

138



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“MOVILIZACION DE AMINOACIDOS NEUROACTIVOS EN RESPUESTA A UN CAMBIO DE VOLUMEN CELULAR EN LA RETINA”

296688

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

LENIN DAVID OCHOA DE LA PAZ



DIRECTOR DE TESIS: DRA. HERMINIA PASANTES ORDOÑEZ

MEXICO, D. F.



~~1909~~

2001



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA

Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

"Movilización de Aminoácidos Neuroactivos en Respuesta a un Cambio de Volumen Celular en la Retina"

realizado por Lenin David Ochoa de la Paz

con número de cuenta 9035544-4, pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dra. Herminia Pasantes Ordoñez

Dr. Julio Morán Andrade

Propietario

Dr. Octavio Quesada García

Propietario

Q. Silvestre de Jesus Alavez E.

Suplente

Dra. Lourdes Massieu Trigo

Suplente

FACULTAD DE CIENCIAS
U N A M.

Consejo Departamental de Biología

[Firma manuscrita]



Dra. Luisa A. Alba Lois

DEPARTAMENTO
DE BIOLGGIA

A mi padre:

Que gracias a sus grandes consejos y gran fortaleza he podido enfrentar y concluir grandes retos en mi vida.

A mi madre:

Gracias a ella que con su gran corazón y paciencia he obtenido la fuerza para realizar las metas más importantes de mi vida.

A mis padres:

Gracias a ellos que me ha apoyado de manera incondicional en cada momento de mi vida y en cada meta planeada.

INDICE

Introducción	pag.
Generalidades de la retina	1
Neurotransmisión en la retina	5
Volumen Celular	10
Mecanismos de liberación de osmolitos	11
1- Movilización de K^+	14
2- Movilización de Cl^-	15
3- Movilización de aminoácidos	16
La retina como modelo de estudio	23
1- Edema bajo condiciones hiposmóticas	23
2- Edema bajo condiciones isosmóticas	24
Metodología	27
Resultados y Discusión	30
Referencias	48

INTRODUCCION

GENERALIDADES SOBRE LA FISIOLOGIA DE LA RETINA.

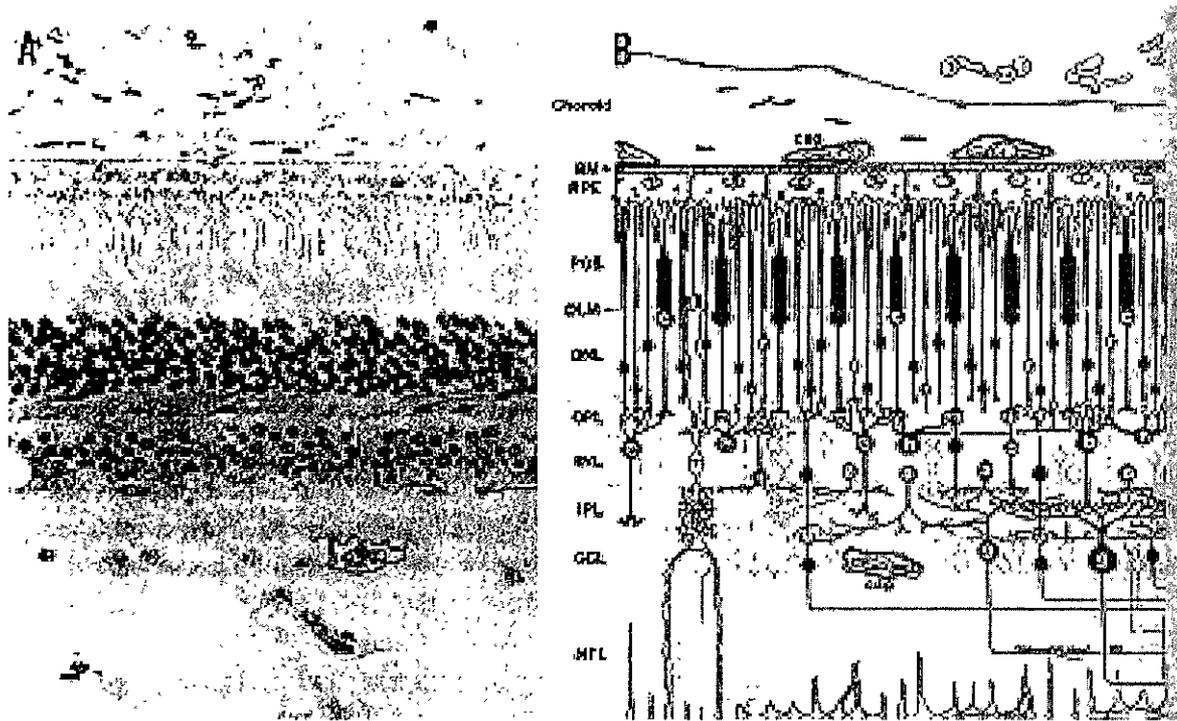
La retina es una estructura muy especializada cuya función consiste en convertir la luz en señales eléctricas que procesan las neuronas. La retina es una extensión periférica del sistema nervioso central. Es un tejido neural delgado que en muchas especies recibe nutrientes de la coroides pasando por el epitelio pigmentario retinal. Como consecuencia, la retina es accesible para la experimentación in vivo e in vitro y puede ser manipulada química y farmacológicamente administrando sustancias por el vítreo o en medios de incubación. Su capacidad para procesar el estímulo luminoso transformarlo y transmitirlo a través de distintas capas celulares está intacta en los sistemas in vitro, por lo que es un excelente modelo para el estudio de los mecanismos de transmisión que participan en la comunicación intercelular por neurotransmisores o neuromoduladores.

Comparada con otras estructuras del cerebro, la retina es relativamente simple. Esta formada por seis tipos de neuronas: los fotorreceptores (conos y bastones), las células bipolares, las horizontales, las amacrinas, las interplexiformes y las ganglionares. El tipo principal de célula glial es la célula de Müller, que se extiende desde la membrana limitante interna hasta la membrana limitante externa, en donde rodea al segmento interno de los fotorreceptores.

La retina tiene una estructura bien estratificada, con una organización separada para los somas celulares (capas nucleares) y las terminaciones sinápticas (capas plexiformes). Los distintos estratos celulares se organizan en la siguiente forma:

1. La capa del epitelio pigmentario retinal, la cual está en íntimo contacto con el segmento externo de los fotorreceptores. Esta capa celular sirve como mediador en el intercambio de sustancias entre la retina externa y la circulación coroidal, participa en la fagocitosis de los discos desechados por los conos y bastones, jugando un papel importante en el catabolismo de los componentes del segmento externo de los fotorreceptores.
2. La capa de los segmentos externos, conos y bastones.
3. La membrana limitante externa, formada por los procesos apicales de las células de Müller, que están contiguos al segmento interno de los fotorreceptores.
4. La capa nuclear externa, compuesta por los núcleos de los fotorreceptores.
5. La capa plexiforme externa, formada por las terminaciones sinápticas de los fotorreceptores, las células bipolares y las células horizontales.
6. La capa nuclear interna, en donde se localizan los cuerpos de las células bipolares, horizontales y amacrinas. También se localizan en esta capa los somas de las células interplexiformes que son aquellas que conectan con las capas plexiforme externa e interna.
7. La capa plexiforme interna es otra región sináptica en donde establecen los contactos sinápticos las células bipolares, amacrinas y las ganglionares.
8. La capa de células ganglionares, cuyos axones forman el nervio óptico.
9. La membrana limitante interna, constituida por los procesos basales de las células de Müller, que forman la interfase retino-vitreal.

Los fotorreceptores son de dos tipos, los conos y los bastones. Los bastones son sensibles a bajos niveles de luz, mientras que los conos se estimulan a intensidades de luz alta y además están especializados en la visión en color.



Figural. Organización celular de la retina de vertebrados. (A) Corte histológico de la retina de humano, y (B) diagrama esquemático mostrando el arreglo de las capas de las células retinales. Abreviaciones: a, células amacrinas; b, células bipolares; c, conos; g, células ganglionares; h, células horizontales; i, células interplexiformes; r, bastón. Las capas histológicas son: RPE, epitelio pigmentario retinal; POS, capa de los segmentos externos de los fotorreceptores; OLM, membrana limitante externa; ONL, capa nuclear externa; OPL, capa plexiforme externa; INL, capa nuclear interna; IPL, capa plexiforme interna; GCL, capa de células ganglionares; NFL, capa de fibras nerviosas; ILM, membrana limitante interna. (Tomado de Berman, 1991).

Funcionalmente los fotorreceptores se conectan con las células bipolares y las células ganglionares formando una vía de transmisión directa excitadora. Esta vía está modulada por las interneuronas, células horizontales y células amacrinas.

En la oscuridad, el fotorreceptor se encuentra en un estado de despolarización parcial, producido por la entrada de Na^+ en el segmento externo. Esta situación lleva a la liberación continua de un neurotransmisor en las terminales sinápticas, generando una cascada de liberación de neurotransmisores hacia todo el circuito retinal. Ante la hiperpolarización producida por la luz al cerrar la corriente de Na^+ , se reduce la liberación del neurotransmisor del fotorreceptor causando la hiperpolarización de las células horizontales y de un subtipo de células bipolares, llamadas bipolares OFF o células bipolares hiperpolarizantes. Otro subtipo de células bipolares són las llamadas ON. Estas, a diferencia de las anteriores responden a la luz con una despolarización.

Las células bipolares establecen conexiones sinápticas en la capa plexiforme interna con dendritas de las células ganglionares y con procesos de células amacrinas. Las terminales sinápticas de las células bipolares pueden variar de forma simple, larga, o con vesículas, terminando en una estratificación discreta en la capa plexiforme interna. Las terminales sinápticas de las células bipolares OFF y ON tienden a segregarse en la capa plexiforme interna.

El último relevo de esta vía son las células ganglionares, que tienen sus cuerpos celulares localizados en la capa más interna de la retina. Se encuentran organizadas normalmente en una sola capa, con algunas células desplazadas ocasionalmente. Sus dendritas arborescentes conectan con las terminales de las células bipolares y con procesos de las células amacrinas en la capa plexiforme

interna. Sus axones forman el nervio óptico, que se proyecta a las zonas visuales del cerebro. Las células ganglionares son morfológicamente y fisiológicamente heterogéneas.

Las células horizontales y las amacrinas son interneuronas y tienen como función modular o regular la vía excitadora. Las células horizontales participan en el procesamiento lateral de la información en la capa plexiforme externa. Las células horizontales son heterogéneas conociéndose al menos 4 tipos distintos. En muchas especies, las células horizontales tienen grandes axones con terminales muy ramificadas a gran distancia del cuerpo celular. El número de tipos de células horizontales en la retina está relacionado con el número de tipos de fotorreceptores presentes, así como las condiciones ambientales en donde se desarrolle el animal. Cada célula horizontal se une a través de uniones comunicantes con células adyacentes o del mismo tipo. Las células amacrinas tienen sus cuerpos celulares en la región proximal de la capa nuclear interna y sus procesos sinápticos se extienden dentro de la capa plexiforme interna. Estudios morfológicos y fisiológicos indican la existencia de una variedad de subtipos de células amacrinas. Se han reportado uniones comunicantes entre células amacrinas y bipolares.

Las neuronas interplexiformes tienen sus cuerpos celulares en la capa de las células amacrinas. Sus procesos se extienden hacia el interior de la capa plexiforme y hacia la capa nuclear externa. Estas células conectan con células bipolares y horizontales y en algunos casos con otras interplexiformes, mediante sinapsis convencionales. Las células interplexiformes al parecer son las únicas

que pueden transmitir información de la retina interna a las capas sinápticas externas.

NEUROTRANSMISION EN LA RETINA

La comunicación intracelular en el sistema nervioso en vertebrados se realiza a través de mensajeros químicos, que pueden agruparse en neuromoduladores y neurotransmisores. Se considera un neurotransmisor a aquella substancia que se sintetiza y se libera de las terminales presinápticas del axón, y que atraviesa el espacio sináptico hasta unirse a un receptor localizado en la membrana postsináptica, generando una respuesta eléctrica directa o mediada por reacciones químicas de corta duración. La acción del neurotransmisor termina al ser degradado enzimáticamente o al ser capturado en la terminal postsináptica o por células gliales por sistemas de transporte de alta afinidad. El término neuromodulador se usa para describir a las sustancias liberadas por neuronas o posiblemente por la glía, modificando la acción del neurotransmisor por varias vías: 1) alterando la respuesta electrofisiológica postsináptica, 2) modulando la síntesis, la liberación o la degradación del neurotransmisor o 3) produciendo cambios en el metabolismo de la célula postsináptica. Un neuromodulador puede actuar en las células adyacentes, o difundiendo a través del espacio extracelular en células distales del tejido o bien en la misma célula de origen, modulando la respuesta celular a otros neurotransmisores.

Existen 2 tipos de transmisión sináptica en el sistema nervioso, la química y la eléctrica. En general, sin embargo, las sinapsis eléctricas son menos comunes que las sinapsis químicas, las cuales se caracterizan por su velocidad de transmisión y por que pueden amplificar la señal neuronal. Las sinapsis eléctricas

mantienen una continuidad membranal entre la célula presináptica y la célula postsináptica, en donde el citoplasma de ambas células se conecta por canales iónicos; las sinapsis químicas no tienen una continuidad membranal entre las células, por lo que las neuronas están separadas por un espacio llamado espacio sináptico, por el cual viaja el mensajero químico de la célula presináptica a la célula postsináptica.

La retina contiene tanto sinapsis eléctricas (uniones comunicantes) como sinapsis químicas, con mayor predominancia de las sinapsis química. Las sinapsis eléctricas se forman generalmente entre neuronas del mismo tipo, como es el caso de los fotorreceptores y células horizontales en donde se han descrito uniones comunicantes.

En los fotorreceptores existen dos tipos de sinapsis químicas con una morfología distinta, las sinapsis que presentan una estructura característica llamada cinta sináptica y las sinapsis basales. Las sinapsis con cinta sináptica tienen las vesículas sinápticas distribuidas en forma organizada alrededor de esta estructura; estas sinapsis mandan el impulso a tres procesos postsinápticos. En conjunto, esta organización se conoce como triada. Generalmente, son dos procesos de células horizontales que ocupan las posiciones laterales y un solo proceso de una célula bipolar ON en la parte central. Las sinapsis con cinta sináptica funcionan entre conexiones de células bipolares y células amacrinas y ganglionares postsinápticas.

Las sinapsis basales se establecen específicamente entre conos y células bipolares OFF. Debido a que estas sinapsis carecen de vesículas sinápticas, las sinapsis basales posiblemente pueden estar especializadas en un mecanismo

diferente de liberación del neurotransmisor, el cual es una liberación no vesicular, independiente de Ca^{2+} . Este mecanismo de neurotransmisión no se conoce totalmente pero hay evidencia de que podría estar a cargo de un transporte dependiente de voltaje que libera al neurotransmisor a través de proteínas acarreadoras similares a las del sistema de captura de la célula.

Como se mencionó, los fotorreceptores liberan un neurotransmisor en forma física en la oscuridad. Existen evidencias experimentales de que los neurotransmisores usados por los fotorreceptores son el ácido glutámico y el ácido aspártico principalmente. Otros componentes neuroactivos presentes en la fotorrecepción son la taurina, la melatonina y la serotonina. La melatonina y de serotonina posiblemente funcionan como neuromoduladores. La función de la taurina en estas células podría estar asociada con los mecanismos del control del volumen celular.

Los fotorreceptores, las células horizontales y las bipolares responden a la luz con grandes cambios en el potencial de membrana. Estas células no generan potenciales de acción. Esto posiblemente es debido a que estas neuronas tienen procesos cortos y no necesitan transmitir la información a grandes distancias: una respuesta pasiva del potencial a lo largo de la membrana celular es suficiente para transmitir la información de una terminación celular a la otra. Una segunda posibilidad es que estas neuronas funcionen con potenciales graduados y estos potenciales son capaces de discriminar señales que pueden o no formar potenciales de acción. El primer potencial de acción observado en la retina es generado por las células amacrinas.

De igual forma los fotorreceptores, las células bipolares y las células horizontales responden a la luz con potenciales hiperpolarizantes; bajo iluminación estas células tienen potenciales de membrana muy negativos. Cuando hay un estímulo luminoso los fotorreceptores, las células horizontales y algunas células bipolares se hiperpolarizan. Las células bipolares son aparentemente también glutamatérgicas y se activan sinápticamente a través del ácido glutámico proveniente de los fotorreceptores. Se sabe que el glutámico es excitador en las sinapsis donde conecta un cono con una célula bipolar OFF, e inhibitorio en las sinapsis donde conecta un cono con una célula bipolar ON. Las terminales sinápticas de las células bipolares contienen al igual que los fotorreceptores, la cinta sináptica, además de contactos convencionales.

El último relevo en la vía excitadora está constituido por las células ganglionares que, como se mencionó son heterogéneas. Se conoce poco acerca de los neurotransmisores que manejan, pero hay evidencia que sugiere que el ácido glutámico y el ácido aspártico pueden tener esa función. Los axones de las células ganglionares transfieren información a algunas zonas del cerebro generando grandes potenciales de acción de manera sucesiva.

Las células horizontales en retinas de teleosteos, forman estructuras llamadas espínulas las cuales se proyectan desde las dendritas de estas células hacia la sinapsis de los conos, incrementando de esta forma el área de contacto entre la célula horizontal y el fotorreceptor. Las células horizontales emplean el GABA como neurotransmisor. Su liberación se realiza de una forma no vesicular en la que participa de manera importante el transportador de GABA. Estas células carecen de canales de Na^+ que se activan por voltaje y que generan el potencial

de acción, por lo que tienen eventos eléctricos locales y no forman potenciales de acción, transmitiendo de manera pasiva las señales.

Los neurotransmisores propuestos para las células amacrinas son numerosos, en concordancia con la amplia heterogeneidad de este estrato celular. Se han considerado como neurotransmisores a la acetilcolina, el GABA, la glicina y la serotonina. Se ha encontrado una subpoblación de células amacrinas que contiene péptidos neuroactivos como el glucagon, el neuropéptido Y, la neurotensina, la somatostatina, la sustancia P y el péptido intestinal vasoactivo. Algunas investigaciones estiman que hay hasta 25 tipos diferentes de compuestos neuroactivos en las células amacrinas. Sin embargo su acción precisa todavía no se conoce. Las células amacrinas producen fluctuaciones eléctricas locales, aunque se ha visto que pueden generar pequeños potenciales de membrana.

El tercer grupo de interneuronas són las células interplexiformes; estas células pueden ser dopaminérgicas o glicinérgicas, siendo las dopaminérgicas las más estudiadas. Debido al pequeño número de células interplexiformes en la retina y a su difícil reconocimiento se sabe muy poco acerca de sus propiedades eléctricas.

Además de los neurotransmisores clásicos la mayor parte de los estratos celulares de la retina contienen taurina. El 80% de la taurina se encuentra en los fotorreceptores. Su función precisa en la retina se desconoce. Se ha propuesto que participa manteniendo la estructura y la viabilidad de los fotorreceptores, con un mecanismo poco claro. En experimentos usando dietas deficientes de taurina se observó una desorganización del segmento externo del fotorreceptor lo que conlleva a una subsecuente muerte celular y esto a la pérdida de la visión. Una propuesta que cuenta con evidencia experimental sólida es que la taurina participa

como un osmolito en el control del volumen celular, que se describe en la siguiente sección

VOLUMEN CELULAR

Durante algún tiempo se pensó que la propiedad de regulación del volumen estaba restringida a especies que efectivamente requerían de este control para su supervivencia, como es el caso de los animales eurialinos que constantemente están expuestos a fluctuaciones en la osmolaridad del medio externo. En condiciones fisiológicas, la mayoría de las células de un organismo multicelular no se encuentran expuestas a situaciones anisomóticas (cambios en la osmolaridad del medio) excepto las células renales y algunas células epiteliales. A pesar de ello la capacidad de regular el volumen es una propiedad que se ha conservado a través de la evolución en prácticamente todos los tipos celulares. La osmolaridad de los fluidos corporales de mamíferos es de aproximadamente 285 mOsm/L y este valor se mantiene prácticamente constante, mostrando sólo pequeñas fluctuaciones que no exceden de un 3% (Hoffman y Simonsen, 1989). Sin embargo, a nivel celular existen numerosas situaciones fisiológicas en las que pueden crearse microgradientes osmóticos que llevan a cambios en el volumen de los compartimentos intracelulares y que deben ser ajustados. Estas modificaciones en el volumen celular pueden ocurrir por acumulación de solutos intracelulares, provocada por macromoléculas cargadas en el citoplasma, durante procesos normales como es la entrada de sales y de nutrientes. De igual forma la actividad de los receptores sinápticos de los aminoácidos excitadores como el ácido glutámico, al incrementar la permeabilidad iónica, da como resultado un incremento de volumen en condiciones isomóticas (Choi, 1985). Asimismo ciertas

vías metabólicas en la célula, como la glucogenólisis y la lipólisis también pueden conducir a un incremento en los niveles de solutos intracelulares osmóticamente activos (Kritensen, 1986). De la misma forma, el metabolismo acelerado de las fibras musculares durante el ejercicio, aumenta los solutos intracelulares libres (Saltin y col., 1987). Finalmente la degradación y síntesis de macromoléculas modifica en forma muy importante el equilibrio osmótico interno.

Este tema tiene también implicaciones interesantes desde el punto de vista clásico, en aquellas patologías en las que hay cambios en la osmolaridad del plasma (hiponatremia/hipernatremia). Como resultado del cambio osmótico en el plasma, hay también modificaciones en el espacio extracelular y en el volumen celular. Una situación particularmente grave puede ocurrir cuando hay edema celular en el cerebro, el cual está asociado a numerosas patologías, como las epilepsias y la isquemia, en los traumatismos craneales y en la encefalopatía hepática. Dada la restricción que impone la caja craneal a la expansión del tejido cerebral, esta alteración en el volumen celular es, en muchos casos, una complicación aún más grave que la propia patología.

CAMBIOS EN EL VOLUMEN CELULAR EN CONDICIONES ANISOSMOTICAS

Cuando las células se exponen a un medio anisomótico cambian su volumen de acuerdo al cambio en la osmolaridad externa. En el caso en que una célula animal este expuesta a una solución hiposmótica, inicialmente el volumen celular aumenta debido a la entrada de agua, por el cambio de presión osmótica extracelular. Generalmente, el volumen celular se incrementa alcanzando un maximo en un tiempo variable, que depende de: 1) la velocidad en el cambio en la osmolaridad extracelular en el plano inmediatamente adyacente a la membrana

plasmática, 2) la permeabilidad de la membrana plasmática al agua, 3) la relación entre área de la membrana y el volumen de la célula (Hallows y Knauf, 1994; Hoffmann y Simonsen, 1989; Lang, 1993). Después de este máximo, el volumen celular disminuye, aún cuando la osmolaridad extracelular se mantenga por debajo del valor del control inicial. Este proceso compensatorio del volumen, que generalmente ocurre en un periodo de varios minutos, se conoce como Decremento Regulador del Volumen (DRV). En la mayoría de los casos, las células no retoman totalmente a su volumen inicial, sino que alcanzan un nivel estable ligeramente superior. De manera análoga, cuando las células se mantienen en una solución hiperosmótica, su volumen disminuye y en la mayoría de los casos, tienden a recuperarlo mediante el proceso conocido como Incremento Regulador del Volumen (IRV).

Los mecanismos adaptativos de regulación del volumen celular se establecen a través de cambios en la concentración intracelular de solutos osmóticamente activos, en la dirección necesaria para contrarrestar el equilibrio osmótico de la célula. Estos componentes llamados osmolitos, se agrupan en dos categorías: iones inorgánicos Na^+ , K^+ , Cl^- y moléculas orgánicas, como aminoácidos, aminos y polialcoholes.

Los solutos osmóticamente activos, son aquellos que se encuentran en forma libre en solución en el citoplasma. En general durante la regulación del volumen las células de los invertebrados y de los vertebrados de especies acuáticas utilizan preferentemente los osmolitos orgánicos, mientras que en las células de vertebrados terrestres los iones parecen tener un papel más importante. Una excepción a esto puede ser el sistema nervioso central, en el cual los iones

participan de manera sustantiva en el control de la excitabilidad y en la comunicación interneural, y por tanto su homeostasis debe ser regulada de manera muy estricta. Los iones, principalmente K^+ , Na^+ , Cl^- y HCO_3^- , contribuyen en el mantenimiento de la osmolaridad interna y externa de la célula, siendo el K^+ y el Cl^- los de mayor concentración intracelular y el Na^+ el más concentrado en el espacio extracelular. Estos iones participan de manera importante en la regulación del volumen después de alguna alteración en la osmolaridad del medio externo, por lo que su transporte a través de la membrana es muy importante en los procesos de regulación del volumen celular.

Una característica interesante de las moléculas orgánicas relacionadas con la función de la regulación osmótica es que a diferencia de los iones inorgánicos, poseen lo que se conoce como propiedades osmoprotectoras, es decir, que además de funcionar como osmolitos pueden acumularse en concentraciones muy altas en el compartimento intracelular sin alterar significativamente la estructura y la función de las macromoléculas citosólicas, como enzimas y proteínas.

Existen otros osmolitos orgánicos usados como moléculas osmoefectoras en las células de mamíferos; estos son los polialcoholes, como el sorbitol y el *myo*-inositol. Otros osmolitos orgánicos con menor participación son las metilaminas como la glicerofosforilcolina (GPC). (Lang, 1998)

MECANISMOS DE LIBERACION DE OSMOLITOS

1. Movilización del K^+ .

Para varios tipos celulares, la vía por la que se mueve el K^+ asociado al DRV no esta bien caracterizada. No se sabe si los canales de K^+ son activados por el hinchamiento perse o por factores asociados al cambio en el volumen celular. Lo que sí se sabe es que esta vía de movilización es especifica para el K^+ y bastante impermeable a otros cationes. El hinchamiento conduce a una variedad de cambios celulares incluyendo un incremento en la concentración intracelular de Ca^{2+} , cambios en la organización del citoesqueleto, fosforilación de varias proteínas y la expresión de algunos genes (Ninning y col. 1997; Tilly y col. 1996); lo que aparentemente no es claro es si cualquiera de estos cambios asociados al hinchamiento activa los canales de K^+ relacionados con el DRV. El hinchamiento también afecta el potencial de membrana de acuerdo a la naturaleza y cinética de la corriente activada. Muchos tipos celulares se despolarizan en respuesta al hinchamiento, y esto activa subsecuentemente canales de K^+ durante el DRV. Esto se ha observado en células de neuroblastoma (Falka y Mislser, 1989), en donde la despolarización activa en primer lugar canales catiónicos inespecificos sensibles a la tensión membranai. En muchas células, hay una salida de Cl^- producida por hinchamiento (Sanchez-Olea y col., 1996), que conduce a una despolarización, la cual posiblemente pueda activar a los canales K_v (canales de K^+ activados por voltaje), que son los candidatos a ser las vías por las que se sale el K^+ en estas células. Existe evidencia que respalda esta idea, proveniente de linfocitos T que carecen de la habilidad de regular el volumen, y que posteriormente adquieren esta habilidad al ser transfectados con el gen de los

El aumento de la permeabilidad aniónica se presenta en neuronas en respuesta a un incremento del volumen celular. Mientras que en condiciones isosmóticas la permeabilidad del Cl^- está restringida, durante condiciones de hinchamiento hiposmótico esta permeabilidad se incrementa ocasionando que el flujo de K^+ esté limitado por el flujo de Cl^- y de agua y consecuentemente por el decremento regulador del volumen (Pasantés-Morales y col. 1994).

Los canales de Cl^- activados por hiposmolaridad han sido identificados en una gran variedad de células y algunos de éstos han sido clonados. Entre las moléculas que actúan como canales de Cl^- durante el proceso de regulación del volumen se encuentran:

- 1) El **CIC-2**. Forma parte de una familia de proteínas de membrana, que funcionan como canales de Cl^- (CIC-0, CIC-1, CIC-3, CIC-4, CIC-5, CIC-6, CIC-7, CIC-K1, CIC-K2) (Brandt y Jentsch, 1995). Esta proteína está ampliamente distribuida tanto en células de mamífero como en líneas celulares y hay evidencia de que CIC-2 forma por sí solo un canal aniónico sensible a volumen (Gründer y col., 1992). Sin embargo, sus características de selectividad iónica, farmacológica y electrofisiológica son completamente diferentes de los canales iónicos de rectificación saliente sensibles a volumen ya reportados. Se ha postulado que el papel de este canal de Cl^- es principalmente mantener el potencial de membrana.
- 2) La **glicoproteína-p**. Esta proteína pertenece a la familia de los transportadores ABC (ATP-binding-cassette, es decir presentan una secuencia consenso para unir ATP). La expresión de la glicoproteína-p está sobre regulada en células cancerosas haciéndolas resistentes a drogas citotóxicas al actuar como bomba

de expulsión de las drogas. Además de esta función se ha sugerido que puede servir como un canal aniónico activado por hinchamiento y/o como proteína reguladora del canal. Esta interpretación ha sido cuestionada por trabajos que muestran que no existe correlación entre los niveles de expresión de la *glicoproteína-p* y la actividad del canal activado por hinchamiento (McEwan y col., 1992; Rasola y col., 1994; Kunzelman y col., 1994).

3) **PI_{cln}**. Está ampliamente distribuida en varias especies y su secuencia de aminoácidos está altamente conservada. Cuando esta proteína es expresada en ovocitos de *Xenopus* genera una conductancia de Cl⁻ con características similares a las del canal aniónico y al de los osmolitos activado por hinchamiento (Strange y col., 1996). Sin embargo, subsecuentes hallazgos de Krapivinsky y col (1994) demuestran que la proteína está principalmente localizada en el citoplasma celular lo cual lleva a la suposición de que esta proteína puede servir como regulador citosólico de un canal endógeno activado por hinchamiento (Ackerman y col., 1994). Paulmich y sus colegas han descrito resultados preliminares que indican que aunque la proteína esta normalmente en el citosol ésta migra a la membrana en respuesta al hinchamiento osmótico. Paulmich (1996) y Strech (1996) han propuesto un modelo de “anclaje-inserción” que puede acoplarse a muchos de los datos obtenidos.

4) **La Banda 3**. Está proteína es la principal constituyente de la membrana plasmática de eritrocitos de muchas especies de vertebrados y tiene su parte homóloga en otros tejidos. Este es un sistema de intercambiador aniónico electroneutro (Cl⁻/HCO₃⁻). Sin embargo, la observación de que muchos inhibidores del intercambiador aniónico mediado por banda-3 inhiben los

canales de osmolitos y el activado por hinchamiento puede sugerir que la banda-3 podría estar involucrada en la actividad del canal sensible al hinchamiento (Goldstein y col., 1990; Goldstein y Bill, 1991; García Romeu y col., 1991). Sin embargo, se ha reportado que la expresión de la banda-3 en ovocitos de los eritrocitos de ratón no tiene actividad de canal de osmolitos activado por hinchamiento ni tampoco un incremento en la conductancia ni en la permeabilidad de la taurina, a diferencia de los eritrocitos de trucha expresados en ovocitos de *Xenopus* (Fiévet y col., 1995).

- 5) **Fosfolema.** Esta es una proteína de 72 aminoácidos que cuando es reconstruida en bicapas lipídicas forma canales aniónicos con una aparente permeabilidad a la forma iónica de la taurina 70 veces mayor que la observada para el Cl⁻, lo que sugiere que esta proteína podría estar relacionada con el transporte de taurina regulado por volumen (Moorman y col., 1995). Es necesario todavía un estudio detallado de las características funcionales de esta proteína y su grado de similitud con los canales activados por hinchamiento.
- 6) **VDAC.** El canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) es un canal parecido a una porina y se ha encontrado formando parte de la membrana externa de las mitocondrias en eucariontes y podría estar presente en otras fracciones de la membrana plasmática. En una reciente revisión por Reymann y col. (1995) hace referencia a una evidencia inmunopatológica (fibrosis cística) para la expresión del VDAC en la membrana plasmática de los ovocitos de *Xenopus* y además reporta que el anticuerpo en contra del VDAC de linfocitos de humano inhibe los flujos iónicos activados por hiposmolaridad en estas células. Estos

datos son consistentes con un papel para VDAC en la actividad del canal aniónico/osmótico activado por hinchamiento.

3. Movilización de aminoácidos que funcionan como osmolitos.

Aun no están totalmente identificados los mecanismos de movilización de los osmolitos orgánicos en el DRV. Se ha demostrado que la exposición de diferentes tipos celulares a medios hiposmóticos produce un incremento en los flujos de taurina y de otros aminoácidos a través de la membrana. En estudios cuantitativos sobre la magnitud de la pérdida de aminoácidos en el DRV se ha demostrado que la liberación de taurina en respuesta al cambio de volumen es independiente del Na^+ extracelular y de la temperatura, lo que descarta la participación del transportador de este aminoácido dependiente de Na^+ en el DRV. Se ha encontrado, en cambio, que el movimiento de taurina en respuesta al aumento en el volumen tiene lugar a través de vías difusionales en los que el movimiento de taurina se encuentra dirigido únicamente por su gradiente de concentración (Sanchez-Olea y col., 1991).

Del total de aminoácidos que existen en la naturaleza sólo algunos (alanina, glicina, taurina, glutamato, β -alanina, y prolina) son de importancia cuantitativa para la regulación del volumen celular. El uso consistente de uno o más de estos aminoácidos por muchos grupos de organismos, sugiere que tienen características compatibles con la función de la regulación del volumen celular.

En este sentido, una de las moléculas osmoefectoras especialmente importante es la taurina. Este compuesto, que se descubrió en la bilis de buey, es un aminoácido azufrado que se encuentra filogenéticamente desde los grupos más

sencillos hasta los más complejos. La taurina no es incorporada a proteínas como otros aminoácidos y no interviene en ninguna reacción metabólica en las células o tejidos en los que se encuentra; su único papel bioquímico es la conjugación con el ácido cólico para formar el ácido taurocólico. Debido a esta inercia metabólica la taurina funciona como un osmolito ideal, que puede moverse a través de los distintos compartimentos intracelulares y/o hacia fuera de la célula sin afectar su metabolismo. Por el contrario, todos los otros aminoácidos usados como osmolitos tienen importancia en diversas funciones metabólicas y como transmisores sinápticos, por lo que su concentración y movilización está estrictamente regulada. Trabajos realizados por Sanchez-Olea y col. (1996) muestran una gran similitud en la sensibilidad farmacológica de los flujos de taurina y de Cl^- activados por hiposmolaridad, a las de los canales de Cl^- en neuronas, que son inhibidos por bloqueadores de canales de Cl^- y a su vez similar al efecto encontrado previamente en los astrocitos en cultivo. Además, se observó un efecto de inhibidor de la salida de Cl^- y de taurina por ácidos grasos poliinsaturados. Esta vía de movilización para los osmolitos sugiere que es un canal poco selectivo; y los aminoácidos neutros pueden ser transportados a través del mismo. La evidencia que sustenta esta idea proviene de los estudios realizados por Banderalli y Roy (1992) en células MDCK, en donde observaron corrientes de aminoácidos a través de canales aniónicos de rectificación saliente activados por hiposmolaridad. Esta relación entre los flujos de Cl^- y de taurina posiblemente se deba a: 1) que las vías estén interconectadas, 2) que sean la misma, o 3) que sean diferentes pero sensibles a los mismos compuestos.

CAMBIOS DE VOLUMEN CELULAR EN CONDICIONES FISIOLÓGICAS Y PATOLÓGICAS.

Existen situaciones tanto fisiológicas como patológicas y experimentales en las que el cambio en el volumen celular ocurre en condiciones isomóticas.

En el cerebro, cambios pequeños en el volumen pueden producir secuelas clínicas muy severas. Los cambios patológicos en el cerebro en donde participan compartimentos intracelulares se agrupan en dos categorías: anisotónicos y citotóxicos. Las alteraciones de volumen celular por citotoxicidad ocurren en patologías como la isquemia, traumatismos craneoencefálicos e hipoxia/anoxia. Estas condiciones patológicas tienen un alto índice de morbilidad y mortalidad. En contraste, las alteraciones anisotónicas del volumen en el cerebro, resultan de cambios en la tonicidad del plasma. Los cambios en volumen celular se presentan en casos como la inadecuada secreción de la hormona antidiurética, uso inapropiado de diuréticos, deshidratación, diabetes mellitus y diabetes insípida.

La hiponatremia se atribuye principalmente a la inapropiada secreción de la hormona antidiurética, falla renal que conlleva a una pérdida de sales en el plasma y una disminución de sales en el fluido extracelular (Harrigan, 1996 y Zafonte, 1997). La hiponatremia aguda produce edema cerebral y severas alteraciones neurológicas, sin embargo, en la hiponatremia prolongada el edema no es tan severo debido a la salida de electrolitos y osmolitos intracelulares con lo que el volumen celular cerebral regresa a la normalidad (Trachtman, 1992). Este cambio sustancial en el contenido de osmolitos, sin embargo, puede llevar a situaciones de riesgo si se corrige la hiponatremia en forma aguda.

Al igual que en los cambios en volumen anisotónicos, los cambios en volumen citotóxicos producen un daño en las células cerebrales. Algunas investigaciones han demostrado que los neurotransmisores excitadores tienen una participación importante en las patologías de daño citotóxico. Uno de estos mediadores es el ácido glutámico, el cual interactúa con canales catiónicos que contienen receptores a este neurotransmisor. Los cambios tóxicos producidos por el glutámico *in vitro* son bifásicos y conllevan inicialmente a un hinchamiento de las dendritas neurales y somas celulares, seguido por una lenta degeneración neuronal.

En el caso de patologías como la isquemia, el daño se debe principalmente a la reducción del flujo sanguíneo cerebral, con la subsecuente privación de oxígeno y nutrientes y a la liberación de glutamato originando un daño neuronal irreversible en el foco isquémico, es decir, en la zona en donde se interrumpe por completo el flujo sanguíneo. Sin embargo, en la zona que rodea al foco isquémico, denominada zona de penumbra, el daño se desarrolla lentamente afectando incluso otras zonas del cerebro (Choi, 1996). Los procesos patofisiológicos principales en la isquemia cerebral son: 1) falla energética, 2) pérdida de la homeostasis iónica celular, 3) acidosis, 4) aumento en el Ca^{2+} intracelular que puede disparar fenómenos de apoptosis y necrosis, 5) excitotoxicidad y toxicidad mediada por radicales libres derivados de oxígeno y de óxido nítrico (NO), 6) lipoperoxidación, 7) acumulación de inositol-1,4,5-trifosfato y diacilglicerol, además de cambios en las síntesis de proteínas (Macdonald y Stoodley, 1998).

Otra patología asociada a cambios de volumen en condiciones anisotónicas es la encefalopatía hepática, la cual es causada por la falla del hígado en la remoción

de productos de desecho en la sangre, lo que ocasiona un exceso en la concentración de iones amonio (NH_4^+). Las formas iónicas de $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ entran a las neuronas produciendo un cambio en el pH intracelular, además el exceso de estos iones altera el metabolismo interno de la célula reduciendo la transmisión sináptica excitadora mediada por glutamato, así como también la transmisión sináptica inhibitoria mediada por potenciales postsinápticos dependientes de la hiperpolarización por Cl^- , inactivando la liberación de este ion (Raabe, 1987).

Por lo tanto el hinchamiento producido por condiciones anisotónicas y por condiciones excitotóxicas (isosmóticas) observado *in vitro* es muy dramático *in vivo*, y puede manifestarse por un edema cerebral, disfunciones neurológicas, coma y muerte. Un mejor entendimiento y manipulación de los procesos reguladores del volumen pueden ser las bases para un tratamiento más adecuado en patologías asociadas a un incremento en el volumen celular en el cerebro.

LA RETINA COMO MODELO DE ESTUDIO

La retina de los vertebrados es un tejido neural delgado que fácilmente se puede extraer, por lo que se puede contar con un circuito neuronal integro, que la hace un buen modelo para el estudio de los mecanismos de regulación que participan en la comunicación interneural por neurotransmisores o neuromoduladores, haciéndola accesible para la experimentación *in vivo* e *in vitro*.

EDEMA CELULAR EN LA RETINA.

1- Edema bajo condiciones hiposmóticas.

Estudios realizados por Morán y col. (1990), indican que al exponer la retina de rata a una reducción en la osmolaridad se produce una rápida liberación de taurina acompañada de un aumento en el volumen celular. Aun no se tienen identificadas

cuáles son las neuronas que liberan taurina subsecuentemente a una estimulación con hiposmolaridad. En las retinas de rata incubadas con luz hay una gran captura de taurina por los fotorreceptores, las células amacrinas, las células bipolares y las células de Müller, por lo que el hinchamiento asociado a la liberación de taurina puede ocurrir en todas estas células.

La liberación de taurina estimulada por hiposmolaridad en la retina de rata se inhibe con bloqueadores de canales de Cl^- (Morán y col. 1990), como sucede en la liberación de taurina estimulada por hiposmolaridad en astrocitos y células granulares en cultivo (Pasantes-Morales y col, 1990b), esto demuestra el parecido en el mecanismo de liberación de taurina en estas células y en la retina de rata. Existe una diferencia en la liberación producida por hiposmolaridad y la producida por alto K^+ , siendo mucho mayor en condiciones hiposmóticas. Esta diferencia se debe posiblemente a que el hinchamiento es más rápido en el primer caso.

2- Edema bajo condiciones isomóticas con alto K^+ extracelular.

El hinchamiento producido en las células retinales en respuesta a los altos niveles de K^+ fue descrito por primera vez por Olney (1986) en retinas de embriones de pollo, quien observó que este efecto del K^+ es independiente de Ca^{2+} , y se previene al quitar el Cl^- del medio. Posteriormente los experimentos realizados por Domínguez y col. (1989) mostraron que hay dos componentes en la liberación de taurina estimulada por K^+ en la retina de pollo: el primer componente es dependiente de Ca^{2+} y probablemente esta relacionado con la despolarización de la membrana, y el segundo componente es independiente de Ca^{2+} y dependiente de Cl^- , este último se relaciona con los cambios en el volumen celular, que se generan en respuesta al alto K^+ .

El cambio en el volumen celular producido por alto K^+ se debe a la acumulación intracelular de este ion en las células, seguido por el Cl^- , y osmóticamente obligada el agua. Este hinchamiento se previene al reemplazar el Cl^- por aniones impermeables como los gluconatos (Lipton, 1973; Wals, 1986; Pasantes-Morales et al., 1988).

Se sabe que altas concentraciones de K^+ producen una despolarización de las membranas celulares y promueve la liberación de transmisores. La dependencia de Ca^{2+} en este proceso se considera como evidencia para relacionar la neurotransmisión con un estímulo de secreción acoplado a ella. Estudios realizados por Lopéz-Colomé y col. (1978) muestran que la liberación de taurina estimulada por alto K^+ presenta algunas propiedades diferentes a las que exhiben los aminoácidos neurotransmisores.

La liberación de taurina estimulada por alto K^+ en la retina de rata difiere en algunos aspectos de la retina de pollo. Una de estas diferencias es el hecho de que en la rata la liberación de taurina por alto K^+ muestra una respuesta inducida por despolarización, la cual es dependiente de Ca^{2+} y no se afecta al quitar el Cl^- del medio o por hiposmolaridad. Sin embargo, ambas retinas presentan una sensibilidad al volumen y una independencia de Ca^{2+} en el mecanismo de liberación de taurina (Domínguez y col. 1989). Estas observaciones sugieren la existencia de 2 pozas de taurina en la retina de pollo que responden al estímulo con alto K^+ : una relacionada al hinchamiento y otra a la despolarización. En comparación con la retina de rata que sólo contiene la poza sensible al hinchamiento. La liberación de taurina en astrocitos (Pasantes-Morales et al., 1990c) y en células granulares en cultivo (Schouboe et al., 1990b), es muy

parecida a la observada en la retina de rata, mientras que, la que se presenta en células corticales (Schouboe y Pasantés-Morales, 1989) es similar a la retina de pollo. Estas diferentes formas de liberación de taurina se pueden considerar como un indicador de la existencia de varias pozas de taurina en el tejido nervioso, las cuales participan en la actividad sináptica y también en los procesos de regulación del volumen. Además se ha observado la liberación de taurina en respuesta a condiciones de hinchamiento producidas por cuadros de isquemia (Lehmann, Hagberg, Tacobsen y Hamberger, 1985 a,b) y de excitotoxicidad (Menéndez y col, 1989). El hinchamiento característico del daño retinal producido por condiciones de excitotoxicidad (generado por aminoácidos excitotóxicos) y de alto K^+ es dependiente de Cl^- y de Na^+ pero independiente de Ca^{2+} , lo que conduce a pensar que el componente de liberación de aminoácidos (GABA y taurina) muestra los mismos requerimientos iónicos, relacionándolo a un desbalance iónico y al hinchamiento celular y no a la respuesta sináptica de neurotransmisores (Pasantés Morales y col. 1988).

Teniendo en cuenta los antecedentes acerca de que el hinchamiento induce la liberación de iones y de aminoácidos, como parte del proceso del DRV en diferentes tipos celulares, el presente trabajo tuvo como objetivo principal investigar la presencia de una vía de liberación de aminoácidos neuroactivos asociada a un cambio en el volumen celular en la retina.

Con tal finalidad se establecieron los siguiente objetivos específicos:

1- Caracterización de la liberación de GABA, D-Aspártico y Taurina tanto en condiciones hiposmóticas, como en condiciones isomóticas (alto K^+ extracelular).

Para esto se expusieron a las retinas a medios con diferentes osmolaridades,

disminuyendo la concentración de NaCl para los medios hiposmóticos y aumentando la concentración de KCl para los medios isomóticos con alto K^+ .

2- Determinar si la liberación de GABA, D-Aspártico y Taurina se realiza a través de una vía aniónica, (parecida a la utilizada por el Cl^- para su movilización bajo condiciones hiposmóticas) utilizando fármacos que se sabe bloquean los canales de cloro como el NPPB, DIDS o tamoxifen.

3- Establecer si la liberación de GABA, D-aspártico y Taurina se debe a un incremento en el volumen celular o a una despolarización producida por el alto K^+ exponiendo a las retinas a concentraciones hipertónicas y estimulando con medios con alto K^+ .

4- Medir los cambios de volumen celular a nivel histológico, procesando las retinas después de exponerlas a los medios de incubación experimentales para su observación al microscopio de luz

METODOLOGIA

- Aislamiento de la retina y preparación de medios de incubación.

Se adaptaron a la obscuridad pollos con una edad de 1 a 5 días de nacidos por 1 hora, posteriormente se sacrificaron por decapitación bajo luz roja y se retiraron los globos oculares (enucleación) para después cortar ecuatorialmente (hemisección), y de esta forma extraer la retina cuidadosamente, evitando que salga contaminada con epitelio pigmentario. Inmediatamente se sumergieron en un medio isosmótico Krebs-Hepes normal frío (K-H), el cual contiene (mM): NaCl, 135; KH_2PO_4 , 1.17; KCl, 4.7; CaCl, 1; Glucosa, 5; $MgSO_4$ 1.17; HEPES, 10, pH 7.4; con una osmolaridad de 300 mOsmolas. Los medios hiperosmóticos (400 mOsmolas), se prepararon incrementando la concentración de NaCl o añadiendo

100 mM de sorbitol o rafinosa; En el caso de los medios hiposmóticos (265, 210 o 150 mOsm/L) se disminuyó la concentración del NaCl. El medio con alto K^+ contenía 54 mM de KCl y 85 de NaCl para mantener la isotonicidad del medio. Los medios sin cloro se prepararon con las sales de gluconatos correspondientes al NaCl, KCl y CaCl; Los medios sin Na^+ , contenían N-methyl-D-glucamina (NMDG) para substituir al NaCl, a la misma concentración.

- Liberación de aminoácidos.

Las retinas completas se incubaron en 1 ml de medio K-H con $1\mu Ci$ de 3H -taurina por 25 minutos, o $0.5\mu Ci$ de 3H -GABA o 3H -Aspártico, por 15 minutos a una temperatura de $37^\circ C$ en agitación constante. Posteriormente se lavaron durante 25 minutos a $37^\circ C$ y en agitación constante, para eliminar el exceso de radioactividad, por ultimo se enjuagaron 3 veces en caja petri con medio K-H y se transfirieron a cámaras de superfusión de un volumen de $800\mu l$ en donde se perfundieron a una velocidad de $1.3 ml/min$. Todas las retinas fueron inicialmente perfundidas durante 25 minutos con medio K-H, enseguida de colectaron alicuotas de 1 ml cada minuto en viales de centelleo, los primeros 5 minutos con K-H (basales) y 10 más con el medio hiposmótico (15, 30 y 50%) o con alto K^+ isosmótico. Al terminar la perfusión, el tejido se saco de la cámara de perfusión, y se digirió con NaOH 0.4 N en el vial de centelleo. La radioactividad colectada en cada vial se midió en un contador de centelleo. Los datos se reportaron como porcentaje de radioactividad en cada fracción del total acumulado durante el periodo de incubación.

Cuando se utilizo el DIDS (4-4, diisothiocynato-stilbeno-2,-disulfónico ácido) 1 mM, el tamoxifen $100\mu M$ y el NPPB (5 nitro-2-[3-phenylpropylamino] benzoico ácido)

100 μM , se preincubaron 5 minutos antes del periodo basal. En el caso de los medios con NMDG y con gluconatos, se pusieron desde el lavado inicial.

- Histología

En este caso los pollos de la misma edad (1-5 días) se decapitaron bajo luz blanca. Se enuclearon y se hemisectaron manteniendo unida a la retina con el epitelio pigmentario en la copa, posteriormente se cortaron en tres triángulos concéntricos, y cada pieza se expuso al medio K-H, con alto K^+ o alto K^+ más NPPB (100 μM). Después de 30 minutos se sacaron las piezas del medio y se fijaron en gluteraldehído al 3% por 1 hora, a temperatura ambiente, posteriormente se lavaron por 45 minutos en buffer de fosfatos (BF) 0.1 M y se dejaron toda la noche en sacarosa al 30%. Al día siguiente se puso el tejido en tetraóxido de osmio más BF al 3% por dos horas, posteriormente se deshidrataron en concentraciones ascendentes de alcoholes (30, 40, 50) hasta alcohol absoluto con dos cambios cada 15 minutos cada uno; Después se expusieron en óxido de propileno con dos cambios cada 15 minutos cada uno, y se expusieron a óxido de propileno-EPON (1:1) por 14 horas en desecador, luego se incluyeron en EPON a 60 °C por 48 horas para su polimerización y formar los bloques de corte. Una vez terminado el proceso de inclusión se hicieron cortes semifinos (0.5 μ) de las muestras y se tiñeron con azul de toluidina más citrato de sodio (1:1) para examinarlos bajo microscopía de luz.

RESULTADOS Y DISCUSION

CARACTERIZACION DE LA LIBERACION DE AMINOACIDOS NEUROACTIVOS EN TRESPUESTA A UN ESTIMULO HIPOSMOTICO.

Con el objeto de identificar evidencias de la liberación de aminoácidos asociada a un incremento en el volumen en respuesta a una despolarización por concentraciones elevadas de potasio (K^+), en una primera etapa se llevó a cabo la caracterización de la movilización de estos aminoácidos ante un estímulo hiposmótico. Los aminoácidos seleccionados para este estudio fueron: 1- el ácido glutámico, que es el más importante neurotransmisor excitador en el cerebro, 2- el GABA, un neurotransmisor inhibitor con amplia participación en la comunicación interneural en el sistema nervioso central y en la retina, y 3- la taurina, un aminoácido neutro con poca actividad como mediador sináptico tanto en el cerebro como en la retina, pero con una función bien identificada como osmolito en una gran variedad de tipos celulares, incluyendo neuronas y astrocitos en cultivo (Pasantes-Morales y col. 1993).

Como se indicó en la sección de métodos, se utilizaron trazadores radioactivos para medir la movilización de los aminoácidos seleccionados. Así, se utilizo taurina tritiada (3H -taurina) GABA tritiado (3H -GABA) y en el caso del ácido glutámico se uso como marcador su análogo no metabolizable, el ácido D-aspártico marcado radioactivamente (3H -aspártico).

Las Figs. 1-2 ilustran el curso temporal de la salida de estos aminoácidos en respuesta a estímulos hiposmóticos de intensidad creciente. Ante el estímulo mayor, que consiste en una reducción del 50% en la osmolaridad del medio, la

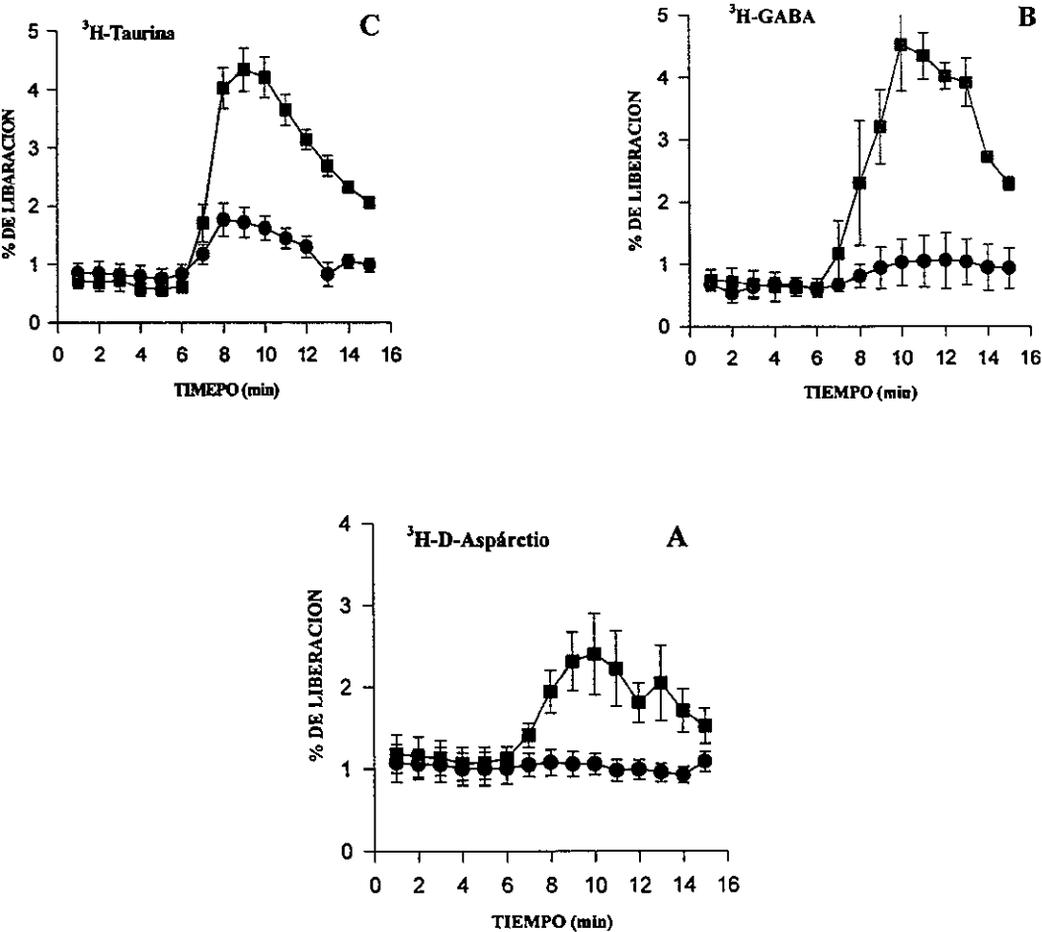


Fig.1. Liberación de $^3\text{H-D-Aspártico}$, $^3\text{H-GABA}$ y $^3\text{H-Taurina}$ de la retina de pollo inducida por hiposmolaridad. Las retinas aisladas de pollo con una edad de 1-5 días se incubaron con $0.5\text{-}\mu\text{Ci}$ de $^3\text{H-D-Aspártico}$ (A), $^3\text{H-GABA}$ (B) o $^3\text{H-Taurina}$ (C) en un medio isosmótico a 37°C . Posteriormente, las retinas se lavaron y se perfundieron con el medio isosmótico. Después, de 5 min. de basal el medio se cambio a uno hiposmótico de 15 % (●) y 30 % (◻) durante 10 min. estos datos representan la radioactividad liberada por minuto expresada como % del total incorporado al tejido y las mediciones son de 4 experimentos separados \pm SE.

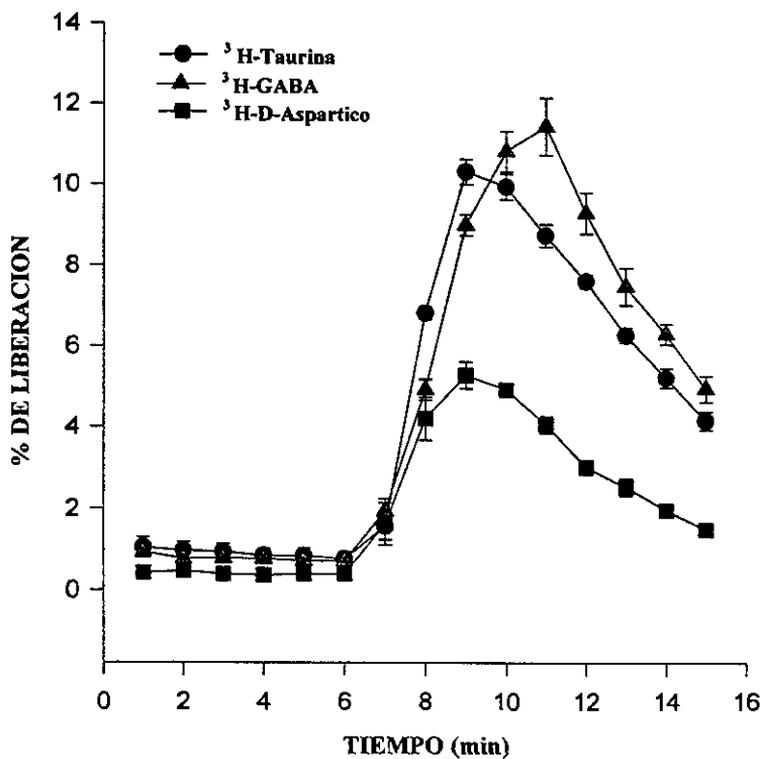


Fig. 2. Liberación de $^3\text{H-D-Aspártico}$, $^3\text{H-GABA}$ y $^3\text{H-Taurina}$ de la retina de pollo expuestas a un medio 50 % hiposmótico. El procedimiento experimental fue igual al de la fig. 1 y las medidas son de 4 experimentos distintos \pm SE.

retina respondió incrementando la liberación de los tres aminoácidos. Sin embargo cuantitativamente existe una diferencia marcada entre la liberación de GABA y taurina por una parte, que es esencialmente similar y la del ácido glutámico, que es claramente menor. En los datos expresados como el porcentaje de liberación en cada fracción (1 min) del total de radioactividad incorporado por la retina, se observó que para el caso de la taurina el máximo de liberación fue de un poco más del 10 % y el total liberado en el tiempo del experimento (10 min) fué de 61.62 %. La curva de liberación para el GABA muestra un máximo de liberación al pico cercano al 12 % y el total liberado en los 10 min. del experimento fue de 67.1%. Para el caso del glutámico el máximo de liberación apenas sobrepasa el 5 % y la cantidad total liberada llega al 29.6 %. En un medio hiposmótico al 30% se repite el mismo patrón de respuesta. En estas condiciones, la estimulación máxima en el caso del GABA y la taurina fue cercana al 5% y la cantidad liberada fue de 44.8 % y de 42.6 % (tabla 1), respectivamente. De forma similar a lo que se observó en la figura 1 la liberación del ácido glutámico fue sensiblemente menor, con un máximo de 2.5 % y un total, liberado de 15.38 % (tabla1). Finalmente ante una reducción pequeña en la osmolaridad del medio (15%), en el caso de la taurina se observó una liberación muy clara, significativamente distinta a la liberación basal (medio isosmótico), con un máximo de alrededor de 1.8%, y una liberación total de 20 %. En el caso del GABA, aunque se observó una tendencia a incrementar su liberación ante este estímulo los resultados no fueron significativamente distintos de la liberación basal. Finalmente, en el caso del glutámico, fue claro que un

estímulo de esta magnitud no fue suficiente para modificar la liberación basal observada en el medio isomótico.

Estos resultados muestran que, de entre los tres aminoácidos examinados, la taurina es la más sensible a un cambio pequeños en la osmolaridad mientras que el glutámico solo se libera a un estímulo hiposmótico más alto.

	GABA (%)	TAURINA (%)	D-ASPARTICO (%)
CONTROL	44.8 ± 2.9	42.6 ± 2.7	15.38 ± 1.03
DIDS	16.7 ± 1.4	21.3 ± 1.9	8.61 ± 0.72
TAMOXIFEN	35.3 ± 2.7	24.8 ± 1.6	9.38 ± 0.82
NPPB	31.2 ± 2.4	31.4 ± 2.6	11.3 ± 1.02

TABLA 1- Efecto de los bloqueadores de canales de cloro en la liberación de los aminoácidos de la retina de pollo estimulada por condiciones hiposmóticas (30%)

En un estudio realizado por Pasantes Morales y col. (1993) sobre la liberación de aminoácidos en respuesta a hiposmolaridad en neuronas y astrocitos en cultivo, los resultados muestran algunas semejanzas y diferencias con el presente trabajo. Ante un decremento del 50 % en la osmolaridad en los dos tipos celulares la taurina se liberó en mayor cantidad seguida por D-aspártico tanto en astrocitos y en las neuronas. El GABA examinado sólo en las neuronas fue el que mostró una menor sensibilidad al estímulo hiposmótico. Ante soluciones con un decremento

del 15% en la osmolaridad, se observó como en el presente trabajo, que la taurina es el aminoácido que responde con mayor sensibilidad a estos estímulos. Estos resultados sugieren que en condiciones en las cuales los cambios en la osmolaridad son de una magnitud más parecida al que podría ocurrir en condiciones fisiológicas el aminoácido que se moviliza preferentemente es la taurina. La utilización de GABA y el glutámico, como parte de los mecanismos de control del volumen celular en las células nerviosas, parecería ser un recurso extremo ante un exagerado cambio en volumen, que raramente se observa, aun en situaciones patológicas y prácticamente nunca en condiciones fisiológicas.

Este comportamiento de las células nerviosas podría tener una lógica de supervivencia funcional, ya que la liberación al espacio extracelular de concentraciones muy elevadas de compuestos que, como el GABA y el ácido glutámico que ejercen una profunda influencia sobre la excitabilidad neuronal, y que consecuentemente tendría repercusiones muy negativas sobre la comunicación interneural. Basta recordar que las alteraciones profundas en la excitabilidad cerebral que se observan por ejemplo en la epilepsia, son el resultado de una desregulación de los mecanismos que controlan la cantidad y el tiempo de permanencia de estos aminoácidos en el espacio sináptico. En cambio la movilización de la taurina no tiene mayor riesgo, ya que su actividad sináptica se ejerce sólo a concentraciones muy elevadas.

Estas observaciones refuerzan el carácter de la taurina como un osmolito ideal, que puede mobilizarse del interior y al exterior de la célula sin afectar ningún aspecto ya sea metabólico o de interacción con receptores extracelulares que

podieran modificar el estado funcional de un sistema tan complejo como es el tejido nervioso.

SENSIBILIDAD FARMACOLOGICA DE LA LIBERACION DE AMINOACIDOS NEUROACTIVOS EN RESPUESTA AL ESTIMULO HIPOSMÓTICO.

Desde hace algunos años se ha descrito en forma consistente que la liberación de taurina activada por estímulos hiposmótico se puede bloquear con compuestos caracterizados como inhibidores de canales de cloro. Esto se ha observado prácticamente en todas las células que tienen la respuesta de liberación de taurina como parte del mecanismo de regulación de volumen. Los inhibidores más utilizados son el NPPB (5 nitro-2-[3-phenylpropylamino] benzoico ácido), la DDF (7β-acetoxi-6β-hydroxy-8,13-epoxy-labd-14-en-11-uno), el DIDS (4-4, diisothiocynato-stilbeno-2,-disulfónico ácido), y más recientemente el tamoxifen.

En estudios en paralelo examinando la sensibilidad farmacológica de los flujos osmosensibles de cloro y de taurina se ha podido apreciar que su sensibilidad farmacológica es muy semejante y ello ha llevado a postular que la taurina se moviliza en respuesta al hinchamiento a través de un canal aniónico poco específico. Posteriormente se sustentó esta propuesta mediante estudios electrofisiológicos en los que se demostró que, efectivamente, la taurina, el ácido glutámico y el ácido aspártico y otros aminoácidos neutros pueden permear a través de un canal aniónico activado por volumen.

Con estos antecedentes, se examinó el efecto de tres de los inhibidores previamente mencionados, sobre la liberación de ácido glutámico, del GABA y de la taurina estimulada por un medio 30% hiposmótico. Los fármacos usados fueron

el DIDS (1 mM) el tamoxifen (100 μ M), y el NPPB (100 μ M). La figura 3 muestra que el agente con más potencia fue el DIDS, que inhibió entre 45 y 60 % la liberación de aminoácidos. Se observaron algunas diferencias, siendo el GABA y la taurina más sensibles que el glutámico; el tamoxifen tuvo una acción un poco menor a la del DIDS sobre la liberación de glutámico y taurina, mostrando poco efecto sobre la liberación de GABA. Finalmente el NPPB bloqueó la liberación de aminoácidos alrededor de 26 a 30 % (figura 3). Estos resultados muestran una diferencia interesante con los que se observan en las células nerviosas en cultivo en las cuales el inhibidor más potente de los flujos de aminoácidos sensibles a volumen fue el NPPB, el cual produce inhibiciones de cerca de 90% (Sanchez-Olea y col. 1996). Esta diferencia puede deberse a una distinta forma de acción del fármaco en las diferentes condiciones experimentales, es decir que bajo un estímulo hiposmótico el NPPB esté actuando sobre la vía de liberación de los aminoácidos que se activa en respuesta al incremento del volumen y por lo tanto requiera de mayor concentración para poderla inhibir lo cual sería contraproducente debido a que las concentraciones ya usadas son tóxicas para la célula y si se aumentan, los efectos tóxicos son mayores; En el caso del estímulo con alto K^+ el NPPB actúa sobre la entrada de Cl^- (figura 6) impidiendo de esta forma el hinchamiento y por consiguiente la activación de la vía de liberación de los aminoácidos, utilizando siempre la misma concentración. En un estudio similar en rebanadas de hipocampo de cerebro de rata se observaron resultados semejantes a los obtenidos en la retina, es decir una mayor sensibilidad al DIDS que al NPPB.

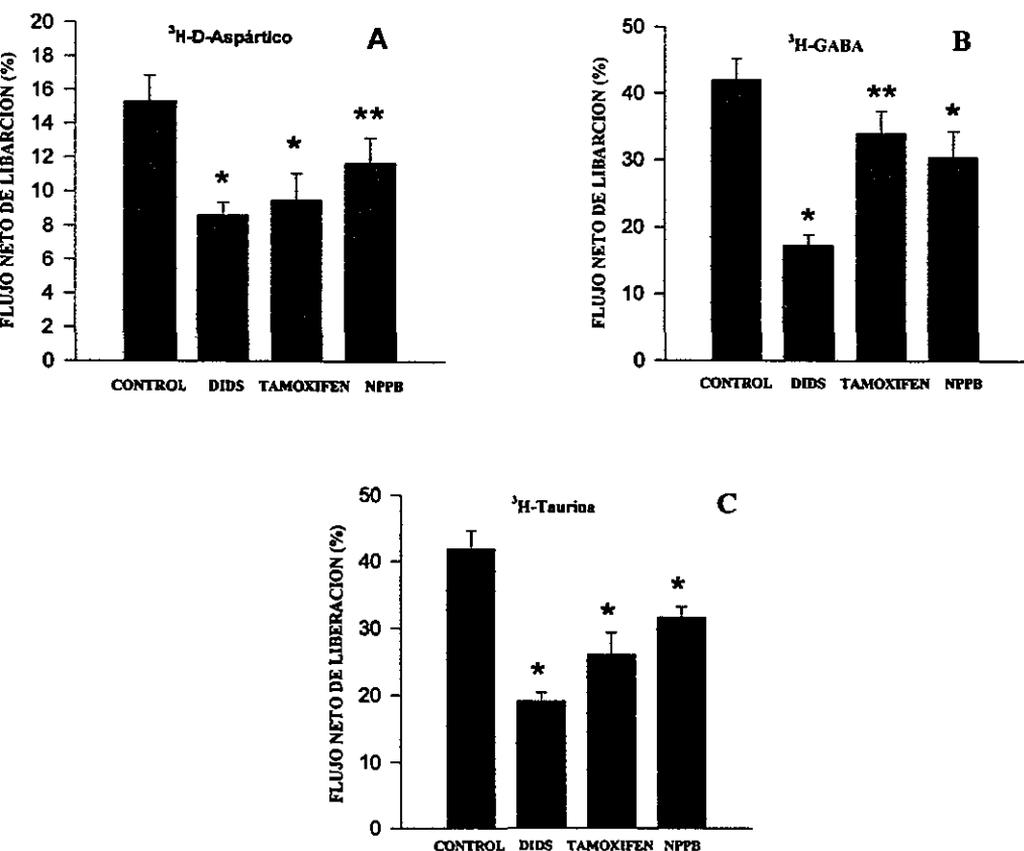


Fig. 3. Efecto de los diferentes bloqueadores de canales aniónicos en la liberación de aminoácidos de la retina de pollo estimulada por hinchamiento. El procedimiento experimental es igual que en la fig. 1, estimulando con un medio hiposmótico al 50 % (control), o en presencia de 1 mM de DIDS, 100 μ M de tamoxifen o 100 μ M de NPPB. A: ³H-D-Aspartato, B: ³H-GABA, C: ³H-Taurina. Los datos se midieron de la cantidad de radioactividad liberada durante los 15 min. del periodo de estimulación (liberación neta), expresada como porcentaje de la cantidad total incorporada al tejido en n=12 para los controles y 4 para condición experimental. *P< 0.001; **P< 0.002 \pm SE.

IDENTIFICACION DE UN COMPONENTE DE HINCHAMIENTO EN LA LIBERACION DE AMINOACIDOS NEUROACTIVOS ACTIVADA POR CONCENTRACIONES ELEVADAS DE POTASIO.

En trabajos bioquímicos dirigidos a examinar los efectos de la despolarización por potasio, con frecuencia se usan concentraciones elevadas, innecesarias para producir una despolarización y que sin embargo pueden llevar a un incremento en el volumen de las células. Este incremento se debe a la concentración extracelular de K^+ que produce un cambio en su equilibrio electroquímico, de esta forma favoreciendo su entrada a la célula, este K^+ al entrar va acompañado de Cl^- como y de agua osmóticamente obligada lo cual conduce a un aumento en el volumen celular . Si esto sucede, los aminoácidos neuroactivos que tengan una función doble como neurotransmisores y como osmolitos pueden liberarse en respuesta a estos dos tipos de estímulos. En la figura 4 se muestra la liberación de GABA, D-aspartico y taurina cuando las retinas se exponen a un medio isosmótico conteniendo KCl 54 mM. Este tratamiento indujo una liberación rápida de los aminoácidos particularmente de GABA. En el pico de liberación la salida de GABA fue de aproximadamente 4 % y la liberación total fue de 24.7 % (figura 5 y tabla 2) en el caso de la taurina la liberación máxima fue de 2.3 % y el total liberado del 19 %. En el caso del D-aspartico fue de 2.7 % de un total de liberación de 10.7 % (tabla 2).

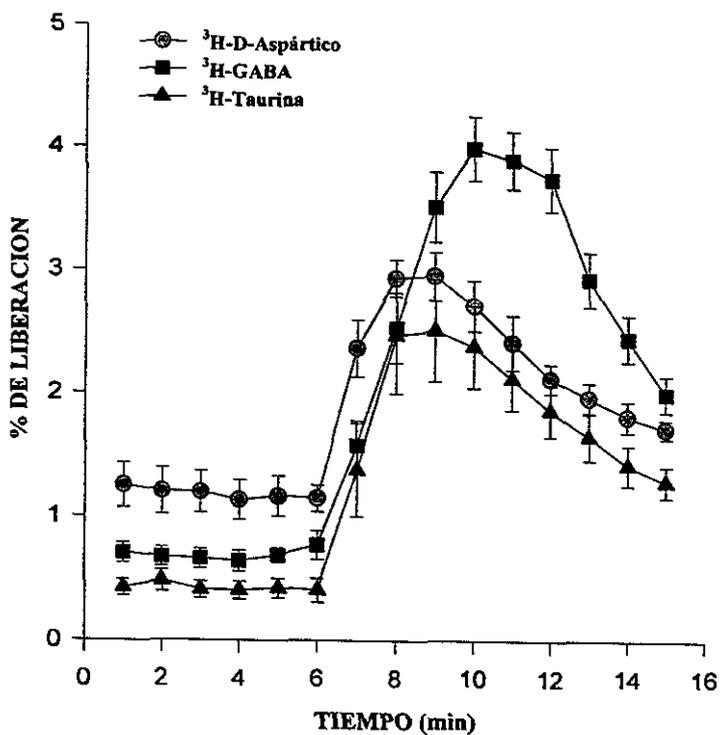


Fig. 4. Liberación de $^3\text{H-D-Aspártico}$, $^3\text{H-GABA}$, y $^3\text{H-Taurina}$ de la retina de pollo inducida por alto K^+ extracelular. El procedimiento experimental es igual a la fig. 1, pero el estímulo fue en un medio isosmótico con 54 mM de KCl. Los datos se tomaron de 8 experimentos individuales \pm SE.

	GABA (%)	TAURINA (%)	D-ASPARTICO (%)
CONTROL	24.7 ± 3.9	19 ± 1.7	10.7 ± 1.9
NPPB	4.7 ± 0.51	5.1 ± 2.7	3.5 ± 0.59
SIN CLORO	9.4 ± 0.52	6.4 ± 1.1	4.1 ± 1.1
HIPERTONICO	7.3 ± 0.42	5.5 ± 1.02	6.4 ± .58

TABLA 2- Efecto del NPPB, del medio sin cloro y del hipertónico en la liberación de los aminoácidos de la retina de pollo estimulada por alto K⁺ extracelular (54 mM).

La identificación del componente asociado al incremento en el volumen en los tres aminoácidos estudiados, constituye uno de los objetivos del presente trabajo.

Con el objeto de discriminar los componentes asociados a la despolarización y al hinchamiento en la liberación de los aminoácidos estudiados, se utilizaron tres estrategias, la primera fue examinar el efecto del NPPB, y el del DIDS que se sabe produce una inhibición previamente examinada en nuestro laboratorio, sobre la liberación activada por concentraciones altas de potasio

(Domínguez y col. 1989). La segunda estrategia fue reemplazar el cloro en el medio por un anión impermeable, el gluconato. Dado que el hinchamiento que se produce en presencia de concentraciones altas de potasio se debe a la acumulación de potasio y cloro, es posible disminuir o eliminar este componente cuando el cloro en el medio externo se reemplaza por el anión impermeable

gluconato. Esta condición no va a tener ninguna acción sobre el efecto despolarizante del potasio pero va a eliminar el incremento en el volumen asociado a las altas concentraciones de KCl. La tercera estrategia en llevar a cabo fue la estimulación despolarizante del potasio en un medio hiperosmótico. En estas condiciones el hinchamiento no tiene lugar debido a la diferencia osmótica entre los compartimentos intra y extracelular.

La figura 5 muestra que el NPPB tuvo un efecto inhibitor muy marcado sobre la liberación estimulada por K^+ 54 mM de los tres aminoácidos; este efecto no puede explicarse a simple vista por la presencia de un componente de hinchamiento en la condición experimental de estimulación por alto potasio, ya que, como se vio en la sección previa este compuesto es muy poco potente como inhibidor de la liberación osmosensible de los tres aminoácidos. Por lo tanto es necesario considerar que el NPPB podría estar actuando también sobre los mecanismos de liberación asociada a la despolarización del potasio o bien, sobre los mecanismos que llevan hasta un cambio en el volumen. No conocemos de ningún otro reporte que señale un resultado de esta naturaleza. Sería interesante examinar si el efecto del NPPB está restringido a la liberación producida por potasio o si tiene una acción más general sobre los mecanismos de liberación de los aminoácidos en respuesta a estímulos despolarizantes producidos por otros agentes.

En caso del DIDS, a diferencia del NPPB la inhibición de la liberación del GABA y de la taurina fue similar a la observada en el presente trabajo en condiciones hiposmóticas.

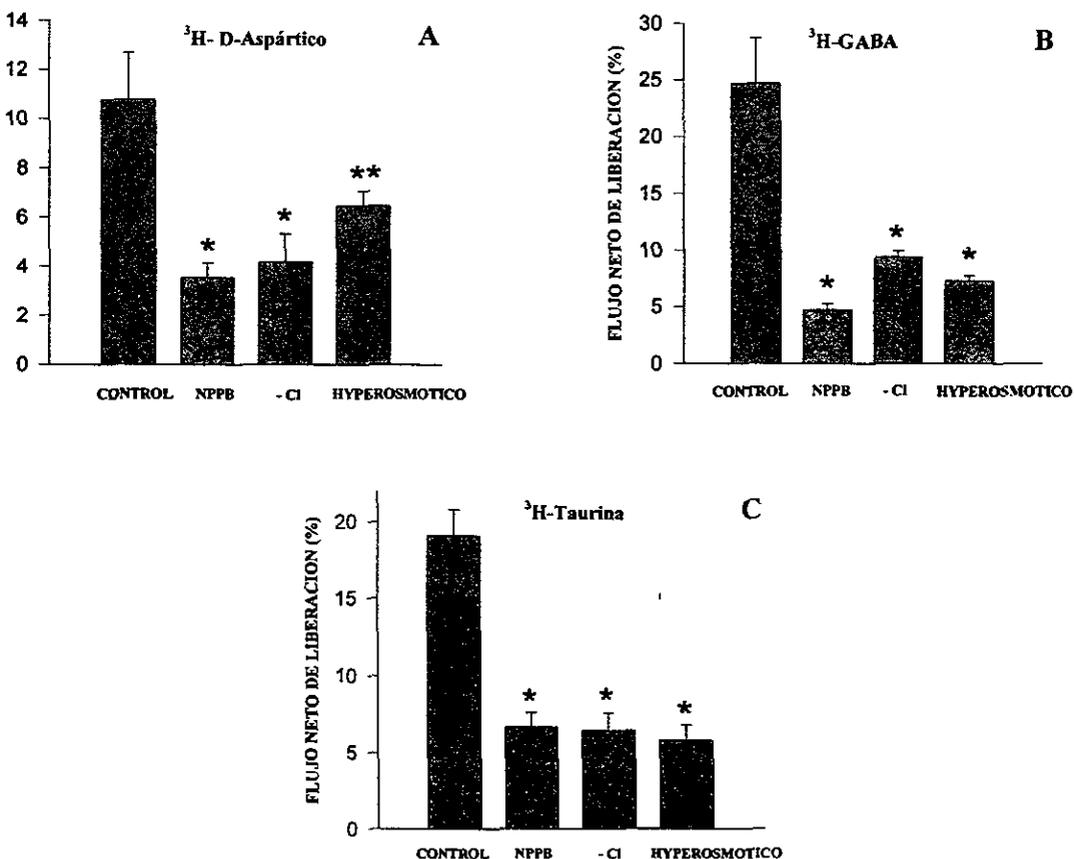


Fig. 5 Efectos inhibitorios del NPPB, del medio sin cloro y del hiposmótico en la liberación de aminoácidos de la retina de pollo. El procedimiento es igual al de la fig. 1 pero utilizando un medio con 54 mM de K^+ como estímulo. Todos los experimentos fueron hechos sin preincubación. El NPPB se utilizó a 100 μ M; el cloro fue substituido con las sales de gluconatos correspondientes; el medio hiperosmótico (100 mOsm) se hizo adicionando 100 mM de sorbitol. Los datos se expresan como en la fig. 4 (liberación neta) y se midieron de 4 -12 determinaciones * $P < 0.001$; ** $P < 0.002 \pm SE$.

Los efectos de reemplazar el cloro por el gluconato se observan en la figura 5. La liberación de GABA y de taurina en las retinas tratadas en esta forma se inhibió aproximadamente entre el 61 y 66% y la liberación de aspártico fue aproximadamente de 61% (tabla 2). La liberación de los aminoácidos estimulada por potasio en un medio hiperosmótico fue particularmente inhibida en el caso de la taurina y el GABA, mientras que la liberación del ácido glutámico se vió menos afectada con un 70, 71 y 40 % para cada caso (tabla 2).

Estos resultados sugieren que en los tres aminoácidos estudiados la estimulación con alto potasio conlleva un componente claro de respuesta asociada al hinchamiento. La proporción de este componente varía, siendo claramente mayor para el GABA y la taurina y menor para el ácido glutámico. Esto indica que aproximadamente el 80 y 70% de la liberación de taurina y el GABA no es una respuesta a la despolarización sino al hinchamiento, mientras que en el caso del ácido glutámico, el componente mayoritario responde a la despolarización. Estas observaciones deben tomarse en cuenta en aquellas investigaciones destinadas a conocer las características de la liberación de estos aminoácidos neuroactivos en respuesta a distintos estímulo despolarizantes. Es necesario, en todas estas investigaciones, tomar en consideración que mucho de estos estudios tienen como efecto asociado a la despolarización, un movimiento de iones que necesariamente va a conducir al incremento en el volumen celular. Tal es el caso de la veratridina, la cual produce una despolarización por la entrada de sodio, que se acompaña de cloro para mantener la electroneutralidad, lo cual lleva a una entrada obligada de agua. Lo mismo ocurre en el caso del ácido glutámico o de los agonistas de este

transmisor excitador, en los que siempre tiene lugar una acumulación de sodio con el consiguiente incremento del volumen de agua por los mecanismo ya mencionados.

EXAMEN HISTOLOGICO DE RETINAS EXPUESTAS A CONDICIONES DE ALTO K^+ EXTRACELULAR Y EN PRESENCIA DE NPPB.

Como se mencionó en la sección previa durante la caracterización de los mecanismos de liberación de aminoácidos activados por condiciones de hinchamiento isosmótico, se observó un efecto inhibitor muy potente del NPPB (figura 5). Sin embargo, al hacer el examen histológico de las retinas, tratadas con NPPB se detectó un efecto protector de este compuesto en el hinchamiento celular, y no una exacerbación como se esperaba si el inhibidor hubiera actuado previniendo la liberación osmosensible de los aminoácidos. La figura 6 muestra estos resultados en tres cortes de retinas tratadas en las diferentes condiciones experimentales. La figura 6A muestra la retina control en la cual se distinguen perfectamente los diferentes estratos celulares que la componen, los cuales no presentan ningún tipo de daño a nivel morfológico como un incremento del volumen celular reflejado como halos de color blanco alrededor del citoplasma celular, además de una pequeña desorganización del estrato en donde se presenta dicho aumento de volumen en las células. La figura 6B muestra una retina expuesta a un medio con alto K^+ extracelular (54 mM), en esta se puede observar un claro aumento del volumen celular en la capa nuclear interna, principalmente en la región de las células amacrinas y horizontales en donde se ven los cambios morfológicos, representados por el hinchamiento, que como se mencionó anteriormente, se denota por halos de color blanco alrededor del

citoplasma que posiblemente refleja la acumulación de agua en el interior. El efecto también se observa en la capa plexiforme interna principalmente en la región cercana o continua a las células amacrinas. Además se puede ver de igual manera un cierto aumento del volumen celular en el estrato de las células ganglionares y en la capa plexiforme externa, este hinchamiento en la capa plexiforme interna y en la externa esta representado por los espacios en color blanco que son lugares que estaban ocupados anteriormente por procesos celulares que sufrieron hinchamiento y una eventual lisis por el desbalance iónico producido por la exposición al alto K^+ . En presencia del NPPB, no se observa el hinchamiento en ninguna de las capas plexiformes ni en las células amacrinas (figura 6C). Vale la pena señalar la presencia de núcleos picnóticos en las capas nuclear interna y nuclear externa así como en la capa de las células ganglionares; esto podría indicar un cierto grado de toxicidad del fármaco.

Una posible explicación para efecto del NPPB, es que el fármaco estuviera bloqueando la entrada del Cl^- asociada a la acumulación del K^+ en el interior celular. En esta condición la reducción en la salida de los aminoácidos podría no deberse a una acción del fármaco en el mecanismo de liberación, sino a la prevención del hinchamiento. Durante condiciones patológicas, como es el caso del alto K^+ , se produce un desbalance iónico que conlleva a una entrada de K^+ a la célula, seguido de Cl^- como ion acompañante y de agua osmóticamente obligada, generando un incremento en el volumen celular. En un trabajo realizado por Zeevalk y col. en 1989 se muestra el efecto del DIDS y de la furosemida en la liberación de aminoácidos en condiciones de excitotoxicidad; estos fármacos protegen a la retina del hinchamiento por excitotoxicidad y previenen la salida de

aminoácidos activada por hinchamiento. Estos resultados se interpretaron como una posible participación del intercambiador aniónico o de cotransportadores electroneutros en el mecanismo responsable de generar el hinchamiento celular. El DIDS, al igual que el NPPB, y en menor medida la furosemida, son bloqueadores de la vía osmosensible de Cl^- y aminoácidos en cultivos celulares (Pasantes-Morales y col. 1986) y aunque son específicos para movimientos de Cl^- no lo son suficientemente para discriminar entre distintos tipos de canales de Cl^- . Por ello nos resulta difícil pensar que la vía de transporte de Cl^- que funciona para su acumulación y que es la responsable del hinchamiento, fuera sensible al efecto del NPPB. Esta interpretación es de especial interés y puede modificar las conclusiones de los trabajos tendientes a examinar el efecto de estos bloqueadores. En este trabajo mostramos, que la vía responsable para la entrada de Cl^- durante el hinchamiento en condiciones isomóticas tiene similitudes con la vía responsable de la movilización del Cl^- en dirección opuesta durante el hinchamiento en condiciones hiposmóticas. Pueden citarse, por ejemplo los trabajos recientes de Phillis y col. en 1997 y 1998 que muestran un importante disminución en la liberación de aminoácidos excitadores por bloqueadores de canales de Cl^- durante la isquemia. En vista de los resultados obtenidos, los efectos producidos por estos bloqueadores de canales de Cl^- deben ser estudiados con cuidado para esclarecer si la disminución en la liberación de los aminoácidos excitadores se debe a un bloqueo en la salida de estos aminoácidos o al efecto de prevenir la entrada de Cl^- que es la responsable del incremento en el volumen celular. La caracterización de esta vía es de gran interés en virtud de la

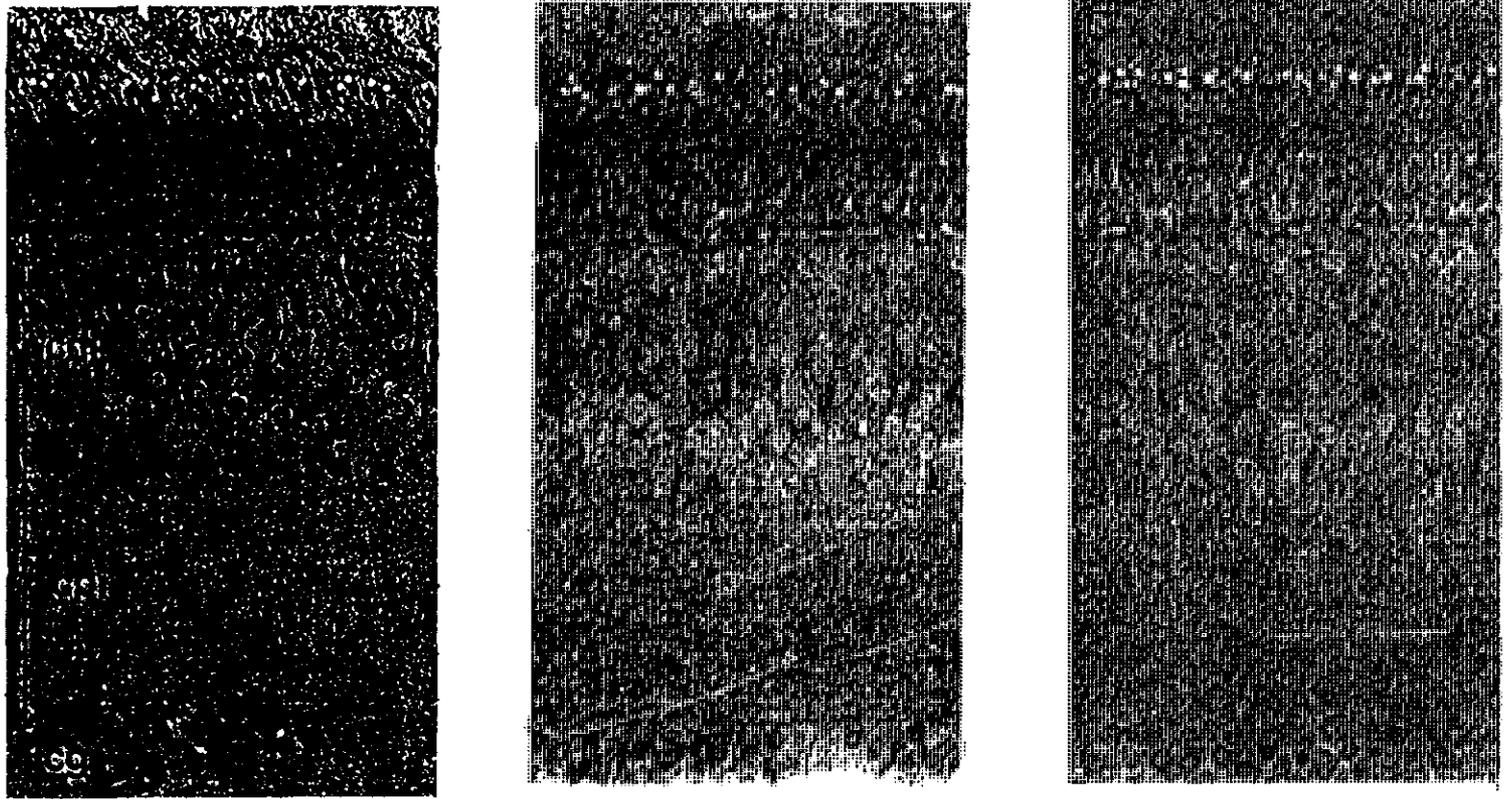


Fig. 6 . Preparaciones histológicas de retina de pollo expuesta a un medio con alto K^+ en presencia o ausencia de NPPB. A: Control en donde se muestra una clara extratificación de las capas celulares y sinápticas. CNI: Capa nuclear interna; CPI: Capa plexiforme interna; GC: Células ganglionares. B: Preparación con alto K^+ . Nótese el hinchamiento en las células amacrinas (en la base de la CNI) y la degeneración de los somas en la parte superior. También se muestra cierto daño en la CPI. C: Preparación con alto K^+ en presencia de NPPB. Muchos de los cambios observados en B se ven disminuidos o desaparecen . Todas las microfotografías se tomaron a la misma amplificación . Barra = 5 mm.

presencia de un componente de hinchamiento, el cual se presenta en numerosas patologías y además se asocia a efectos excitotóxicos.

REFERENCIAS

- Ackerman, M.J., Wickman, K.D., Clapham, D.E. 1994. Hypotonicity activated a native chloride current in *Xenopus* oocytes. *J. Gen. Physiol.* 103: 153-179.
- Baraban, S.C., Bellingham, M.C., Berger, A.J., Schwartskroin, P.A. 1997: Osmolarity modulate K^+ channel function on rat hippocampal interneurons but not CA1 pyramidal neurons. *J. Physiol.* 498: 679-689.
- Beerman, E. R. 1991. *Biochemistry of the Eye*. Plenum press. New York. 46 pp.
- Brandt, S., Jentsch, T.J. 1995. CIC-6 and CIC-7 are two novel broadly expressed members of the CIC chloride channel family. *FEBS Lett.* 377: 15-20.
- Choi, D.H. 1996. Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke.* 27(6): 1124-1129.
- Deutsch, C., Chen, L.Q. 1993: Heterologous expression of specific K^+ channels in T lymphocytes: Functional consequences for volume regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 10036-10040.
- Domínguez, L., Montenegro, J., and Pasantes-Morales, H. 1989. A volume-dependent chloride-sensitive component of taurine release stimulated by potassium from retina. *J. Neurosci. Res.* 22: 356-61.
- Dowling, J.E. 1992. *Neurons and Networks. A Introduction to Neuroscience*. The Belknap Press. London, England. 435 pp.
- Falke, B.C., Mislser. 1989: Activity of anion channel during volume regulation by clonal N1E115 neuroblastoma cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 3919-3923.
- Fiévet, B., Gabillat, N., Borgese, F., Motais, R. 1995. Expression of band-3 anion exchange induces chloride current and taurine transport, structure-function analysis. *EMBO J.* 14: 5158-5169.

- García-Romeau, F., Cossins, A.R., Motais, R. 1991. Cell volume regulation by trout erythrocytes: characteristics of the transport systems activated by hypotonic swelling. *J. Physiol.* 440: 547-567.
- Goldstein, L., Brill, S.R. 1991. volume-activated taurine efflux from skate erythrocytes: possible band-3 involvement. *Am. J. Physiol.* 260: R1014-R1020.
- Graham-TE, Pederson-PK, Saltin-B. 1987. Muscle and blood ammonia and lactate responses to prolonged exercise with hyperoxia. *J. Appl. Physiol.* oct; 63 (4): 1457-1462.
- Grinstein, S., Rothstein, A., Sarkadi, B., Gelfand, E.W. 1982. Responses of lymphocytes to anisotonic media: Volume-regulating behavior. *Am. J. Physiol.* 246: C204-C215.
- Gründer, S., Thieman, A., Pusch, M., and Jentsch, T.J. 1992. Regions involved in the opening of ClC-2 chloride channel by voltage on cell volume. *Nature.* 360: 759-762.
- Hallows-KR, Knauf-PA. 1994. Regulatory volume decrease in HL-60 cells: importance of rapid changes in permeability of Cl⁻ and organic solutes. *Am. J. Physiol.* oct; 267 (4 Pt 1): C1045-56.
- Harding, J.J. 1997. *Biochemistry of the Eye.* Chapman and Hadd Medical. 277 pp.
- Harrigan, N.R., 1996. Cerebral asting syndrome: a review. *Neurosurgery.* 38 (1): 152-160.
- Hoffman, E.K., Simonsen, L.O. 1989. Membrane mechanism in volume and pH.
- Kimelberg, S.K., Goderie, S., Higmann, S., Pung and A. Waniewski. 1990. Swelling-induced release of glutamate, aspartate and taurine from cultures. *J. Neurosc.* 10(5): 1583-1591.
- Krapivinsky, G.B., Ackerman, M.J., Gordon, E.A., Krapivinski, L.D., Clapham, D.E. 1994. Molecular characterization of a swelling-induced chloride conductance regulatory protein, pl_{cln} . *Cell* 76: 439-448.
- Kunzelmann, K., Slotki, I.N., Klein, D., Ausiello, D.A., Greger, R., Cabantchik, Z.I. 1994. Effects of P-glycoprotein expression on cyclic AMP and volume-

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

- activated ion flux and conductances in HT-29 colon adenocarcinoma cell. *J. Cell. Physiol.* 161: 393-406.
- Lang F., Guillian, L.B., Markus, R., Holard, V., Siegfriel, W., Erich, G., and Dieter, H.1998. Functional Significance of Cell Volume Regulatory Mechanism. *Phys. Reviews.* 78 (1), January; 248-273.
 - Lehmann, A., Hagberg, H., Jacobsen, I., and Hamberger, A.1985 a. Effects of status epilepticus on extracellular amino acid in the hippocampus. *Brain Res.* 359: 147-51.
 - Lipton, P.1973. Effects of membrane depolarization on light scattering by cerebellar cortical slices. *J. Physiol.* 231: 365-83.
 - López-Colome and Pasantes-Morales, H. 1978. Potassium-stimulated release of glycine, GABA and taurine from the chick retina. *Neurochem. Res.* 3: 431-41.
 - MacDonald, R.L., Stoodley, M. 1998. Pathophysiology of cerebral ischemia. *Neuron. Med. Chir. Tokyo.* 38(1): 1-11.
 - McEwan. G.T.A., Hanter, J., Hirst, B.H., Simmons, N.L. 1992. Volume activated Cl⁻ secretion and transepithelial vinblastine secretion mediated by D-glycoprotein are not correlated in cultured human T84 intestinal epithelial layers. *FEBS Lett.* 304: 233-236.
 - Menéndez, N., Herrera, O., Solís, J.M., Herranz, A.S. and Martín del Río, R.1989. Extracellular taurine increase in rat hippocampus evoked by specific glutamate receptor activation is related to the excitatory potency of glutamate agonist. *Neurosci. Lett.* 65: 65-71.
 - Moorman, R., Ackerman, S.J., Kowdley, G.C., Griffin. M.P., Moonsey, J.P., Chen, Z.1995. Unitary anion currents through phospholemman channel molecule. *Nature.* 377. 737-740.
 - Morán, J., S. Hurtado and Pasantes-Morales, H.1991. Similar properties of taurine release induced by potassium and hyposmolarity in the rat retina. *Exp. Eyes Res.* 53: 347-352.
 - Ninning, R., Schliess, F., Kutis, R., Hässinger, D. 1997: Osmosignalling in C6 glioma cells. *FEBS Lett.* 400: 163-167.

- Olney, J.W., Price, M.T., Samsom, L. and Labroyere, J. 1986. The role of specific ions in glutamate neurotoxicity. *Neurosci. Lett.* 102: 64-69.
- Pasantes-Morales, H., Domínguez, L., Montenegro, J., and Morán, J. 1988. A chloride-dependent component of the release of labeled GABA and taurine from the chick retina. *Brain Res.* 459: 120-30.
- Pasantes-Morales, H., E. Chacón, R.A. Murray and Morán J. 1994. Properties of osmolyte fluxes activated during regulatory volume decrease in cultured cerebellar granule neurons. *J. Neurosci. Research.* 37: 220-277.
- Pasantes-Morales, H., Morán, J. and Schousboe, A. 1990c. Taurine release associated to cell swelling in the nervous system. In *Taurine: functional Neurochemistry, Physiology and Cardiology* (Eds Pasantes-Morales, H., Shain, W., Martin, D.L. and Martin del Río, R.) Pp 369-76. Wiley-liss. New York.
- Pasantes-Morales, H., Morán, J., and Schousboe, A. 1990b. Volume-sensitive release of taurine and free amino acid from astrocytes; properties and mechanism. *Glia.* 3: 427-32.
- Pasantes-Morales, H., Murray, R.A., Lilja, L., and Morán, J. 1994 a. Regulatory volume decrease in cultured astrocytes 1. Potassium and chloride activated permeability, *Am. J. Physiol.* C165-C171.
- Pasantes-Morales, H., Schousboe, A. 1988. Volume regulation in astrocytes: A role for taurine as an osmoeffector. *J. Neurosci. Res.* 20: 505-509.
- Pasantes-Morales, H., S Alavez, R. Sánchez Olea, and J. Morán. 1993. Contribution of Organic and Inorganic Osmolytes to Volume Regulation in Rat Brain Cells in Culture. *Neurochemical Res.* 18 (4): 445-452.
- Paulmichl Laich, A., Fürst, H., Gschwentner, M., Nagl, V.O., Hittmair, A., Ritter, M. 1996. Transportation of the chloride channel I_{Cl} from the cytosol into the cell membrane after volume stress. *Biophys. J.* 70:A9.
- Phillis-JW, Song-D, O' Regan-MH. 1998a. Inhibition by anion channel blockers of ischemia-evoked release of excitotoxic and other amino acids from rat cerebellar cortex. *Brain Res.* May 30; 758 (1-2): 9-16.

- Phillis-JW, Song-D, O' Regan-MH. 1998b. Tamoxifen, chloride channel blocker, reduces glutamate and aspartate release from ischemic cerebellar cortex. *Brain Res.* Jun 12; 780 (2): 352-5.
- Raabe, W. 1987. *Neurochem. Pathol.* 6(1-2): 145-166.
- Rasola, A., Galletta, L.J., Gruenert, D.C., Romeo, G. 1994. Volume-sensitive chloride currents in four epithelial cell lines are not directly correlated to the expression of the MDR-1 gene. *J. Biol. Chem.* 269: 1432-1436.
- Reymann, S., Flörke, H., Heiden, M., Jakob, C., Stadtmüller, U., Steinacker, P., Jalk, V.E., Pardowitz, I., Thinning, F.P. 1995. Further evidence for multitopological localization of mammalian porin (VDAC) in the plasmalemma forming part of a chloride channel complex affected in cystic fibrosis and encephalomyopathy. *Biochemical and Molecular Medicine.* 54: 75-87.
- Ruben, A., Debor, F. 1996. *The Retina. A Model for Cell Biology Studies.* Part II. Academic Press, INC. London. 337 pp.
- Sanches-Olea, Moráles, M., García, O., Pasantes-Morales, H. 1996a: Cl⁻ channel blockers inhibit the volume-activated efflux of Cl⁻ and taurine in cultured neurons. *Am. J. Physiol.* 270: C1703-C1708.
- Sánchez-Olea, R., Morán, J., Schousboe, A., and Pasantes-Morales, H. 1991. Hyposmolarity-activated fluxes of taurine in astrocytes are mediated by diffusion. *Neurosci. Lett.* 130: 233-236.
- Schousboe, A. and Pasantes-Morales, H. 1989. Potassium stimulates release of ³H-*taurine* from cultured GABAergic and glutamatergic neurons. *J. Neurochem.* 53: 1309-15.
- Schousboe, A., Morán, J. and Pasantes-Morales, H. 1990b. Potassium stimulated release of taurine from cultured cerebellar granule neurons is associated with cell swelling. *J. Neurosci. Res.* 27: 71-77.
- Schousboe, A., R. Sánchez-Olea, J. Morán and H. Pasantes-Morales. 1991. Hyposmolarity-induced taurine release in cerebellar granule cell is associated with diffusion and not with high-affinity transport. *J. Neurosci. Res.* 30: 661-665.
- Strange, K., Emma, F., Jackson, P.S. 1996. Cellular and molecular physiology of volume-sensitive anion channels. *Am. J. Physiol.* 270: C711-C730.

- Strange, K., 1994. Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation: Clinical Significance of Cellular Osmoregulation. CRC Press. USA. 397 pp.
- Tilli, B.C., Gaestel, M., Engl, K., Edixhoven, M.J., Junge, H.R.1996: Hypo-osmotic cell swelling activated the p38 MAP-Kinase signaling cascade. FEBS Lett. 395: 133-136.
- Trachtman, H.1992. Cell Volume: a review of cerebral adaptative mechanism and implications for clinical treatment of osmolar disturbances:II. Pediatric Nephrology. 6(1): 104-112.
- Walz, W. 1986. Swelling and potassium uptake in cultured astrocytes. Can. J. Physiol. Pharmacol. 65: 1051-7.
- Zafonte, R.D.1997. Psychogenic polydipsia after traumatic brain injury. A case report. Am. J. Phys. Med. Rehabil. 76(3): 246-248.