que sea la participación del pH_i , éste sería sólo una de las múltiples piezas del complejo engranaje que inicia, regula o mantiene el proceso de la muerte apoptótica.



8. CONCLUSIONES

- El DIDS protege del daño morfológico de las NGC inducido por K5 y reduce considerablemente la condensación nuclear y la fragmentación y actividad de la caspasa-3 inducidas por K5
- El DIDS protege a las NGC de la muerte, la condensación nuclear, la fragmentación y la actividad de la caspasa-3 inducida por estaurosporina, evaluada con todos los parámetros de viabilidad.
- La bumetanida protegió a las NGC de la muerte inducida por K5 y St, medida como transformación de MTT. La protección fue menos evidente en la morfología celular.
- La bumetanida inhibió parcial, pero significativamente tanto la fragmentación como la actividad de la caspasa-3 inducida por K5 y estaurosporina.
- El KCl 5 mM induce una alcalinización intracelular inmediata en NGC, que se mantiene durante el estímulo, mientras que la estaurosporina no induce ningún cambio en el pH intracelular neuronal, al menos durante los primeros 30 min.
- Una alcalinización del medio extracelular protege a las NGC de la muerte inducida por K5 y St, evaluada por transformación de MTT, incorporación de FDA y mediante un análisis morfológico.
- La muerte apoptótica parece involucrar cambios en el pH, que pudieran afectar la actividad de las caspasas. El grado de participación de este factor parece depender del tipo celular y del tipo de estímulo empleado.
- Otros factores parecen contribuir a la inducción de la muerte apoptótica de las NGC como los flujos iónicos, particularmente de potasio.



9. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K y Walter P (2002). *Molecular Biology of the Cell*. 4a edición. pp 571, 622,623. Garland Science, Estados Unidos.
2. Bachrecke EH (2002). How death shapes life during development. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. 3: 779-787.
3. Balázs R, Gallo V y Kingsbury A (1998). Effect of depolarization on the maturation of cerebellar granule cells in culture. *Developmental Brain Research*. 40:269-279.
4. Balázs R, Jorgen OS y Hack N (1988). N-methyl-D-aspartate promotes the survival of cerebellar granule cells in culture. *Neuroscience*. 27: 437-451.
5. Barrière H, Poujeol C, Tauc M, Blasi JM, Counillon L y Poujeol P (2001). CFTR modulates programmed cell death by decreasing intracellular pH in chinese hamster lung fibroblasts. *American Journal of Physiology and Cell Physiology*. 281: C810-C824.
6. Benzi G, Ghigini B, Moreti A, Dagani F y Villa RF (1996). Is the Mg(2+)-ATP-dependent proton pumping activity of the synaptic vesicles a factor involved in the cerebellar hypoxia? *Neurochemistry Research*. 21: 7-19.
7. Bortner CD, Hughes FM y Cidlowski JA (1997). A primary role for K⁺ and Na⁺ efflux in the activation of apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*. 272: 32436-32442.
8. Boyle KM, Irwin JP, Humes BR y Runge SW (1997). Apoptosis in C3H-10T1/2 cells: roles of intracellular pH, protein Kinase C, and the Na⁺/H⁺ antiporter. *Journal of Cell Biochemistry*. 67:231-240.
9. Burgoyne R y Cambray-Deakin M (1988). The cellular neurobiology of neuronal development: the cerebellar granule cell. *Brain Research Reviews*. 13: 77-101.
10. Caballero-Benítez A y Morán J (2003). Caspase activation pathways induced by staurosporine and low potassium: role of caspase-2. *Journal of Neuroscience Research*. 71: 383-396.
11. Collins MK, Furlong IJ, Malde P, Acaso R, Oliver J y LopezRivas A (1996). An apoptotic endonuclease activated either by decreasing pH or by increasing calcium. *Journal of Cell Science*. 109:2393-2399.
12. Ding D, Moskowitz SI, Li R, Lee SB, Esteban M, Tomaselli K, Chan J y Bergold PJ (2000). Acidosis induces necrosis and apoptosis of cultured hippocampal neurons. *Experimental Neurology*. 162: 1-12.



13. D'Mello SR, Galli C, Ciotti T y Calissano P (1993). Induction of apoptosis in cerebellar granule neurons by low potassium: inhibition of death by insulin-like growth factor I and cAMP. *Proceedings of the National Academy of Science*. 90: 10989-10993.
14. Earnshaw WC, Martins LM y Kuafmann SH (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates and functions during apoptosis. *Annual Reviews of Biochemistry*. 68: 383-424.
15. Fujita H, Ishizaki Y, Yanagisawa A, Morita I, Murota S y Ishikawa K (1999). Possible involvement of anion-exchanger in apoptosis of endothelial cells and cardiomyocytes. *Cell Biology International*. 4: 241-249.
16. Furlong IJ, Acaso R, LopezRivas A y Collins MK (1997) Intracellular alkalinization induces apoptosis by stimulating ICE-like protease activity. *Journal of Cell Science*. 110: 653-661.
17. Ghez C y Tach WT. The cerebellum en Kandel ER, Schwartz JH y Jessell TM (eds.) (2000) *Principles of Neuronal Science*. 4a edición. pp. 832. McGraw-Hill, Inc. EUA.
18. Goncalves PP, Meireles SM, Gravato C y Vale MG (1998). Ca²⁺-H⁺ antiport activity in synaptic vesicles isolated from sheep brain cortex. *Neuroscience Letters*. 15: 87-90.
19. Gorman AM, Orrenius S y Ceccatelli S (1998). Apoptosis in neuronal cells: role of caspases. *Neuroreports*. 9: R49-55.
20. Hengartner MO (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 407: 770-776.
21. Himi T, Ishizaki Y y Murota S (2002). 4,4'-Diisothiocyano-2,2'-Stilbenedisulfonate protects culture cerebellar granule neurons from death. *Life Sciences*. 70: 1235-1249.
22. Hughes FM, Bortner CD, Purdy GD y Cidlowski JA. Intracellular K⁺ suppresses the activation of apoptosis in lymphocytes (1997). *The Journal of Biological Chemistry*. 272: 30567-30576.
23. Jacobson MD, Weil M y Raff MC (1997). Programmed cell death in animal development. *Cell*. 88: 347-354.
24. Jeong D, Kim TS, Lee JW, Kim KT, Kim HJ, Kim I y Kim IY (2001). Blocking of acidosis-mediated apoptosis by a reduction of lactate dehydrogenase activity through antisense mRNA expression. *Biochemical and Biophysical Communications*. 289: 1141-1149.
25. Kerr JFR y Harmon BV. Definition and incidence of apoptosis: An historical perspective en Tomei LD y Cope FO (eds.). (1991). *Apoptosis: The molecular basis of cell death* (Current communications in cell and molecular biology. Vol 3). pp 29. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Estados Unidos.
26. Koh JY, Wie MB, Gwag BJ, Sensi SL, Canzoniero LM, Demaro J, Csernansky C y Choi DW (1995). Staurosporine-induced neuronal apoptosis. *Experimental Neurology*. 135: 153-159.



27. Krammer PH. (2000). CD95's deadly mission in the immune system. *Nature*. 407: 789-795.
28. Krohn AJ, Preis E y Prehn JH. Staurosporine-induced apoptosis of cultured rat hippocampal neurons involves caspase-1-like proteases as upstream initiators and increased production of superoxide as a main downstream effector (1998). *Journal of Neuroscience*. 18: 8186-8197.
29. Kruman I, Guo Q y Mattson MP (1998). Calcium and reactive oxygen species mediate staurosporine-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis in PC12 cells. *Journal of Neuroscience Research*. 51:293-308.
30. Kuida K, Zheng TS, Na S, Kuang C, Yang D, Karasuyama H, Rakic P y Flavell RA (1996). Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPO32-deficient mice. *Nature* 384:368-372.
31. Liu D, Martino G, Thangaraju M, Sharma M, Halwani F, Shen S, Patel Y y Srikant CB (2000). *The Journal of Biological Chemistry*. 275: 9244-9250.
32. Lockshin RA y Williams CM (1965). Programmed cell death. I. Cytology of degeneration in the intersegmental muscles of the pernyi silkworm. *Journal of Insect Physiology*. 11: 123-133.
33. Martínez-Zaguilán R, Sánchez-Armass S y Gillies RJ (1994). Regulation of pH in rat brain synaptosomes. II. Role of Cl⁻. *Journal of Neurophysiology*. 71: 2249-2257.
34. Matsuyama S, Llopis J, Deveraux QL, Tsien RY y Reed JC. (2000). Changes in intramitochondrial and cytosolic pH: early events that modulate caspase activation during apoptosis. *Nature Cell Biology*. 2: 318-325.
35. McCarthy MJ, Rubin LI y Philpott KL (1997). Involvement of caspases in sympathetic neuron apoptosis. *Journal of Cell Science*. 110 2165-2173.
36. Meier P, Finch A y Evan G (2000). Apoptosis in development. *Nature*. 407: 796-801.
37. Morán J, Itoh T, Reddy UR, Chen M, Alnemri ES y Pleasure D (1999). Caspase-3 expression by cerebellar granule neurons is regulated by calcium and cyclic AMP. *Journal of Neurochemistry*. 73: 568-577.
38. Morán J y Rivera-Gaxiola M (1992). Effect of potassium and N-methyl-D-aspartate on the aspartate amino transferase activity in cultured cerebellar granule cells. *Journal of Neuroscience Research*. 33: 329-247.
39. Nelson DL y Cox MM (2000). *Lehninger Principles of Biochemistry*. pp 94-106. Worth Publishers, Estados Unidos.



40. Oppenheim RW (1991). Cell death during development of nervous system. *Annual Review of Neuroscience*. 14: 453-501.
41. Pappas CA y Ransom BR (1993). A depolarization-stimulated, baflomycin-inhibitable H⁺ pump in hippocampal astrocytes. *Glia*. 9: 280-291.
42. Perona R y Serrano R (1988). Increased pH and tumorigenicity of fibroblasts expressing a yeast proton pump. *Nature*. 334: 438-440.
43. Poppe M, Reimertz C, Düßmann H, Krohn AJ, Luetjens CM, Böckelmann D, Nieminen A, Kögel D y Prehn JHM (2001). Dissipation of potassium and proton gradients inhibits mitochondrial hyperpolarization and cytochrome c release during neural apoptosis. *The Journal of Neuroscience*. 21: 4551-4563.
44. Prehn JH, Jordan J, Ghadge GD, Preis E, Galindo MF, Roos RP, Kriegstein Jy Miller RJ (1997). Ca²⁺ and reactive oxygen species in staurosporine-induced neuronal apoptosis. *Journal of Neurochemistry*. 68:1679-1685.
45. Rajotte D, Haddad P, Haman E, Cragoe E y Hoang T (1992). Role of protein kinase-C and the Na⁺/H⁺ antiporter in suppression of apoptosis by granulocyte macrophage colony stimulating factor and interleukin-3. *Journal of Biological Chemistry*. 267: 9980-9987.
46. Ringel F, Chang RC, Staub F, Baethmann A y Plesnila N (2000). Contribution of anion transporters to the acidosis-induced swelling and intracellular acidification of glial cells. *Journal of Neurochemistry*. 75:125-132.
47. Rodriguez J y Lazebnik Y (1999). Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Development*. 13: 3179-3184
48. de la Rosa EJ y de Pablo F (2000). Cell death in early neural development: beyond the neurotrophic theory. *Trends in Neuroscience*. 23: 454-458.
49. Salvesen GS y Dixit VM (1999). Caspase activation: the induced-proximity model. *Proceedures of the National Academy of Science*. 96: 10964-10967
50. Sánchez-Armass S, Martínez-Zaguilán R, Martínez GM y Gillies RJ (1994). Regulation of pH in rat brain synaptosomes. I. Role of sodium, bicarbonate and potassium. *Journal of Neurophysiology*. 71: 2236-2248.
51. Schulz JB, Weller M y Klockgether T (1996). Potassium deprivation-induced apoptosis of cerebellar granule neurons: a sequential requirement for new mRNA and protein synthesis, ICE-like protease activity, and reactive oxygen species. *Journal of Neuroscience*. 16:4696-4706.
52. Shrode LD, Tapper H y Grinstein S (1997). Role of intracellular pH in proliferation, transformation and apoptosis. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 29: 393-399.



53. Soengas MS. *et al.* (2001) Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature*. 409: 207-211.
54. Stassi G y De Maria R (2002). Autoimmune thyroid disease: new models of cell death in autoimmunity. *Nature Review. Immunology*. 2: 195-204.
55. Stennicke HR *et al* (1999). Caspase-9 can be activated without proteolytic processing. *Journal of Biological Chemistry*. 274: 8359-8362.
56. Stubbs M, Veech RL y Griffiths (1995). Tumor metabolism: the lessons of magnetic resonance spectroscopy. *Advances in Enzyme Regulation*. 35: 101-115
57. Thomas CE y Mayle DA (2000). NMDA-sensitive neurons profoundly influence delayed staurosporine-induced apoptosis in rat mixed cortical neuronal cultures. *Brain Research* 884: 163-173.
58. Thornberry NA y Lazebnik Y (1998). Caspases: enemies within. *Science*. 281: 1312-1316.
59. Valencia A y Moran J (2001). Roll of oxidative stress in the apoptotic cell death of cultured cerebellar granule neurons. *Journal of Neuroscience Research*. 64: 284-297
60. Vaux DL, Cory S y Adams JM (1988). Bcl-2 promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*. 335: 440-442.
61. Vaux DL y Korsmeyer SJ (1999). Cell death in development. *Cell*. 96: 245-254.
62. Vincent AM, TenBroeke M y Maiese K (1999). Metabotropic glutamate receptors prevent programmed cell death through the modulation of neuronal endonuclease activity and intracellular pH. *Experimental Neurology*. 155: 79-94.
63. Vincent AM, TenBroeke M y Maiese K. Neuronal intracellular pH directly mediates nitric oxide-induced programmed cell death (1997). *Journal of Neurobiology* 40: 171-184.
64. Volk C, Albert T y Kempfsky OS (1998). A proton-translocating H⁺-ATPase is involved in C6 glial pH regulation. *Biochimica et Biophysica Acta*. 24:28-36.
65. Wang X, Xiao AY, Ichinose T y Yu SP (2000). Effects of tetraethylammonium analogs on apoptosis and membrane currents in cultured cortical neurons. *Journal of Pharmacological Experimental Therapy*. 295: 524-30.
66. Williams AC, Collard TJ y Paraskeva C (1999). An acidic environment leads to p53 dependent induction of apoptosis in human adenoma and carcinoma cell lines; implications for clonal selection during colorectal carcinogenesis. *Oncogene*. 18: 3199-3204.



67. Yu SP, Ye C, Sensi SL, Gwag, Lorella MT, Canzoniero, Farhangrazi ZS, Ying HS, Tian M, Dugan LL y Choi DW (1997). Mediation of neuronal apoptosis by enhancement of outward potassium current. *Science* 278: 114-117.
68. Yuan J y Yanker BA (2000). Apoptosis in the nervous system. *Nature*. 407: 802-809.
69. Zhou Q, Petersen CC y Nicoll RA (2000). Effects of reduced vesicular filling on synaptic transmission in rat hippocampal neurones. *Journal of Physiology*. 15: 195-206.