



**UNIVERSIDAD CENTRAL DE
VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**RELACIÓN ENTRE CAMBIOS ESTRUCTURALES EN EL
CITOESQUELETO DE ASTROCITOS t-1 Y LA ACTIVIDAD DEL
INTERCAMBIADOR Na⁺/Ca²⁺**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por la bachiller Jamileth More D. como requisito parcial para obtener el título de Licenciado en Biología.

Tutor: Dr. Reinaldo DiPolo Alemán

Dra. Vincenza Cervino

CARACAS, VENEZUELA

Septiembre – 2010

RESUMEN

Los astrocitos son uno de los tipos celulares de mayor abundancia, representando aproximadamente la cuarta parte del volumen celular total en cerebro y cerebelo. Estas células gliales actúan como células de señalización, donde las variaciones en la concentración de calcio citoplasmático ($[Ca^{2+}]_i$) actúan como una señal capaz de propagarse a otros astrocitos y células adyacentes; en las cuales este ión puede participar como segundo mensajero y/o regular diversos procesos biológicos.

En astrocitos, la $[Ca^{2+}]_i$ puede cambiar en respuesta a estímulos como un “shock” hipo-osmótico (similar al generado durante patologías como isquemia e hiponatremia), responsable de inducir la liberación de Ca^{2+} a partir de reservorios intracelulares como el retículo endoplasmático (ER), que generan un incremento en la señal de Ca^{2+} citosólica controlada por la actividad en modo directo del intercambiador Na^+/Ca^{2+} (NCX); que es el principal mecanismo regulador de la $[Ca^{2+}]_i$ en astrocitos t-1. Adicionalmente, el NCX puede actuar en modo reverso frente a un desbalance del flujo de Na^+ , encontrando que este modo de operación es considerablemente incrementado si además se encuentra en presencia de un medio hipo-osmótico libre de Na^+ externo (Na^+_e).

Los resultados del presente trabajo, ponen en evidencia el posible mecanismo por el cual se produce un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ frente a un shock hipo-tónico libre de Na^+_e , indicando que las alteraciones que se producen en el citoesqueleto frente a este medio inducen un incremento en la actividad en modo reverso del NCX. Estas

alteraciones corresponden a la disrupción o despolimerización de los F-actina, de forma similar a la generada por toxinas de actina como Citocalasina D (CD) y Latrunculina B (Lat B). El incremento en la actividad del NCX se evidenció frente a los medios iso-osmótico e hipo-osmótico, luego de la despolimerización de los F-actina; observando en ambos casos un incremento en la señal de Ca^{2+}_i medida mediante microespectrofluorometría y perfusión. Otro hallazgo observado, fue el aumento en la fluorescencia asociada a la identificación del NCX y en el coeficiente de correlación entre el NCX y los F-actina, frente a un medio iso-osmótico y en condiciones de despolimerización, lo que sugiere una interacción directa entre ambas estructuras y en consecuencia un posible aumento en la expresión del NCX.

En este trabajo se presentan evidencias que señalan una independencia entre la liberación de calcio desde el ER y el citoesqueleto de actina, encontrando que la despolimerización de sus filamentos no afecta a dichos reservorios, donde el vaciado de Ca^{2+} ocurre solo en presencia de un medio hipo-osmótico libre de Na^+ y Ca^{2+} .

De forma general, los hallazgos reportados en este trabajo, identifican la despolimerización de los F-actina como responsable de incrementar la actividad del NCX, lo que convierte a este contra transportador en un mecano sensor capaz de reconocer los cambios de volumen intrínseco a las alteraciones del citoesqueleto de actina e inducidos por perfusión extracelular; que resultan similares a las condiciones presentadas en astrocitos t-1 durante daños cerebrales como isquemia cerebral, hiponatremia y encefalopatía hepática; por lo cual el aumento en la actividad del NCX contribuiría a controlar las $[Ca^{2+}]_i$ en estas condiciones.

DEDICATORIA

A Dios por cada uno de los momentos vividos, por estar a mi lado y guiarme en el complejo camino de la vida.

A mi padre, quien es la persona que más admiro.

A mi madre, por ser mi mejor amiga.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por ser la fuerza que silente me acompaña.

A mis padres, por su entrega y amor infinito. Gracias por enseñarme a luchar y nunca dejarme cerrar los ojos. Los amo, sin ustedes no estaría aquí!!!!

Al Dr. Reinaldo DiPolo, por guiarme durante mi aprendizaje en el laboratorio, por toda su confianza y buenos deseos. Gracias por enseñarme a mantener los sueños, con trabajo, dedicación y alegría.

A Héctor Rojas, por sus valiosos consejos, por enseñarme y guiarme con toda su experiencia y conocimiento.

A mis compañeros de laboratorio: Magaly Ramos, por guiarme en mis primeros pasos en el laboratorio y por el apoyo desinteresado durante todo este tiempo. Daniel Delgado, por todo el cariño, ayuda y apoyo en este trabajo. A ambos gracias por la amistad y el afecto. Son lo máximo!!!!!!

A Marcial, por ser mi amigo, consejero y apoyo, te quiero mucho!!!!

A mi hermana (gordis) y a leo (mi cuñado), por el cariño y por regalarme infinita alegría con la llegada de Samuel Alejandro.

A Eliana, por todo el cariño, amistad, paciencia y comprensión. Gracias por estar presente de forma incondicional. (Amistad a través del tiempo y espacio).

A mis amigas Adriana y Phele, gracias por compartir mis alegrías y estar a mi lado en los momentos difíciles. GRACIAS por todo su afecto y apoyo!!!

A los caballeros del insectario (Rafa, Esteban y Jr.), gracias por dejarme ser biólogo aun en contra de su voluntad jeje, no me convertí en ecóloga!!!! Gracias por siempre estar ahí para aconsejarme y darme una mano y un fuerte abrazo cuando lo

he necesitado, los quiero mucho... Amargadito, gracias por todos los consejos, cariño y paciencia. Tu nunca te equivocas!!!

A Esther, Oscar, Yamila, Argenis y Yorvin, por soportarme y por toda su valiosa ayuda y consejos desde el inicio de este recorrido.

A Niki y Yoly, gracias por el apoyo y la amistad, espero que me extrañen!!!

A la profesora Valentina Salas por toda la confianza, apoyo, enseñanza y motivación en mis inicios dentro de la fisiología.

A los profesores Palmira Guevara y Alexander Laurentin, por sus oportunas palabras de confianza y motivación, así como sus invaluable conocimientos y experiencia.

Gracias a mis amigos Olga, Vanesa, Jennifer, Indira, Wilmer, Jacklin, Dennis, Andrecho y Jonathan, por enseñarme a ser 100% UC Vista y por enseñarme que existen las aulas 35 y 36. Olga, gracias por tus consejos y apoyo sincero. Jonathan, eres mi héroe, sin tu invaluable ayuda no podría haber terminado.

Denisse, gracias por tus buenos deseos, el cariño y confianza. Gracias amiga lo logramos!!!! Nunca olvides sonreír, ni dejes de ser feliz!!!!!!

Eduardo mil gracias por no dejar que el mal humor se apodere de mi y por siempre hacerme reír con tu buen humor. Gracias por esta nueva amistad.

Claudia, Yarcely y Juan Manuel, gracias por soportar mis cuentos y por tooooooooooda la paciencia en las mañanas y tardes en el autobús; así como en los tramos y cenas del IVIC (Yarce). Gracias por todos sus consejos!!!!!!!!!!!!!!

Y gracias a todos aquellos que puedo estar olvidando y que de alguna forma siempre estuvieron ahí.

ABREVIATURAS

AM: Acetoximetil éster.

ATP: Adenosin trifosfato.

ADP: Adenosin difosfato.

Ca²⁺_e: Calcio extracelular.

Ca²⁺_i: Calcio intracelular.

Ca²⁺: Calcio iónico.

CD: Citocalasina D.

CICR: Liberación de Calcio Inducida por Calcio (Calcium induced-calcium release).

Cit: Citocalasina.

ER: Retículo Endoplasmático.

EDT-3: Endotelina 3.

F-actina: Polímeros filamentosos o filamentos de actina.

Fis: Filamentos intermedios.

FITC: Isotiocianato de fluoresceína.

G-actina: Monómeros globulares de actina.

Gap: Uniones brecha.

GFAP: Proteína ácida fibrilar glial (Glial fibrillary acidic protein).

HVA: Canales activados por alto voltaje.

Ig: Inmunoglobulina.

Ins3P: Inositol-1,4,5-fosfato.

Ins3PR: Receptor de Inositol-1,4,5-fosfato.

Jpk: Jasplakinolide.

Lat B: Latrunculina B.

LSCM: Escaneo láser de microscopía confocal (Laser scanning confocal microscopy).

MFs: Microfilamentos.

MTs: Microtúbulos.

NCX: Intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.

NMG⁺: N-metil-D-glucamina.

PBS: Buffer fosfato salino.

PMCA: Bomba Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática (Plasma Membrane Ca^{2+} -ATPasa).

Ry: Ryanodina.

RyRs: Receptores de Ryanodina.

SERCA: Bomba Ca^{2+} -ATPasa del retículo endoplasmático (Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPasa).

SNC: Sistema Nervioso Central.

SR: Retículo Sarcoplasmático.

SSCM: Escaneo de microscopía confocal por etapas (Stage Scanning Microscopy).

VOCs: Canales operados por voltaje.

VSCC: Canales de calcio sensibles a voltaje.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	9
2.1. El Calcio Ca^{2+}	9
2.2. Mecanismos de regulación de la $[Ca^{2+}]_i$.....	11
2.2.1. El Intercambiador Na^+/Ca^{2+}	12
2.2.2. La Ca^{2+}-ATPasa de la membrana plasmática.....	13
2.2.3. La Ca^{2+}-ATPasa del Retículo Endoplasmático.....	13
2.2.4. Canales de Ca^{2+}.....	14
a) Canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes.....	14
b) Canales de Ca^{2+} operados por reservorios.....	15
c) Canales de Ca^{2+} activados por ligandos.....	16
2.3. Descripción estructural y funcional de astrocitos t-1.....	17
2.3.1. Morfología.....	17
2.3.2. Fisiología.....	18
2.4. Microfilamentos o Filamentos de Actina.....	20
2.4.1. Dinámica de los Microfilamentos.....	21
2.4.2. Toxinas que afectan la estructura de los microfilamentos.....	22
a) Citocalasina.....	23
b) Latrunculina.....	24
c) Jasplakinolide.....	25
2.5. Modificación del volumen intracelular por efecto de cambios estructurales en F-actina.....	27
2.6. Relación entre la $[Ca^{2+}]_i$ y el volumen citoplasmático.....	29
3. OBJETIVOS.....	33
3.1. Objetivo General.....	33

3.2. Objetivos Específicos.....	33
4. MATERIALES Y METODOS.....	34
Microespectrofluorometría y perfusión.....	34
Microscopia Confocal.....	36
4.1. Cultivo primario e identificación de astrocitos t-1.....	38
4.1.1. Cultivo primario de astrocitos t-1.....	38
4.1.2. Métodos para identificación de astrocitos t-1.....	42
a) Marcaje de glías con GFAP (Identificación Inmunológica).....	42
b) Test de endotelina (Identificación farmacológica)	43
4.2. Determinación de la $[Ca^{2+}]_i$.....	44
4.3. Identificación del intercambiador Na^+/Ca^{2+} y detección de la señal de Ca^{2+} mediante microscopia confocal.....	47
4.2.1. Inmunomarcaje del intercambiador Na^+/Ca^{2+} en condiciones de polimerización y despolimerización de los filamentos de actina.....	47
4.2.2. Determinación del aporte de Ca^{2+} proveniente del ER frente a la despolimerización de los F-actina.....	49
5. RESULTADOS.....	51
5.1. Identificación inmunológica de astrocitos t-1.....	51
5.2. Identificación farmacológica de astrocitos t-1, prueba de endotelina-3 (EDT-3).....	52
5.3. Efecto de la hipo-osmolaridad sobre la actividad del intercambiador Na^+/Ca^{2+}.....	58
5.4. Efecto de la polimerización y despolimerización de la F-actina de astrocitos t-1, sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en medios: iso-osmótico, hipo-osmótico e híper-osmótico.....	60
a) Efecto de la Citocalasina D.....	60

b) Efecto de la Latrunculina B.....	67
c) Efecto del Jasplakinolide.....	72
5.5. Inmunomarcajes del NCX y F-actina en astrocitos t-1 bajo condiciones de polimerización y despolimerización, en medio iso-osmótico.....	74
a) Control experimental.....	75
b) Efecto de la Citocalasina D.....	78
c) Efecto de la Latrunculina B.....	81
d) Efecto del Jasplakinolide.....	84
5.6. Determinación del aporte de Ca⁺² proveniente del retículo endoplasmático (ER) frente a la despolimerización de filamentos de Actina.....	87
6. DISCUSIÓN.....	91
6.1. Obtención de cultivos primarios de células gliales con “alta purificación” de Astrocitos t-1 e identificación inmunológica y farmacológica.....	93
6.2. Evaluación del efecto del efecto que tienen los cambios estructurales de los filamentos de actina en un medio hipotónico, sobre el intercambiador Na⁺/Ca⁺².....	98
6.3. Relación entre el aporte de Ca⁺² proveniente del retículo endoplasmático (ER) frente a la polimerización de los filamentos de Actina.....	104
7. CONCLUSIONES.....	106
8. BIBLIOGRAFIA.....	107

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Homeostasis y señalización dinámica del calcio.....	10
FIGURA 2. Mecanismos reguladores y gradientes de Ca^{2+}	11
FIGURA 3. Astrocito t-1 y Astrocito t-2.....	17
FIGURA 4. Funciones de los Astrocitos.....	19
FIGURA 5. Formación de F-actina.....	22
FIGURA 6. Estructura de Citocalasina D.....	24
FIGURA 7. Estructura de Latrunculina B.....	25
FIGURA 8. Estructura de Jasplakinolide.....	26
FIGURA 9. Esquema de funcionamiento de microscopio de epifluorescencia.....	34
FIGURA 10. Diagrama esquemático del sistema de microespectrofluorimetría y perfusión.....	36
FIGURA 11-A. Marcaje por inmunofluorescencia de GFAP.....	52
FIGURA 11-B. Marcaje por inmunofluorescencia de GFAP.....	52
FIGURA 12. Efecto de la EDT-3 sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en astrocitos t-1.....	54
FIGURA 13. Efecto del Na^+ en la restauración de la $[Ca^{2+}]_i$ en astrocitos t-1 estimulados con EDT-3.....	55
FIGURA 14. Participación del NCX en la restauración de la $[Ca^{2+}]_i$ en astrocitos t-1 estimulados con EDT-3.....	57
FIGURA 15. Efecto de la hipo-tonicidad sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en astrocitos t-1.....	59
FIGURA 16. Efecto de la citocalasina sobre la $[Ca^{2+}]_i$	61
FIGURA 17. Efecto de la citocalasina sobre la $[Ca^{2+}]_i$ la regulación del Ca^{2+}_i en condiciones iso-osmóticas.....	63
FIGURA 18-A. Efecto del shock hiper-tónico e hipo-tónico sobre la actividad del NCX y la regulación del Ca^{2+}_i en astrocitos t-1, en presencia de CD.....	65
FIGURA 18-B. Efecto del shock hiper-tónico e hipo-tónico sobre la actividad del	

NCX y la regulación del Ca^{2+}_i en astrocitos t-1, en presencia de CD.....	66
FIGURA 19. Efecto de la Latrunculina sobre el nivel de Ca^{2+}_i	68
FIGURA 20. Efecto de la Latrunculina frente a cambios osmóticos y su relación con la actividad del NCX.....	70
FIGURA 21. Efecto de la Latrunculina B sobre la restauración de la $[Ca^{2+}]_i$ en astrocitos t-1.....	71
FIGURA 22. Efecto de Jasplakinolide sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en un medio hipo-osmótico...	72
FIGURA 23. Efecto de Jasplakinolide sobre la restauración del Ca^{2+}_i en astrocitos t-1.....	73
FIGURA 24. Control de Inmunomarcaje que identifica el NCX y F-actina en astrocitos t-1, frente a un medio iso-osmótico.....	77
FIGURA 25. Inmunomarcaje que identifica al NCX y F-actina en astrocitos t-1, luego de un shock iso-osmótico en presencia de Citocalasina D.....	79
FIGURA 26. Comparación de la fluorescencia del NCX entre el experimento control y el experimento de despolimerización con CD.....	80
FIGURA 27. Inmunomarcaje que identifica al NCX y F-actina en astrocitos t-1, luego de un shock iso-osmótico, en presencia de Latrunculina B	82
FIGURA 28. Comparación de la fluorescencia del NCX entre el experimento control y el experimento de despolimerización con Latrunculina B.....	83
FIGURA 29. Inmunomarcaje que identifica al NCX y los F-actina en astrocitos t-1, luego de un shock iso-osmótico en presencia de Jasplakinolide.....	85
FIGURA 30. Comparación de la fluorescencia del NCX entre el experimento control y el experimento de polimerización con Jasplakinolide.....	86
FIGURA 31-A y B. Determinación del aporte del Ca^{+2} proveniente del ER frente a la despolimerización de F-actina.....	89
FIGURA 31-C. Determinación del aporte del Ca^{+2} proveniente del ER frente a la despolimerización de F-actina.....	90

INDICE DE TABLAS

TABLA 1. Reactivos para solución Alto Na ⁺ /Alto K ⁺	37
TABLA 2. Reactivos para solución Tyrode Normal.....	38
TABLA 3. Reactivos para soluciones de Perfusión Extracelular en Test de endotelina.....	43
TABLA 4. Toxinas para polimerización y despolimerización de actina.....	44
TABLA 5. Reactivos para soluciones de Perfusión Extracelular.....	44
TABLA 6. Test de Normalidad (Shapiro-Wilk).....	76
TABLA 7. Valores de fluorescencia del NCX en imagen control.....	76
TABLA 8. Nivel de colocalización, marcaje control.....	77
TABLA 9. Test de Normalidad (Shapiro-Wilk).....	78
TABLA 10. Valores de fluorescencia del NCX en experimentos con CD.....	78
TABLA 11. Nivel de colocalización, experimento con CD.....	79
TABLA 12. Test de Normalidad (Shapiro-Wilk).....	81
TABLA 13. Valores de fluorescencia del NCX en experimentos con Lat B.....	81
TABLA 14. Nivel de colocalización, experimentación Lat B.....	82
TABLA 15. Test de Normalidad (Shapiro-Wilk).....	84
TABLA 16. Valores de la fluorescencia del NCX en experimentos con Jpk.....	84
TABLA 17. Nivel de colocalización, experimento con Jpk.....	85

1. INTRODUCCIÓN

El ión calcio (Ca^{2+}) tiene diversas funciones en los organismos vivos, entre ellas su actividad como segundo mensajero, que lo involucra en la regulación de diversos procesos biológicos, como: la neurosecreción, la contracción muscular, entre otros (McCormack y Cobbold, 1991; Berridge y col, 2000).

Este ión se encuentra en las células en concentraciones intracelulares muy bajas respecto al medio extracelular, típicamente la relación entre estas concentraciones es $\text{Ca}^{2+}_e/\text{Ca}^{2+}_i = 10^4 - 10^5$. La baja concentración intracelular puede presentar variaciones rápidas y significativas, como respuesta a diversos estímulos fisiológicos (DiPolo, 1996). Todo esto hace de gran interés el estudio de los mecanismos que regulan el metabolismo de este ión divalente (Berridge y col, 2000).

En el proceso de regulación del calcio intracelular (Ca^{2+}_i) las células deben enfrentarse a dos situaciones: a) una entrada basal de calcio proveniente del exterior y b) pequeñas variaciones en su permeabilidad, que pueden provocar importantes cambios en su concentración intracelular, por lo cual las células han desarrollado eficientes sistemas para controlar los niveles de Ca^{2+}_i asociados a los procesos de acoplamiento excitación-respuesta. Esta regulación es realizada a través de: 1) sistemas intracelulares que ligan al ión reversiblemente (regulación a corto plazo) y 2) sistemas localizados a nivel de la membrana plasmática capaces de producir movimientos netos de calcio desde el compartimiento intracelular al extracelular (regulación a largo plazo).

Cabe destacar que los mecanismos involucrados en la regulación del Ca^{2+} presentes en la membrana plasmática y en el citoplasma, pueden regular con diferentes grados de eficiencia la concentración de calcio intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), encontrándose que solo aquellos ubicados en la membrana plasmática pueden modificar el contenido total de calcio celular y por tanto pueden mantener los niveles fisiológicos de calcio durante periodos prolongados (DiPolo, 1996).

Existen cuatro rutas conocidas utilizadas por el Ca^{2+} para cruzar la membrana plasmática: 1) entrada pasiva (fuga inespecífica), 2) canales iónicos 3) contratransporte $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y 4) transporte activo de calcio dependiente de ATP (bomba de calcio). Sin embargo, a excepción de los glóbulos rojos, en la mayoría de las células excitables y no excitables la bomba de calcio y el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, son los sistemas responsables de mantener a largo plazo el gradiente electroquímico de Ca^{2+} en ambas direcciones.

Una diferencia fundamental entre estos mecanismos radica en que la bomba de calcio funciona en forma vectorial, es decir, expulsando Ca^{2+} al exterior, a diferencia del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ cuya reversibilidad permite el movimiento de Ca^{2+} en ambas direcciones. Bajo ciertas condiciones esta propiedad de reversibilidad aunada a su carácter electrogénico, hace que el intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ constituya una vía alternativa de entrada de calcio, diferente a la de los canales iónicos; lo cual es de gran importancia en la fisiología de diferentes tipos celulares (DiPolo, 1978; DiPolo y Beaugé, 1979).

Adicionalmente se considera que el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ tiene baja afinidad (2-3 μM) y alta capacidad, con una velocidad máxima de transporte de 1500-3000 femtomoles. $\text{cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$, mientras que la bomba de calcio es un sistema de alta afinidad (0,1-0,3 μM) y baja capacidad con una velocidad máxima de transporte de 300 femtomoles. $\text{cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (DiPolo y Beaugé, 1979). Estas diferencias en la direccionalidad y velocidad del movimiento de Ca^{2+} en la célula, convierten al intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en el sistema de mayor eficiencia en la regulación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en cortos periodos de tiempo; por lo cual se considera que es uno de los sistemas de transporte de calcio que juega un papel crítico en la homeostasis de este ión (DiPolo 1996).

La expresión del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en la membrana plasmática es alta en diversos tipos celulares presentes en el sistema nervioso. Esto sugiere un papel importante de este contratransporte en la homeostasis de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Hay pruebas que indican que la importancia relativa del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en diferentes tipos de células gliales es muy variable (Delumeau y col, 1990; Deshpande y col, 1997; citado por Rojas y col, 2004); sin embargo, para establecer firmemente la importancia de este intercambiador en una línea celular dada del sistema nervioso, es necesario tener en cuenta los siguientes factores:

- 1) Las técnicas experimentales utilizadas para medir la actividad del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$: las mediciones de fluorescencia de Ca^{2+} en células individuales, la captación de Ca^{2+} dependiente de Na^+_o en las poblaciones de células, y el cambio de corriente medido por patch clamp bajo una configuración de célula entera.

2) Las diferentes condiciones experimentales empleadas: Li^+ versus NMG^+ (N-metil-D-glucamina) como el reemplazo de Na^+ , la temperatura ambiente frente a la temperatura fisiológica.

3) Disociado de cultivos celulares versus cultivos organotípicos.

4) Expresión de diferentes isoformas de intercambiador (NCX1, NCX2, NCX3) en diferentes células del Sistema Nervioso Central (SNC) (Rojas y col 2004).

Estas condiciones se cumplen para los astrocitos t-1 como ha sido demostrado por Rojas y col. (2004), quienes reportaron que en astrocitos tipo 1 (t-1) de cerebelo de rata sin estimular, la mayor parte del flujo neto de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática se lleva a cabo por los modos de operación directo y reverso del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, lo cual permite mantener la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en condiciones fisiológicas de reposo. La presencia de estas características en astrocitos t-1 hace posible realizar extrapolaciones a este tipo celular, utilizando la información obtenida en trabajos previos referente a la homeostasis de Ca^{2+}_i .

Cabe destacar que los astrocitos pertenecen a un grupo conocido como células gliales, que representan cerca del 50% del volumen celular total en cerebro y cerebelo; donde la mitad de las células gliales está compuesta por astrocitos, que junto a las neuronas son los tipos celulares de mayor abundancia (Pope, 1978; citado por Rojas y col, 2008). Otros hallazgos interesantes son los reportados por Bourke y col. (1980) y Long (1982), donde señalan que los astrocitos se encuentran asociados a diversos daños cerebrales como hiponatremia, isquemia cerebral y

encefalopatía hepática, relacionados con un incremento del volumen citoplasmático que puede llevar a la lesión o ruptura de la célula.

Los incrementos en el volumen intracelular de los astrocitos suelen estar asociados a cambios en la homeostasis, dicho estado depende de diversos factores como la presencia de transportadores y canales en su membrana plasmática, responsables de permitir el paso regulado de diferentes iones, aminoácidos y monosacáridos, que son necesarios como fuente de energía (García y Massieu, 2004).

Aunado a esto y de acuerdo a investigaciones previas como la realizada por Verkhratsky y col. (1998) y Araque (2008), se conoce que existe una relación entre el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ y el aumento de volumen en astrocitos, que incluye la liberación de Ca^{2+} desde reservorios intracelulares y la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular; por lo cual es importante tener presente los diversos mecanismos responsables del flujo de Ca^{2+} y las variaciones en su concentración, al momento de evaluar los cambios en el volumen de los astrocitos.

En astrocitos la $[Ca^{2+}]_i$ puede cambiar en respuesta a diferentes estímulos, entre ellos un shock hipo-osmótico (Fischer y col, 1997). Recientemente en este laboratorio Rojas y col. (2008), investigaron el efecto de la osmolaridad en la actividad del intercambiador Na^+/Ca^{2+} , encontrando que frente a un shock hipotónico se produce un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ como consecuencia de la liberación de Ca^{2+} a partir de reservorios intracelulares operados por receptores de ryanodina

(RyRs) y que la magnitud de la señal de Ca^{2+} inducida por la hipo-tonicidad es controlada por la actividad del intercambiador, operando en modo de extrusión.

Respecto a los cambios en el volumen interno que se producen en diferentes tipos celulares, se han reportado otros hallazgos, uno de ellos es el de Cornet y col. (1988), que trabajaron con células de ratón de las líneas T2 y PC12, reportando que la despolimerización de la red de microfilamentos causa una disminución significativa en el volumen celular y afecta la regulación del volumen de células inflamadas, ambos fenómenos en condiciones isotónicas. Posteriormente Hallows y col. (1991), quien al trabajar con las células HL60 encontraron que las alteraciones en el volumen de la célula están asociadas con cambios en la cantidad y en la organización de F-actina; adicionalmente estos resultados se vieron apoyados por otros trabajos como el de Linshaw y col. (1992), que observaron en túbulos proximales de conejo, la reorganización de los microfilamentos después de su exposición a un medio hipo-tónico. Seguidamente Cornet y col. (1993), manteniendo el modelo de estudio anterior (Cornet y col, 1988), reportaron que la interrupción de los filamentos de actina afecta la regulación del volumen en una manera dosis dependiente.

En función de lo antes expuesto, se puede inferir que existe una relación entre el volumen interno de los astrocitos t-1 y el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, que es regulada por acción del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$; sin embargo, también se encuentra que las alteraciones en el volumen de la célula están asociados con cambios en F-actina.

De acuerdo a esta relación de parámetros, es comprensible que se plantee la existencia de una interacción directa entre el intercambiador y los F-actina, de tal manera que los cambios en esta interacción podrían regular de forma positiva o negativa la actividad del intercambiador (Siushansian y col, 1996, citado por Rojas y col, 2008); por lo cual el presente trabajo estudia la relación entre la actividad del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y los cambios estructurales en F-actina (polimerización y despolimerización) frente a un medio hipo-tónico, ya que en este medio se produce un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que es regulada por acción del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.

Continuando la línea de trabajo que antecede a esta investigación los astrocitos t-1 provienen de cultivos *in vitro*, siendo este un modelo experimental que permite simular condiciones muy semejantes al estado *in vivo* y además debido a las características de los animales empleados, las respuestas observadas son altamente extrapolables al hombre.

La actividad del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ es evaluada con microscopia confocal mediante inmunomarcajes, lo que permite una identificación en alta definición de la cantidad de proteína expresada en la membrana de la célula frente a los cambios estructurales antes mencionados. Un segundo mecanismo para evaluar esta actividad es la técnica de microespectrofluorometría y perfusión, en el cual se pueden realizar cambios del medio extracelular que originen o no cambios en el citosol de la célula, que serán observados en tiempo real, usando como medida la fluorescencia emitida por marcadores fluorescentes asociados al ión Ca^{2+} , ya que cambios drásticos en su concentración se encuentran asociados a la función del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ presente en astrocitos t-1.

Debido al importante rol que desempeñan los astrocitos t-1, su obtención representa parte fundamental en el desarrollo de este trabajo, por lo cual la técnica de cultivo de tejido para este tipo celular se estableció con el fin de obtener una preparación con el mayor porcentaje de pureza de astrocitos t-1 (aproximadamente 90%), reduciendo los niveles de diversos tipos celulares como purkinje, oligodendrocitos y otros tipos de células gliales, facilitando la selección y estudio de astrocitos t-1.

Como se mencionó anteriormente, el estudio de la homeostasis del Ca^{2+} en este tipo celular es de gran importancia debido a su relación con lesiones cerebrales, por lo cual una mayor comprensión sobre su fisiología, amplía el panorama para otras líneas de investigación como la biomedicina, hacia una mayor comprensión de los procesos de cambio a nivel celular que se producen en cerebro y cerebelo, los cuales podrían promover el desarrollo de mejoras terapéuticas frente a daños cerebrales en pro de obtener un óptimo funcionamiento del SNC.

2. ANTECEDENTES

2.1. El Calcio.

Las señales de Ca^{2+}_i son altamente versátiles ya que ocurren en un amplio rango espacio-temporal, lo cual permite regular numerosos procesos celulares. Para lograr esta versatilidad, el sistema de señalización de Ca^{2+} opera de formas muy diferentes regulando los procesos celulares que funcionan en un amplio rango dinámico. Uno de los desafíos es comprender como estos diferentes sistemas de señalización se pueden configurar para controlar los diversos procesos celulares.

En cada instante, el nivel de Ca^{2+}_i es determinado por un equilibrio entre las reacciones “on” que introducen calcio en el citoplasma y las reacciones “off” a través de las cuales esta señal es removida por la acción combinada de tampones iónicos, bombas e intercambiadores (Figura 1), (Berridge y col, 2003). Estas reacciones son las responsables de mantener en la mayoría de las células una $[\text{Ca}^{2+}]_i=100\text{nM}$, siendo la concentración de Ca^{2+} extracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_e$) en el orden de 1-2mM, en condiciones de reposo (Clapham, 2007); con un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ cercano a 1000nM cuando son activadas (Berridge y col, 2000).

Durante las reacciones “on”, los estímulos inducen la entrada de Ca^{2+} y la formación de segundos mensajeros que liberan Ca^{2+} interno almacenado en el retículo endoplasmático (ER) y retículo sarcoplasmático (SR). Este fenómeno es denominado liberación de calcio inducida por calcio (CICR, por su nombre en ingles “calcium induced-calcium release”). La mayor parte del Ca^{2+} se une a los tampones intracelulares tales como la paralbúmina y la calmodulina, mientras que una

pequeña porción se une a efectores que activan diversos procesos celulares que operan en un amplio espectro temporal. Durante las reacciones “off” el Ca^{2+} se desliga de los efectores y tampones, a medida que es removido desde la célula por varios intercambiadores y bombas (Figura 1), (Berridge y col, 2003).

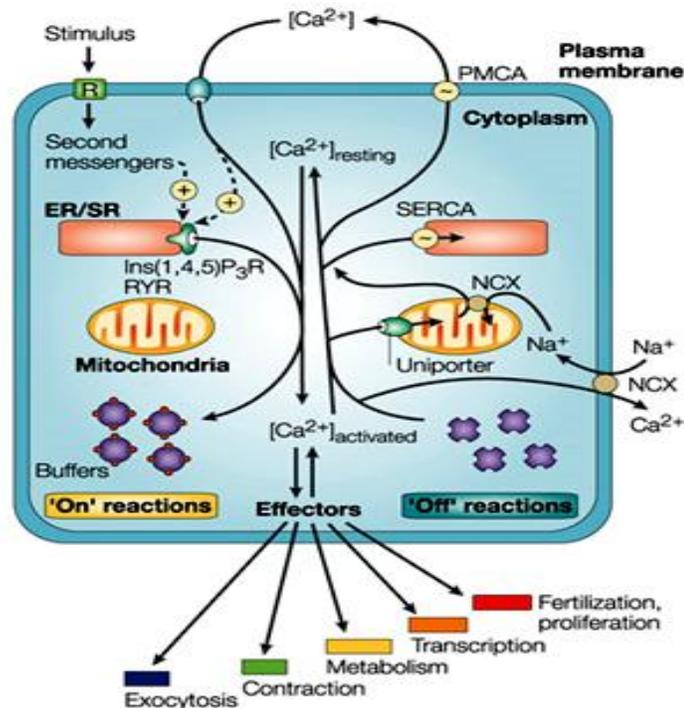


Figura 1. Homeostasis y señalización dinámica del calcio (Tomado de Berridge y col, 2003).

En la membrana plasmática el intercambiador (NCX) y la Ca^{2+} -ATPasa (PMCA) generan el movimiento de Ca^{2+} al exterior (Berridge y col, 2003), mientras los canales de Ca^{2+} voltaje dependientes en la membrana plasmática están cerrados y su activación depende del potencial de membrana de la célula (Brini y Carafoli, 2000).

En el ER y SR hay canales que se pueden abrir de forma específica debido a la presencia del Inositol 3-fosfato (Ins3P) o determinadas concentraciones de Ca^{2+} , también llamados receptores de Inositol 3-fosfato (Ins3PR) y receptores de

ryanodina (RyRs), estos son responsables de la liberación de Ca^{2+} al citoplasma (Brini y Carafoli, 2000); mientras las bombas Ca^{2+} -ATPasa (SERCA) ingresan el Ca^{2+} al ER. Por otro lado, las mitocondrias son capaces de secuestrar Ca^{2+} a través de un uniporte y luego, éste es liberado más lentamente en el citosol para ser transportado por la SERCA y PMCA. (Berridge y col, 2003).

2.2. Mecanismos regulatorios de $[\text{Ca}^{2+}]_i$

Como se mencionó anteriormente, los mecanismos regulatorios de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ son muy diversos, encontrando diferencias en su estructura y función; por lo cual resulta fundamental determinar el papel que desempeñan cada una de estas estructuras en la movilización de Ca^{2+} , a través de la membrana plasmática de la célula y en estructuras sub-celulares (Fig. 2). Algunas de estas estructuras como canales, bombas e intercambiadores son descritas a continuación.

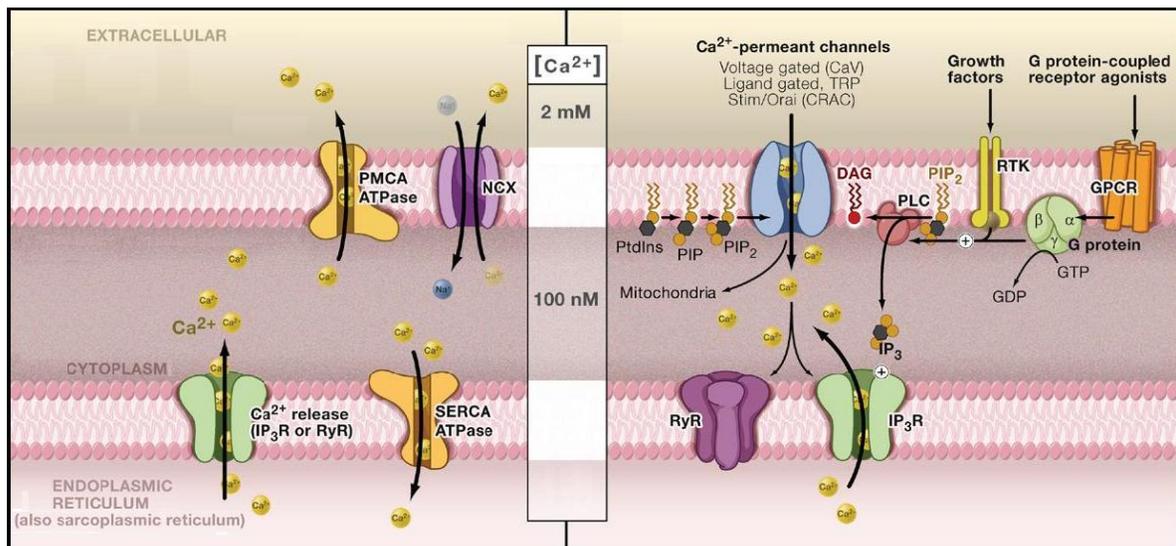


Figura 2. Mecanismos reguladores y gradientes de Ca^{2+} . (Tomado y editado de Clapham, 2007).

2.2.1. El Intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$

El intercambiador electrogénico $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX), es una proteína de membrana plasmática que pertenece a la familia de 8 transportadores sodio-calcio, siendo un importante regulador de los niveles de Ca^{2+} intracelular. Presenta diversas isoformas que varían dependiendo del tejido (Nicoll y col 1990). Una de las isoformas conocidas es el NCX2 o miembro 2 de esta familia de transportadores, que es una proteína de 921 aminoácidos específica de tejido cerebral y tejido esquelético (Li y col 1994).

El intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, utiliza la energía almacenada en el gradiente electroquímico de Na^+ para sacar Ca^{2+} fuera de la célula (Nicoll y col 1990; Li y col 1994).

Los primeros trabajos realizados en axón de calamar indicaron que el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ produce un flujo neto de calcio, dentro o fuera de la célula dependiendo de los gradientes electroquímicos de Na^+ y Ca^{2+} . Estos gradientes pueden generar cuatro modelos básicos de operación para el intercambiador: 1) Modo directo, responsable de la salida neta de Ca^{2+} (Intercambio $\text{Na}^+_e/\text{Ca}^{2+}_i$); 2) El intercambio reverso, responsable de la entrada de Ca^{2+} (Intercambio $\text{Na}^+_i/\text{Ca}^{2+}_e$); 3) El intercambio homólogo $\text{Ca}^{2+}_e/\text{Ca}^{2+}_i$; y 4) El intercambio homólogo $\text{Na}^+_e/\text{Na}^+_i$. (Blaustein y Lederer 1999, citado por DiPolo y Beaugé 2006).

En ocasiones, el NCX2 opera en su modo reverso y causa una entrada de Ca^{2+} , como consecuencia de un incremento temporal de la concentración de Na^+ en el citoplasma, resultando en una rápida entrada de Ca^{2+} al citosol. Una vez que la

concentración de Na^+ disminuye en el interior de la célula, el intercambiador revierte su acción a su modo directo, generando la salida del Ca^{+2} hacia el exterior celular (Rojas y col, 2008).

2.2.2. La Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática

La bomba de Ca^{+2} de la membrana plasmática (PMCA) es una proteína de membrana, que pertenece a la familia de los transportadores dependientes de la hidrólisis de ATP, específicamente al grupo de los transportadores iónicos ATP-asa, tipo P; es decir que son fosforilados durante el ciclo de transporte (Brini y Carafoli, 2000). La estructura de la Ca^{2+} -ATPasa consta de 10 dominios transmembrana, con el extremo N y C-terminal hacia el citoplasma.

Esta bomba tiene una alta afinidad por el Ca^{2+} , con un $K_m < 0,5 \mu\text{M}$; pero solo cuando se forma el complejo con la Calmodulina, ya que en su ausencia la bomba tiene una afinidad comparable con el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. La Ca^{2+} -ATPasa permite el movimiento de Ca^{2+} hacia el exterior celular, manteniendo una baja $[\text{Ca}^{2+}]$ en el citosol (Brini y Carafoli, 2000).

2.2.3. La Ca^{2+} -ATPasa del Retículo Endoplasmático

La Ca^{2+} -ATPasa del Retículo sarco/endoplasmático (SERCA), es una proteína de membrana intracelular que pertenece a la familia de las ATPasa tipo P, con una estructura semejante a la PMCA, presentando 10 dominios transmembrana y 3 dominios citoplasmáticos (Carafoli, 2002).

Esta bomba tiene como función mantener una alta $[Ca^{2+}]$ dentro del retículo sarco/endoplasmático (Berridge y col, 2003).

2.2.4. Canales de Ca^{2+}

Los canales de Ca^{2+} son estructuras transmembranas de gran importancia que facilitan el movimiento de este ión a través de la membrana, permitiendo su participación en diversas funciones celulares donde participa como señal química. Debido a la diferencia de concentraciones entre los medios extra e intra celular (aproximadamente 10^{-3} y 10^{-7} , respectivamente) que difieren en cuatro ordenes de magnitud, el flujo de Ca^{2+} ocurre a favor de su gradiente electroquímico; siendo uno de los procesos que más eficazmente puede modificar las concentraciones citosólicas de este ión (DiPolo, 1996). Cabe destacar que se ha demostrado en cerebro de rata, la expresión de una heterogénea familia de canales de calcio (Catterall y col, 2005), entre ellos mencionando a los canales voltaje-dependientes, canales operados por reservorios y operados por ligandos.

a) Canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes.

Los canales operados por voltaje (VOCs) o canales de calcio sensibles a voltaje (VSCC), son estructuras complejas formadas de múltiples subunidades, alfa-1, alfa-2, beta y delta; cuya proporción es de 1:1:1:1 (Snutch y col, 1990). La actividad del canal está dirigido por la subunidad alfa-1, formadora de poros y sensible a voltaje. En muchos casos esta subunidad es suficiente para generar la actividad del canal de calcio sensible a voltaje; sin embargo, otras subunidades

actúan como auxiliares de alfa-1 y regulan la actividad del canal, estas subunidades son: beta y alpha-2/delta unidas por un puente di-sulfuro (Catterall y col, 2005).

La sub-unidad alfa-1, da lugar a corrientes de calcio de larga duración (tipo-L), esta propiedad identifica al canal de calcio como miembro del grupo de los canales “activados por alto voltaje” (HVA) (Berridge y col, 2003). Estos canales median la entrada de Ca^{2+} en las células excitables en respuesta a la despolarización de la membrana, admitiendo un pequeño pulso de Ca^{2+} que luego estimula o regula una variedad de procesos intracelulares o funciones fisiológicas, incluyendo la modulación de otros canales iónicos (Sutch y col, 1990; Catterall y col, 2005).

b) Canales de Ca^{2+} operados por reservorios.

Los canales de Ca^{2+} operados por reservorios, son estructuras que permiten el paso de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática. La activación de estas estructuras se encuentra asociada a un proceso de acoplamiento entre el vaciado de Ca^{2+} desde el ER y la membrana plasmática, conocido como “entrada de Ca^{2+} operado por reservorios” (Hewavitharana y col, 2007); donde el flujo es activado por la liberación de Ca^{2+} (I_{CRAC}) (Clapham, 2007).

Este proceso es dependiente de la participación y activación de las proteínas STIM y Orai. STIM es una proteína que actúa como sensor de los bajos niveles de Ca^{2+} del ER, donde se redistribuye y migra dentro de su membrana. Posteriormente STIM forma un complejo multiproteico con otras estructuras, entre ellas: SAM (motivos- α estériles), ERM (ezrina-moseina-radixina), CC (espiral enroscada “coiled-coil”) y S/P (serina-prolina) y K (lisina), activando el canal CRAC presente en la

membrana plasmática; que consta de 4 sub-unidades transmembranas de la proteína Orai (Clapham, 2007).

c) Canales de Ca^{2+} operados por ligandos

Los canales de Ca^{2+} operados por ligandos actúan en respuesta al reconocimiento receptor-ligando, algunas de estas interacciones corresponden a los receptores de Inositol-1,4,5-trifosfato (Ins3PR) y el receptor de Ryanodina (RyR) (Berridge y col, 2003).

La liberación de Ca^{2+} mediada por el Ins3PR desde el ER, ocurre en respuesta a la activación del receptor cuando reconoce al Ins3P que induce el vaciado del contenido de Ca^{2+} del ER. Aunque con frecuencia son llamados canales de Ca^{2+} , son Ins3PR, que actúan como canales catiónicos no selectivos que conducen Ca^{2+} (Putney, 2005; citado por Clapham, 2007).

Adicionalmente en el ER se encuentra otro canal que conduce la liberación de Ca^{2+} , que es activado por los RyRs; este canal tiene como principal agonista natural al Ca^{2+} , ya que bajas $[\text{Ca}^{2+}]$ abren el canal para permitir la salida de Ca^{2+} desde el ER/SR.

Tanto Ins3PR y RyR, son estructuras tetraméricas permeables al Ca^{2+} , que atraviesan el ER y/o SR y permiten el paso de Ca^{2+} (Clapham, 2007).

2.3. Descripción estructural y funcional de Astrocitos t-1.

2.3.1. Morfología.

Los astrocitos probablemente son la población más diversa de células gliales, (Verkhratsky y col.1998). Son las neuroglías más grandes, de forma estrellada y gran cantidad de haces intermedios compuestos de proteína ácida fibrilar glial (GFAP). Este grupo de células se dividen en dos sub-grupos: Astrocitos t-1 o protoplasmáticos y astrocitos t-2 o fibrosos, siendo los astrocitos t-1 el sub-grupo de mayor abundancia (Landis y Reese. 1981).

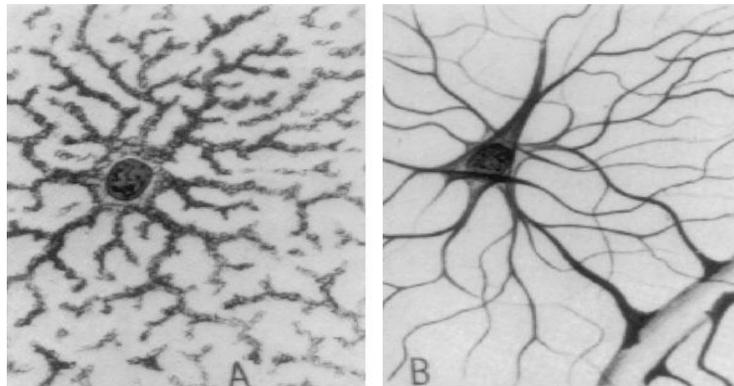


Fig.3. A) Astrocyto t-1. B) Astrocyto t-2. (Verkhratsky y col.1998).

Los astrocitos t-1, presentan prolongaciones muy ramificadas que se extienden hasta las paredes de los vasos sanguíneos; participando en la regulación de las uniones estrechas de las células endoteliales de los capilares y vénulas que conforman la barrera hematoencefálica, por lo cual desempeñan un papel importante dentro de la comunicación neuronal (Verkhratsky y col.1998).

El citoesqueleto de estas células, está formado por un conjunto de componentes fibrilares como la GFAP y además por tres tipos de filamentos:

microfilamentos (MFs), filamentos intermedios (FIs), microtúbulos (MTs) (Landis y Reese 1981; Fan y col 1993; Jiménez y Merchant 2003) y una delicada estructura reticular denominada red microtubular (Jiménez y Merchant 2003).

Los microfilamentos constituidos por actina tienen un diámetro de 5 a 7 nm e interactúan con miosina y otras proteínas en el citoplasma y la membrana plasmática (Landis y Reese 1981; Jiménez y Merchant 2003); son sensibles a drogas como latrunculina y citocalasina, que alteran su distribución y grado de polimerización (Wakatsuki y col 2000).

Los microtúbulos son estructuras tubulares constituidas por unidades de tubulina. Intervienen en funciones como el transporte celular, el movimiento de cilios, flagelos y el de cromosomas. Se asocian a proteínas MAPs y Tau; para polimerizarse y funcionar. (Fan y col. 1993).

Los filamentos intermedios tienen un diámetro de 8 a 10nm, son bioquímicamente heterogéneos y están formados por diversas proteínas como queratina, vimentina, desmina, etc. Son frecuentes en células sujetas a tensión mecánica y en axones de células nerviosas, siendo los componentes más estables del citoesqueleto. No se conocen drogas que los despolimericen, aunque se desorganizan al despolimerizarse los microtúbulos.

2.3.2. Fisiología.

Durante años los astrocitos fueron considerados como simples células de apoyo para las neuronas, sin un papel importante en el procesamiento de información para el sistema nervioso. Sin embargo, muchas evidencias obtenidas

por varios grupos, han demostrado la importancia de este tipo celular dentro de la comunicación bidireccional con neuronas (Araque 2008), así como en la neurodegeneración, regulación de volumen celular y liberación de neurotransmisores como Glutamato (Verkhratsky y col, 1998; Maragakis y Rothstein, 2006.).

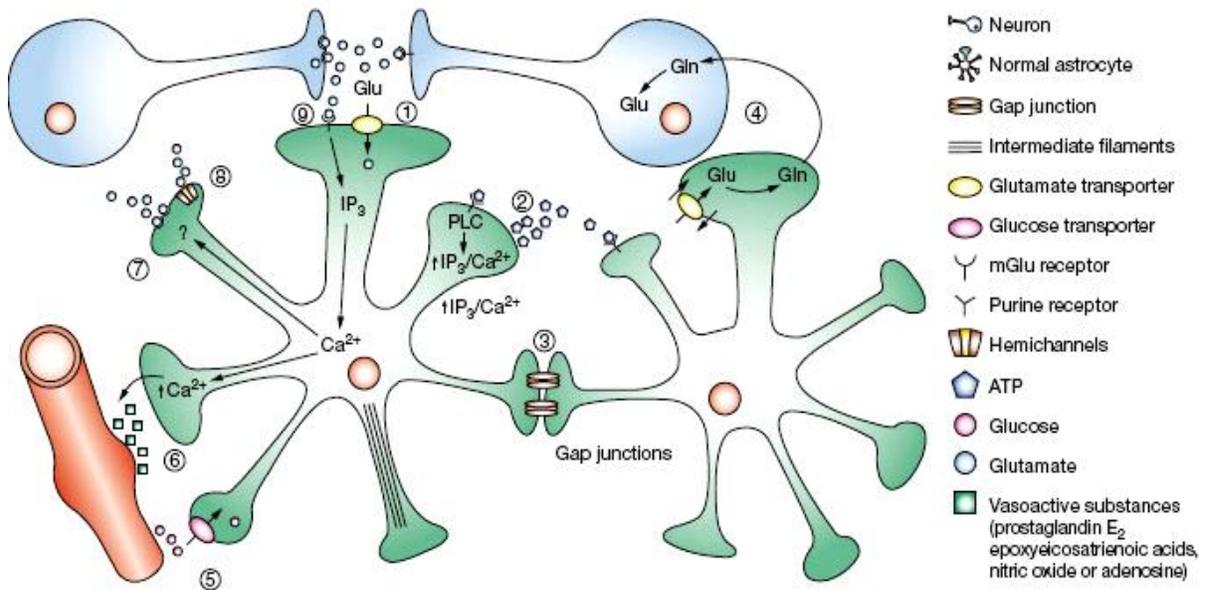


Fig. 4. Funciones de los Astrocitos. (Maragakis y Rothstein 2006)

Los astrocitos son fundamentales para el catabolismo de algunos aminoácidos en el cerebro, así como en la síntesis de nuevos aminoácidos; además realizan el transporte de diversos precursores metabólicos de las neuronas a través de la vía malato-aspartato (Maragakis y Rothstein 2006). La comunicación entre astrocitos, se produce mediante la liberación de ATP y la unión a los receptores de purina en los astrocitos adyacentes, generando la activación de la fosfolipasa C, con la posterior activación del inositol trifosfato (Ins3P) que induce la movilización de Ca²⁺. Así mismo, las uniones brecha (Gap) contribuyen a la formación de un sincitio entre los astrocitos, para el intercambio de pequeñas moléculas y comunicación

celular (ver fig. 2), (Simard y Nedergaard 2004, citado por Maragakis y Rothstein 2006).

En el caso de la liberación de Glutamato, esta podría ocurrir después del incremento en $[Ca^{2+}]_i$ y la activación de otros factores relacionados con las prostaglandinas. Según Araque (2008) la base de la excitabilidad celular en astrocitos depende de las variaciones en la $[Ca^{+2}]$ en el citosol, factor determinante en el proceso de transmisión sináptica.

Es importante señalar que variaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ son responsables de inducir no solo la liberación de neurotransmisores, también son capaces de iniciar procesos apoptóticos y activación de enzimas como proteasas y p-calpains, responsables de la degradación de las proteínas que forman el citoesqueleto (White y col. 2000).

2.4. Microfilamentos o Filamentos de Actina.

La actina es una de las proteínas más abundantes entre los eucariotas, presente en todo el citoplasma y representa el 20% en peso de proteína celular total en fibras musculares. La actina se presenta en la célula de dos formas: como monómeros globulares denominados G-actina y como polímeros filamentosos denominados F-actina.

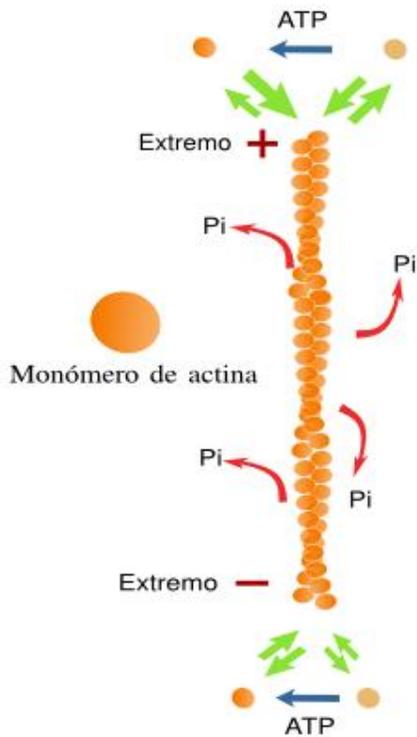
El esqueleto de F-actina, es una estructura formada por dos hebras enroscadas en una hélice, cada hebra está compuesta por moléculas de G-actina polimerizadas que están unidas a una molécula de ATP. Los sitios de unión actina ATP, son considerados los puntos activos de los filamentos de actina, donde

interactúan con los puentes cruzados de los filamentos de miosina para producir la contracción. (Guyton y Hall, 2005).

Adicionalmente, el citoesqueleto de actina media en una gran variedad de funciones biológicas, incluyendo la división celular, cambios de forma, movimiento y regulación del volumen intracelular (Henson, 1999).

2.4.1. Dinámica de los Microfilamentos.

Según Dieguéz (2008) la formación de MFs como consecuencia de la polimerización de G-actina tiene lugar de forma espontánea, en condiciones *in vitro* similares a las que se supone *in vivo* cuando se añade Mg^{2+} , K^+ , Na^+ y se favorece cuando se encuentra unida a ATP. Inicialmente la unión al Mg^{2+} y ATP provocará la “activación” de la G actina tras una serie de cambios conformacionales que le confieren susceptibilidad para polimerizar. Seguidamente tres monómeros de actina se unen entre sí para formar un oligómero o núcleo susceptible de polimerización en un proceso llamado “nucleación”, el cual ocurre espontáneamente según las condiciones iónicas del medio (Mogilner y Oster 1996).



<http://webs.uvigo.es/mmgias/5-celulas/7-actina.php>

Figura 5. Estructura polarizada en posición Helicoidal Asociación y Disociación de monómeros que presentan mayor afinidad con ATP

La siguiente fase de la polimerización es la “elongación” donde la G-actina se une rápidamente a los extremos del filamento. En el extremo (+), el crecimiento es más rápido que en el extremo (-); ya que en el extremo (+) la concentración mínima o concentración crítica (C_c) para que ocurra polimerización es menor que en el extremo (-). Los monómeros de actina se incorporarán al filamento preferiblemente en forma de G-actina-ATP, posteriormente ocurre la hidrólisis del ATP ocasionando una disminución en la afinidad

de la G-actina a permanecer en el filamento y generando que los monómeros de G-Actina-ADP+Pi sean susceptibles a disociarse del polímero de F-actina en forma de G-actina-ADP. Dado que hay una fase de retardo antes de la hidrólisis del ATP, un crecimiento rápido del filamento producirá que la región central del MF contenga G-actina-ADP mientras que los extremos tendrán G-actina-ATP (Dieguez 2008).

La elongación dura hasta que la adición de nuevas subunidades a los extremos de los MFs se iguala a la velocidad de disociación de las subunidades de estos. A esta concentración no se produce crecimiento neto del polímero, y se alcanza la “fase de equilibrio”. La polimerización y despolimerización ocurren de forma equilibrada para mantener los MFs como una estructura “estable” pero altamente dinámica, este mecanismo polarizado permite organizar los MFs

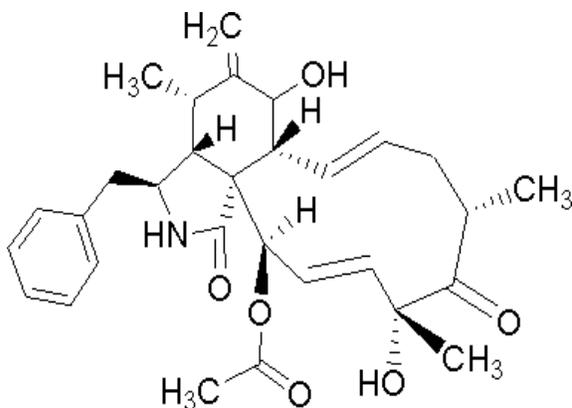
rápidamente en consonancia con los requerimientos morfo-funcionales de la célula (Mogilner y Oster, 1996; Dieguéz 2008).

2.4.2. Toxinas que afectan la estructura de los Microfilamentos.

La dinámica del citoesqueleto puede modificarse mediante el uso de sustancias naturales denominadas toxinas de actina, que se obtienen a partir de diversos animales como esponjas, nudibranquios marinos, también de plantas, hongos y bacterias. Su principal característica estructural es la presencia de un componente macrocíclico hidrofóbico central englobado por grupos laterales estequiométricamente complejos. En general, estas sustancias se dividen en dos grupos: (1) toxinas que bloquean/inhiben el ensamblaje o desestabilizan los MFs y (2) toxinas que promueven la polimerización o estabilizan los MFs (Cornet 1988, 1993; Wakatsuki y col, 2000; Dieguéz 2008).

a) Citocalasinas (Cit)

Las citocalasinas, son un grupo de metabolitos de origen fúngico, permeables a la membrana de la célula, generalmente empleados para la despolimerización del citoesqueleto (Schliwa 1982; Cooper 1987). Su estructura consiste en un anillo macrocíclico unido a un anillo de isoindol (Wakatsuki 2000). Funcionalmente la citocalasina se asemeja a proteínas de nivelación, en que bloquea el extremo final de los filamentos de actina, la polimerización nucleada, y acorta los filamentos (Cooper 1987).



http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?N4=C8273%7CSIGMA&N5=Product%20No.%7CBRAND_KEY&F=SPEC (Consulta: 12 de Septiembre 2009).

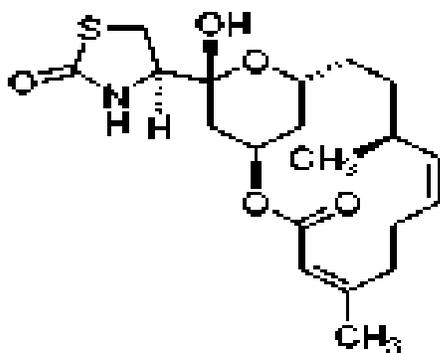
Fig. 6. Estructura de Citocalasina D.

Generalmente actúan en el extremo (+) de la F-actina donde se une y bloquea la entrada y salida de la G-actina provocando la despolimerización en los extremos (-), además la estequiometría de unión se considera de una citocalasina por filamento de actina (Flanagan y Lin 1980; Brown y Spudich 1981).

La citocalasina D (CD) es aproximadamente 10 veces más eficaz respecto a otras citocalasinas conocidas. Para CD, las constantes de inhibición y unión son bastante similares, esto demuestra que la “unión” de dicha toxina es responsable de la inhibición de la polimerización y despolimerización (Cooper 1987).

b) Latrunculina (Lat)

Otros compuestos como las toxina marina latrunculina A y B inhiben la formación de F-actina o polimerización, formando complejos de estequiometría 1:1 con monómeros de actina (Coué y col., 1987; Spector y col., 1989; citado por Waskatsuki y col. 2000).



<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?D7=0&N5=Product%20No.%7C&N4=L5288%7CSIGMA&N25=0&QS=ON&F=SPEC> (Consultado 12 de septiembre 2009).

Fig. 7. Latrunculina B.

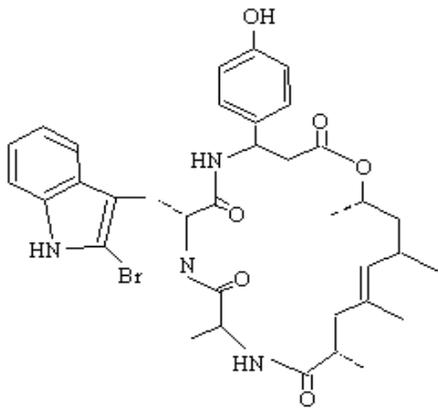
Se conocen distintas latrunculinas y en todas ellas destaca la presencia de un anillo macrocíclico unido a un anillo de tiazolidinona responsable de su actividad (ver fig. 4). En latrunculina B, existe una ausencia de 2 carbonos en el anillo macrocíclico causante de una menor citotoxicidad en dicha toxina; probablemente por pérdida de interacciones hidrofóbicas entre el anillo macrocíclico y la G-actina (Spector y col. 1989).

Las latrunculinas unidas a la G-actina actúan como cuñas entre los subdominios 2 y 4 provocando una restricción en los cambios conformacionales de la G-actina requeridos para su polimerización e integración en la F-actina; induciendo así la despolimerización de los microfilamentos al no tener disponibilidad de G-actina (Spector y col. 1989).

c) Jasplakinolide (Jpk)

Además de los compuestos ya mencionados, existen otros con la capacidad de estabilizar la F-actina o promover la polimerización de G-actina (Dieguéz 2008). Un ejemplo de ello es el compuesto Jasplakinolide (Jpk), que es un péptido cíclico natural producido por la esponja *Jaspis johnstoni*, tiene tanto actividad fungicida como anti-proliferativa (ver fig. 5), (Bubb 1994 y col; Kardos y col 2007).

El jasplakinolide es capaz de unir y estabilizar los filamentos de actina *in vitro*, además puede interrumpir los filamentos de actina e inducir la polimerización *in vivo* (Bubb 1994 y col; Kardos y col 2007).



<http://www.bms.ed.ac.uk/research/other/s/maciver/encyclop/Abp-j/jasplakinolide.htm> (Citado 22 de Octubre 2009).

Fig. 8. Estructura de Jaspakinolide.

El efecto del Jpk se debe a una notable mejora en la tasa de nucleación de filamentos de actina; aumento que corresponde a un cambio en el tamaño de oligómeros de actina que implica un crecimiento de los filamentos de aproximadamente de cuatro a tres subunidades, que es mecánicamente compatible con la localización de la jasplakinolide, que se une en una interfaz de tres subunidades de actina. El Jpk disminuye tanto la cantidad de actina secuestrada (al disminuir la concentración crítica de actina) y es capaz de mejorar la polimerización de los filamentos, acelerando la velocidad del paso de nucleación; ya que dicho secuestro de los monómeros de actina así como de la proteína timosina B4, amplifican la respuesta de nucleación (Bubb y col. 2000).

Trabajos como el de Kardos y col. (2007) señalan que uno de los parámetros cinéticos por el cual el Jpk induce la polimerización, es la afinidad con la que se une dicho compuesto a los filamentos de actina, siendo la constante de afinidad aproximadamente 15mM. Esta toxina puede disminuir la cantidad de monómeros de actina secuestrados disminuyendo la concentración crítica de la actina.

2.5. Modificación del volumen intracelular por efecto de cambios estructurales en F-actina

El citoesqueleto de actina esta presente en todos los tipos de células eucariotas, encontrándose que la actina es una de las proteínas más abundantes en estos organismos. Dentro de sus funciones fisiológicas encontramos su participación en la regulación del volumen celular y de forma contraria también se ha señalado que la organización del citoesqueleto se ve afectado por perturbaciones del volumen (Pedersen y col, 2001).

Cornet y col. (1988), estudiaron la relación entre el volumen de la célula y los F-actina en células de las líneas T2 y PC12, encontrando que durante la aparición de cambios en el volumen de la célula, se produce una modificación concomitante en la organización de los F-actina.

Adicionalmente, Hallows y col. (1991) al estudiar la relación entre el citoesqueleto y la respuesta regulatoria del volumen en células HL-60, encontraron que los cambios de volumen se relacionan de forma directa con los cambios en los filamentos de actina y no con la tonicidad del medio; indicando que cambios en la concentración global de la actina se producen durante cambios agudos en el volumen de la célula. Esta idea se vio apoyada por el trabajo de Cornet y col. (1993), quienes al estudiar el papel de los microtúbulos y microfilamentos en el transporte activo de iones durante el proceso de regulación de volumen, en células PC12; encontraron que la interrupción de la red de microfilamentos por citocalasina B, afecta significativamente la regulación del volumen en una manera dosis

dependiente, donde dicha toxina lleva a una potenciación de la inflamación inicial de la célula y se ve suprimida la disminución reguladora de volumen.

Estos resultados, apoyan fuertemente el planteamiento anterior sobre la existencia de una interacción directa entre la estructura del citoesqueleto de actina y la regulación del volumen celular. Sin embargo este proceso puede ocurrir por dos mecanismos distintos. Uno de ellos es un mecanismo de tensión, que implica la interacción coordinada de actina y proteínas asociadas a actina con todos los dominios de la membrana plasmática, donde el vínculo actina-membrana, restringiría el aumento de volumen celular en el proceso de entrada de agua.

Otro mecanismo por el cual la actina puede limitar la inflamación celular, es vía regulación de proteínas transportadoras de iones, activadas por el aumento del volumen celular. En este caso los F-actina participan como un componente esencial para la recuperación del volumen luego de una perturbación en el estado estacionario, regulando el número o la actividad de proteínas transportadoras de iones presentes en la membrana de la célula (Mills y col, 1994).

Una posible explicación al mecanismo de regulación que podrían ejercer los F-actina sobre la actividad de transporte, se basa en un sistema de interacción directa con el transportador, donde un cambio en la asociación del citoesqueleto con la proteína de transporte puede regular su actividad de forma ascendente o descendente (Bennett, 1988; citado por Mills y col, 1994).

Henson (1999) basándose en diversas investigaciones como las señaladas anteriormente, indicó que las relaciones estructurales y funcionales entre el

citoesqueleto de actina y los transportadores de membrana, se encuentran involucrados en la homeóstasis del volumen celular. De esta forma, la organización estructural del citoesqueleto acompaña a los cambios de volumen celular, estableciendo una dependencia con la respuesta regulatoria de volumen.

2.6. Relación entre la $[Ca^{2+}]_i$ y el volumen citoplasmático

Además de la relación existente entre el citoesqueleto de F-actina y la regulación del volumen celular, encontramos que el Ca^{2+} ha sido señalado frecuentemente como uno de los mecanismos de transducción que acopla las alteraciones en el volumen de la célula, con la activación de transportes de solutos regulatorios de volumen. Esta situación es de esperarse, ya que un cambio en la $[Ca^{2+}]_i$ es una rápida respuesta a una serie de estímulos celulares como factores de crecimiento, neurotransmisores, péptidos, hormonas y toxinas.

El Ca^{2+} ha sido implicado teniendo un efecto directo o papel participativo en numerosos procesos fisiológicos. Por lo tanto, sería sorprendente descubrir que el Ca^{2+} no presente participación en la regulación del volumen celular.

Distintos estudios han detectado un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ asociado con la inflamación osmótica de diversos tipos celulares. Las relaciones temporales entre la perturbación osmótica, los cambios en el volumen celular y la subsecuente respuesta regulatoria, puede ayudar a establecer si las elevadas $[Ca^{2+}]_i$ provocadas por la inflamación celular participan en la regulación del volumen (Foskett, 1994).

Para aclarar el planteamiento antes señalado, es importante destacar que las células además de ser capaces de mantener constante su volumen citoplasmático,

se encuentran dotadas de mecanismos que les permiten ajustar su volumen en medios anisotónicos. Cuando una célula se expone a un medio anisomótico la alteración en la osmolalidad extracelular causa la entrada o salida de agua a través de la membrana plasmática, con los consecuentes cambios de volumen celular.

Las células, dotadas de diversos mecanismos regulatorios, pueden retornar al volumen que tenían antes de la perturbación osmótica, esto a pesar de mantener de forma continua una solución o medio anisomótico. Esta propiedad regulatoria se debe a que los cambios de volumen activan mecanismos de transporte de solutos y vías metabólicas que alteran la concentración intracelular de solutos, reduciendo así el gradiente de presión osmótica y por lo tanto, restaurando el volumen de agua intracelular a los niveles previos al desafío osmótico (Álvarez y Reuss, 1996).

Fischer y col. (1997), encontraron que la exposición de un cultivo de astrocitos a un medio hipo-osmótico induce una respuesta bifásica del calcio citosólico, ocasionada por la liberación de Ca^{2+} desde reservorios intracelulares y la entrada de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática. Estos resultados apoyan la idea de una relación directa entre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y los cambios en el volumen intracelular.

Otra aparente consecuencia del aumento de Ca^{2+} citosólico, son los cambios en la distribución de F-actina reportado en células GH3, generando una disminución de los F-actina en la región cortical de la célula y un aumento en su interior; patrón que permaneció constante en presencia de citocalasina B, indicando una posible participación del Ca^{2+} como un control directo sobre los cambios del citoesqueleto (Yoneda y col, 2000). Posteriormente, Doussau y Augustine (2000), encontraron que

la mayoría de las proteínas de unión a la actina están reguladas por el Ca^{2+} , por lo cual la actina podría ser un participante fundamental en la señalización de este ión en terminales nerviosas presinápticas.

Considerando los resultados ya señalados, se han realizados recientes investigaciones evaluando la actividad del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en diversos tipos celulares donde esta proteína actúa como principal mecanismo regulador de Ca^{2+} , ión directamente asociado con variaciones de volumen citoplasmático (Rojas y col, 2008).

Reeves y col. (2008) investigaron la influencia que tiene el flujo de fluidos y los cambios de volumen inducidos osmóticamente sobre la actividad del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$; encontrando que la actividad del intercambiador se ve estimulada en medios hipo-tónicos e inhibidas en medios híper-tónicos, concluyendo que la actividad del intercambiador es modulada por el flujo y la osmolaridad de las soluciones capaces de inducir cambios en el volumen de la célula.

Por otro lado, Rojas y col. (2008), evaluaron el papel del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en la regulación de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ frente a un “stress” hipo-osmótico, es decir, el efecto de la osmolaridad sobre la actividad del intercambiador. En este trabajo se encontró, que existe un aumento en la actividad del intercambiador usando su modo reverso frente a un “shock” hipo-tónico y que además, se genera una respuesta antagónica en medio híper-tónico, donde disminuye la actividad del intercambiador. Esta situación evidencia una sensibilidad en la actividad del intercambiador, frente a cambios osmóticos.

Las evidencias señaladas previamente, indican que el Ca^{2+} desempeña un papel fundamental en la regulación del volumen celular, que a su vez se encuentra asociado a cambios en la estructura de los F-actina. En base a estos resultados, se puede argumentar que el mecanismo por el cual se produce un aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ frente a shock hipotónico, se debe a las alteraciones del citoesqueleto generadas por cambios en el volumen citoplasmático de astrocitos t-1 (Rojas y col, 2008). Sin embargo aun no está definido claramente este mecanismo, razón que motivo la presente investigación, donde se evalúa el efecto que tienen los cambios estructurales de los F-actina sobre la actividad del $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, que es el principal mecanismo regulador del Ca^{2+} total en astrocitos t-1.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

3.1.1. Determinar los cambios que ocurren a nivel del citoesqueleto y la actividad del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ presente en astrocitos t-1, cuando se exponen a un medio hipotónico.

3.2. Objetivos Específicos

3.2.1. Realizar cultivos primarios de células gliales con “alta purificación” de Astrocitos t-1, a partir de la región del vermis de cerebelo de ratas Sprague Dowley.

a) Determinar la presencia de Astrocitos t-1 mediante inmunomarcaje con GFAP y microscopia confocal.

b) Identificar los Astrocitos t-1 mediante test de Endotelina.

3.2.2. Evaluar el efecto que tienen los cambios estructurales de los filamentos de actina en un medio hipotónico, sobre el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$.

a) Determinar las variaciones en la $[\text{Ca}^{+2}]_i$ frente a cambios estructurales (polimerización y despolimerización) de los filamentos de actina en medios isotónico, hipotónico e hipertónico.

b) Realizar inmunomarcajes con citocalasina, latrunculina y jasplakinolide, en medio iso-tónico y análisis de imagen mediante microscopia confocal.

3.2.3. Relacionar el aporte de Ca^{+2} proveniente del retículo endoplasmático frente a la polimerización y despolimerización de filamentos de Actina, en medio hipotónico.

a) Evaluar mediante microscopia confocal posibles cambios en el aporte de Ca^{+2} proveniente del retículo endoplasmático frente a la despolimerización de filamentos de Actina.

4. MATERIALES Y METODOS

Microespectro-fluorimetría y perfusión

La microscopía de fluorescencia o microespectrofluorimetría es una técnica en la que se emplea un microscopio de fluorescencia, capaz de reconocer la emisión de luz que produce una molécula fluorescente luego de ser excitada y absorber luz de una longitud de onda menor a la emitida. La intensidad y el color de la luz emitida, es una propiedad característica de la molécula fluorescente utilizada (Fig. 9) (Reina, 2003).

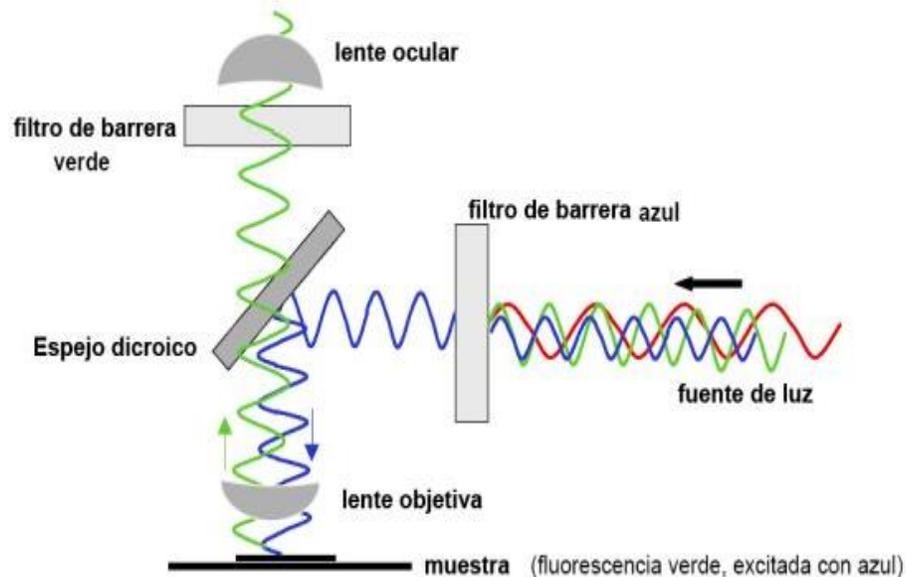


Figura 9. Esquema de funcionamiento de microscopio de epifluorescencia (Duarte 2007)

El equipo de microespectrofluorimetría y perfusión comprende tres unidades de trabajo acopladas: microscopio de epifluorescencia, sistema de perfusión PTR-2000 (controla la temperatura de las soluciones de perfusión) y el sistema de perfusión DAD-12 (controla la presión a la que se produce la perfusión extracelular).

En el microscopio de epifluorescencia, la luz atraviesa la muestra estudiada. Su función se basa en la propiedad de fluorescencia que tienen los fluorocromos utilizados para marcar estructuras celulares, destacándolas del resto de los elementos que componen la célula (Reina 2003; Duarte 2007)

El equipo de perfusión PTR-2000, tiene como principio básico mantener constante la temperatura del líquido dentro del tanque que fluye a través del tubo de aislamiento dinámico, donde disminuye parcialmente la temperatura y luego es retornado al tanque. A medida que fluye dentro del tubo de aislamiento dinámico se transfiere energía a los líquidos de perfusión que se encuentran en las tuberías de menor diámetro. El líquido en el tanque se mantiene alrededor de 43°C, sin embargo cuando el líquido fluye en el tubo dinámico de aislamiento disminuye su temperatura; permitiendo su regulación a una temperatura similar a la fisiológica. (ALA Sci. Inst. Inc. 1993a).

El DAD-12 es un sistema que controla las válvulas de perfusión por la gestión de un ordenador programable. La perfusión controla 12 canales, que aplican hasta 12 soluciones diferentes a una célula en particular, un grupo de células, o en una cámara. El control se realiza a través de un ordenador PC compatible, que regula la apertura y cierre de las válvulas, las secuencias de la válvula, la generación de pulsos de presión, los voltajes aplicados a las válvulas y el funcionamiento manual o automático. (ALA Sci. Inst. Inc. 1993b).

Debido a las características del equipo de microespectrofluorometría y perfusión, fue posible realizar experimentos modificando el medio extracelular de las

células en estudio, astrocitos t-1; donde se cambiaron de forma sucesiva las soluciones de perfusión de acuerdo a cada experimento: 4.1.2.b) Test de endotelina y 4.2.Determinación de la $[Ca^{2+}]_i$. En todos los casos se controló la temperatura a 36°C mediante el sistema PTR-2000 y la perfusión controlada de las soluciones se logró a través del equipo DAD-12. (Fig. 10).

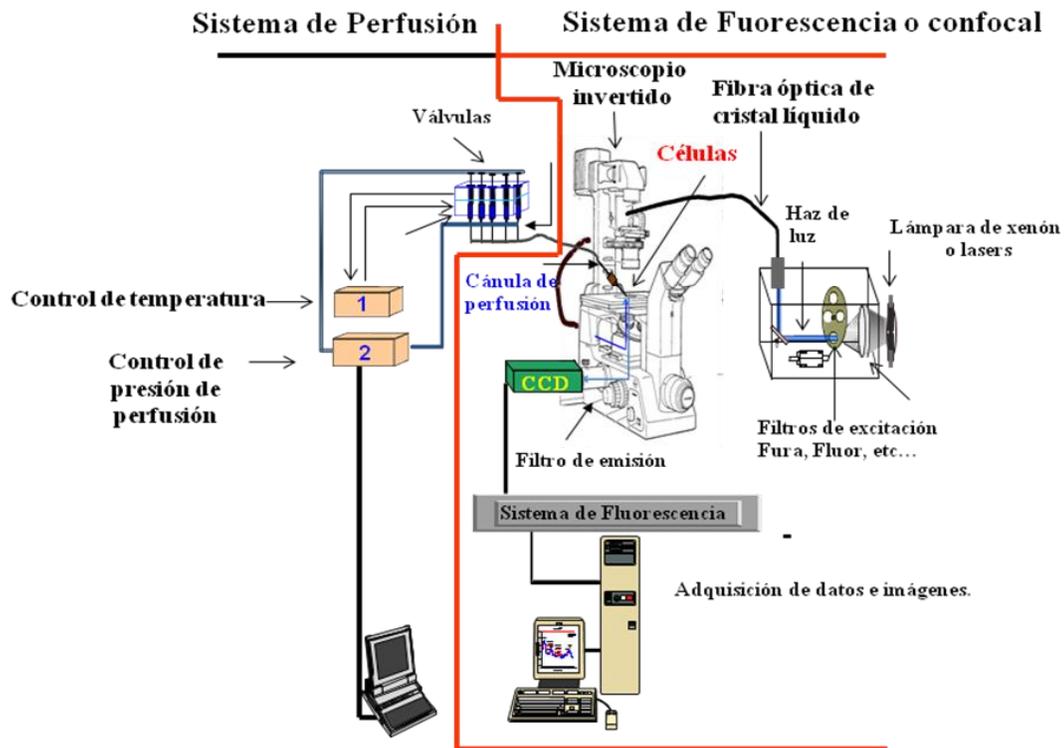


Figura 10. Diagrama esquemático del sistema de microespectro-fluorimetría y perfusión.

Microscopia confocal.

La microscopía confocal, es una técnica que permite el estudio de estructuras celulares, obteniendo una alta calidad de la imagen; ya que elimina mediante un diafragma (*pinhole*) el emborronamiento que produce la fluorescencia generada en las regiones ubicadas fuera del plano focal. Este diafragma convenientemente colocado delante del detector de la señal, bloquea la luz proveniente de las citadas

áreas fuera de foco; esto sucederá al iluminar cualquier otro punto que esté en el plano focal de la lente. (Montuenga y col. 2009). El sistema de microscopía confocal utilizado consta de un microscopio invertido Nikon Eclipse TE-2000-U, equipado con un objetivo Nikon 100/1.40 PlanApo VC, junto a una unidad de C1-LU2 laser de Neon (543 nm).

La detección de una imagen mediante microscopía confocal está asociada al uso de compuestos fluorescentes o fluorocromos, como en la microscopía de fluorescencia clásica, utilizada en la técnica de microespectrofluorimetría; sin embargo en ese caso, la imagen detectada presenta menor nitidez, debido a la ausencia del *pinhole*.

Es importante señalar que una de las técnicas realizadas fue la de escaneo de microscopía confocal por etapas (Stage Scanning Microscopy “SSCM”), donde se emplea un haz de láser fijo y la preparación se “rastrea” mediante la utilización de una platina motorizada en el microscopio, generando una adquisición lenta de imágenes (10 segundos por imagen adquirida, aproximadamente); por lo cual su uso se limitó a las preparaciones biológicas fijadas en los siguientes experimentos: 4.1.2.a) Identificación de células gliales y 4.3.a) Inmunomarcaje del Intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en condiciones de polimerización y despolimerización de los filamentos de actina.

Para el estudio de las $[\text{Ca}^{2+}]_i$, la técnica fue la de escaneo láser de microscopía confocal (Láser Scanning Confocal Microscopy “LSCM”), donde el barrido de la preparación se realizó moviendo el haz de láser, gracias a unos

espejos galvanométricos que permitieron modificar el punto de incidencia del haz de láser en la preparación. De esta manera se alcanzaron velocidades de adquisición cercanas a 5 imágenes/segundo, sin ser necesario el movimiento del espécimen durante el barrido, por lo que fué utilizada para el estudio de muestras vivas, como en el experimento de detección del movimiento de Ca^{2+} proveniente del ER en condición de despolimerización de filamentos de Actina.

4.1. Cultivo primario e identificación de Astrocitos t-1.

4.1.1. Cultivo Primario de Astrocitos.

El material biológico empleado fueron ratas Sprague-Dowley, neonatos de 4-7 días, cuya disección se realizó de acuerdo al método para disección de neuronas de rata de Mintz y col. (1993). El cultivo primario se realizó de acuerdo al protocolo para cultivo de astrocitos de rata de Lovelance y col. (2003). Posteriormente se realizaron los siguientes pasos:

Solución I. Alto Na^+ /Alto K^+ (100 mL).

Los reactivos fueron diluidos uno a uno en 100mL de agua Bi-destilada, manteniendo en agitación constante y controlando el pH entre 7,3-7,4 a 290mOsm.

Tabla 1. Reactivos para solución Alto Na^+ /Alto K^+

Reactivos	g	[mM]
Na_2SO_4	1,1562	81,4
K_2SO_4	0,5226	30
$\text{MgCl}_2+6\text{H}_2\text{O}$	0,1179	5,8
Hepes	0,2383	10
Glucosa	0,4041	20,4
Rojo Fenol	0,200	0,5%

Solución II. Tyrode Normal (100mL).

Se añadieron uno a uno los reactivos en un beacker con 100mL de agua bidestilada, manteniendo en agitación constante, pH 7,3-7,4 y 290mOsm.

Tabla 2. Reactivos para solución Tyrode Normal

Reactivos	g	[mM]
NaCl	0,8660	150
KCl	0,0290	4
MgCl ₂ 6H ₂ O	0,0609	3
Hepes	0,2383	10
Glucosa	0,1981	10

Medio de Cultivo

Se utilizó 1L de agua bidestilada con 3,7g de Bicarbonato de sodio (Na₂CO₃), formándose una solución buffer, en la cual se diluyó un sobre de Dulbecco's Modified Eagle's Médium. Seguidamente se filtró y se llevó el pH entre 7,2-7,3.

Solución Enzimática

Fueron pesados 15mg de Proteasa (tipo XIII, Sigma Co., MO) y añadidos a 5mL de la Solución Alto Na⁺/Alto K⁺, (3mg/mL). Finalmente la solución se filtró y permaneció durante 10min entre 35-37°C.

Solución para triturado.

A 5mL de solución Tyrode fueron añadidos 4mg de Albúmina de Suero Bovino (BSA) (1mg/mL, Sigma Co., MO) y 4mg de inhibidor de tripsina (1mg/mL soybean) Tipo 1-S, Sigma Co., MO). Se ajustó el pH entre 7,3-7,4 con NaOH, se filtró y mantuvo a 35-37 °C.

Solución de lavado

Se emplearon 20mL de solución Tyrode y se midió el pH, que debe estar entre 7,3-7,4, de filtró y se mantuvo la solución entre 35-37°C.

Solución para disección del tejido.

Se emplearon 20mL de la Solución Alto Na⁺/Alto K⁺ fría, a una temperatura entre 0-4°C.

- Se prepararon todas las soluciones señaladas anteriormente.
- Se enfrió a -20°C la solución para disección (sin llegar a congelación) y una placa de Petri, que fue utilizada para colocar la fracción de cerebelo (vermis) luego de ser aislada.
- La rata fue sacrificada, luego se extrajo el cerebelo y se colocó en la placa de Petri con la solución para disección, se aisló y fragmentó el vermis.
- Los fragmentos del vermis se añadieron a la solución enzimática por 5 minutos a 37°C y se resuspendió. Luego que el tejido sedimentó, fue separado del sobrenadante y se añadió a la solución para triturado por 5min, donde se continuó la disgregación mecánica. Se descartó el sedimento y el sobrenadante se trasvasó a un tubo para ser centrifugado a 2000rpm por 4min. Posteriormente se retiró el sobrenadante y se añadieron 5mL de la solución para lavado, utilizada para resuspender el sedimento. Este proceso de lavado se realizó un total de 3 veces.

- Los 5mL restantes de la solución de lavado se emplearon para resuspender el sedimento y sembrar en frascos Falcon, que fueron llevados a incubación por 15 minutos; para luego incorporar aproximadamente 15mL del medio de cultivo y llevar nuevamente a incubación, donde permanecieron los siguientes días (durante este lapso se realizó una observación diaria del cultivo).
- Después de 3 días de haber realizado el cultivo se cambió el medio; para ello se retiró el volumen contenido en el frasco de cultivo y se agregaron 15mL de medio de cultivo fresco, y se mantuvo en incubación. El cambio de medio se realizó cada 3-5 días.
- El día 15, los frascos de cultivo se colocaron en un agitador por un periodo de 24h continuas a 37°C, una vez finalizado este lapso se cambió el medio y luego se llevó nuevamente a la incubadora.
- El día 17 se realizó el pase de células a los cubre-objetos de vidrio de 5x3cm, previamente preparados con Poli-L-lisina (100µg/mL, Cat. #1524, Sigma Co., MO). Las láminas se colocaron en placas de 35mm de diámetro y se cubrieron con medio DMEM (que contenía 70ng/mL de factor de crecimiento, mNGF grado II, Alomone Labs., Jerusalén); finalmente se trasladaron a incubación a 37°C y 5% CO₂, hasta el momento de ser utilizados.

4.1.2. Métodos para identificación de Astrocitos t-1.

a) Marcaje de Glías con GFAP (Identificación Inmunológica).

Este método de identificación se llevó a cabo mediante “inmunomarcaje de tipo indirecto”, basado en la aplicación de un anticuerpo primario específico para una estructura antigénica del tejido; que es reconocido por un segundo anticuerpo, secundario, que se encuentra unido a un marcador. Es importante señalar que el anticuerpo primario utilizado fue el anti-GFAP, específico para el reconocimiento de la proteína acida fibrilar de la glía o GFAP; por lo cual fue utilizado para la identificación de este tipo celular. El anticuerpo secundario, FITC conjugado, se encuentra unido al fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC), cuya absorción máxima es de 490-495nm, emitiendo un color característico a 517nm. Los pasos a seguir para esta inmunodetección son:

Anti-GFAP (antiglial fibrillary acidic protein) anticuerpo monoclonal (1:1000). (Cat. Num: G9269, Sigma Aldrich).

Anti-Rabbit IgG (Whole Molecule) FITC Conjugate. (Cat. Num: F0382, Sigma Aldrich)

- Inicialmente se lavó el cultivo con solución PBS y luego se agregó metanol frío (-20°C) sobre la placa con células, manteniendo en frío durante 5 minutos (Fijación).

- Se realizó el lavado del cultivo empleando PBS y posteriormente se fijaron las células con 100µL de glutaraldehído al 25%, que se mantuvo por 15 minutos a temperatura ambiente.
- Se añadió albumina 3% a temperatura ambiente, durante 15 minutos, seguido de un lavado con solución PBS.
- Posteriormente se incorporó el anti-GFAP, que se mantuvo durante 3 horas a temperatura ambiente; luego de este tiempo se retiró el anticuerpo y se realizó lavado con solución PBS.
- Finalmente se añadió el anticuerpo secundario FITC que permaneció durante 1 hora a temperatura ambiente y luego se retiró, concluyendo el marcaje con lavados de solución PBS.

Nota: Cada paso de lavado donde se empleó solución PBS se realizó un total de 3 veces.

b) Test de Endotelina (Identificación Farmacológica).

Esta prueba permitió la identificación de astrocitos t-1, ya que el péptido endotelina-3 (EDT-3) induce un incremento bifásico en la $[Ca^{2+}]_i$, característico de este tipo celular y ausente en astrocitos t-2 (Supattapone y col. 1989, citado por Rojas y col. 2004). La EDT-3 es un péptido de 21 aminoácidos que induce la liberación de Ca^{2+} desde reservorios intracelulares, incrementando la $[Ca^{2+}]$ en el citoplasma.

Las células utilizadas en este experimento fueron tratadas previamente con el indicador fluorescente Fura-2, el cual varía su espectro de absorción o excitación en función de la $[Ca^{2+}]_i$, ya que en presencia de este catión se produce la máxima fluorescencia a una longitud de onda de 340nm y en su ausencia se produce a una longitud de onda de 380nm. El espectro de emisión se mantiene invariable a una longitud de onda de 510nm. Posteriormente se procedió a ubicar las células en el sistema de perfusión donde se añadió la solución extracelular Tyrode, la cual presenta una composición equivalente a las condiciones *in vivo* de los astrocitos. Seguidamente se realizó una segunda perfusión con una solución compuesta por Tyrode y EDT-3 50nM (EDT-3 American Peptide Co.), luego de este paso se realizaron sucesivas perfusiones utilizando cada una de las soluciones presentadas en la tabla 3, para evaluar la actividad del NCX2, de acuerdo a trabajos previos como el de Rojas y col. (2004).

Tabla 3. Reactivos para soluciones de Perfusión Extracelular en Test de endotelina

	Tyrode 2Ca ⁺² (Na2Ca)	0Na2Ca	Na0Ca	0Na0Ca
Reactivos	[mM]	[mM]	[mM]	[mM]
NaCl	150	-	150	-
LiCl	-	149,09	-	149,09
KCl	4	4	4	4
MgCl ₂ 6H ₂ O	3	3	5	5
CaCl ₂ H ₂ O	2	2	-	-
Hepes	10	10	10	10
Glucosa	11	-	-	-
EGTA	-	-	0,1	-

4.2. Determinación de $[Ca^{2+}]_i$

La determinación de $[Ca^{2+}]_i$ se llevó a cabo en astrocitos t-1, cargados previamente durante 45 minutos (34-36 °C) con el marcador fluorescente Fura-2/AM

disuelto en la solución Tyrode (Rojas y col. 2008). La concentración final para el fluoróforo fué 8µM. Posteriormente se prepararon soluciones de tipo iso, hipo o hiper-osmótica con citocalasina, latrunculina o jasplakinolide, de acuerdo al experimento a ser realizado (ver tabla 4); estas soluciones fueron colocadas en las válvulas de perfusión. Los cubreobjetos con las células cargadas fueron colocados en una cámara experimental abierta (RC-27, Instrumentos Warner Corp., Hamden, CT), montado en un microscopio invertido Eclipse T300 Nikon (Japón), conectado a un HyperSwitch, aparato para imágenes de fluorescencia (IonOptix Co., Milton, MA).

Tabla 4. Toxinas para polimerización y despolimerización de actina.

Toxina	[mM]	Solución	Tiempo de incubación
Citocalasina D (SIGMA, de <i>Zygosporium</i>)	10	Tyrode	15min
Latrunculina B (SIGMA, <i>Negomata</i>)	10	Tyrode	15min
Jasplakinolide	10	Tyrode	15min

Los cambios de solución por perfusión extracelular, se realizaron por acción de una bomba peristáltica a un flujo de 1mL/min (36°C) con solución Tyrode estándar pH 7,4 (ver tabla 3). La osmolaridad fue ajustada 300± 1,5 mOsm/l. Las soluciones extracelulares se presentan en la tabla 5.

Tabla 5. Reactivos para soluciones de Perfusión Extracelular

Reactivos	Iso (300mosm/l)		Hipo (230mosm/l)				Híper (400mosm/l)		
	NaCa	Na0Ca	NaCa	0Na0Ca	Na0Ca	0NaCa	NaCa	0Na0Ca	0NaCa
NaCl	100	100	100	0	100	0	100	0	0
KCl	4	4	4	4	4	4	4	4	4
MgCl ₂ ·6H ₂ O	3	5	3	5	5	3	3	5	3
CaCl ₂ ·2H ₂ O	2	0	2	0	0	2	2	0	0
Hepes	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Glucosa	11	11	11	11	11	11	11	11	11
Manitol	63	63	0	197	0	197	197	360	360

Todas las concentraciones son en mM. pH= 7,4. Temperatura 36°C.

Siguiendo el protocolo de Rojas y col (2003), el control y soluciones de prueba fueron liberadas cerca de las células (200µm), con control de temperatura a través de la eyección a presión de una pipeta carbonatada (I.D. 100µm), mediante un sistema de perfusión DAD-12 (Adam and List Associates, Westbury, NY). Este dispositivo permitió a una computadora controlar los cambios de las diferentes soluciones experimentales tan rápido como en 20ms (medido por el cambio de resistencia de un microelectrodo colocado cerca de la punta de la cánula de perfusión; después de la perfusión con una solución Tyrode diluida). El sistema DAD conectado a un dispositivo regulador de temperatura (PTR-2000 Adam and List Associates), permitió el control preciso de la temperatura de las soluciones de perfusión extracelular en la punta de la cánula de perfusión.

Las imágenes obtenidas fueron digitalizadas y analizadas usando el software IonOptix. Las $[Ca^{2+}]_i$ se calcularon de acuerdo a la fórmula:

$$[Ca^{2+}]_i = K \times (R - R_{min}) / (R_{max} - R) \times Sf_2 / Sb_2.$$

Donde R es la relación entre la fluorescencia medida. Los valores de R_{max} , R_{min} y las constantes Sf_2/Sb_2 fueron calculados in vitro utilizando la relación CaEGTA/EGTA de las variables, para dar diferentes $[Ca^{2+}]_s$. La constante de disociación (K) Fura-2 para el complejo Fura- Ca^{2+} utilizada fué 225 nM. Todos los cálculos y gráficos fueron manejados con los programas Origin (Origin Lab. Corp., Northampton, MA) y SigmaPlot (SPSS Inc., Chicago, IL).

4.3. Identificación del Intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y detección de la señal de Ca^{2+} mediante microscopía confocal.

a) Inmunomarcaje del Intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en condiciones de polimerización y despolimerización de los filamentos de actina.

En este protocolo se utilizaron las toxinas de actina: latrunculina, citocalacina y jasplakinolide; para ello no se modificaron las concentraciones y el tiempo de acción de cada compuesto, registrados en la tabla 4. Adicionalmente se realizaron dos marcajes, el primero de tipo directo, para identificación de los filamentos de actina y el segundo marcaje de tipo indirecto para la identificación del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.

En el marcaje directo, se empleó Alexa Fluor 488 faloidina, que es una sonda de alta afinidad por la actina, derivada de una toxina de hongo conjugada con el colorante fluorescente verde Alexa Fluor 488.

El marcaje indirecto empleo como anticuerpo primario el MA3-926 intercambiador sodio/calcio (sodium/calcium exchanger), anticuerpo monoclonal IgM, purificado a partir del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ canino; este reconoce un epítipo entre los aminoácidos 371-525 que se encuentran en el loop intracelular del intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.

Alexa fluor 546 goat anti-mouse IgM, es el anticuerpo secundario; marcado con el brillante y fotoestable, tinte fluorescente naranja Alexa Fluor 546; responsable de la emisión de sondas fluorescentes en la región naranja del espectro. Este conjugado fluorescente es fácilmente excitado con una absorción a 546nm y emisión

a 573nm, además se considera que los conjugados de Alexa Fluor son más fotoestables que la mayoría de los conjugados, lo que permitió más tiempo para la captura de imágenes debido a su fluorescencia, que es capaz de mantenerse en un amplio rango de pH.

- Se lavaron 2 placas con células con solución PBS. Una de ellas fue utilizada como control (a) y la segunda como medio experimental (b).
- A la placa “a” se le añadió solución Iso (Tyrode normal, ver tabla 3) y a la placa “b” se le agregó una mezcla de toxina + solución Iso, ambas condiciones se mantuvieron por 15min.
- Se agregó paraformaldehído al 3% en PBS, sobre las placas “a” y “b”, manteniendo a temperatura ambiente durante 10 minutos (Fijación).
- Se realizaron lavados de ambas placas (a y b), empleando PBS y posteriormente se fijaron con Tritón X-100 (-20°C) durante 4 minutos. Se realizaron lavados con PBS.
- Se añadió albumina al 2% en PBS, manteniendo durante 15 minutos y luego se lavo con solución PBS. Posteriormente se añadió el marcador conjugado Alexa Fluor Faloidina 488 (1mM), manteniendo durante 30 minutos.
- Una vez retirado el anticuerpo Alexa Fluor faloidina 488, se realizaron lavados con PBS y se colocó el anticuerpo Monoclonal (MA3-926) durante 2 horas a temperatura ambiente. Se repitieron los lavados con PBS.

- Finalmente se incorporó el fluoróforo Alexa Fluor 546 goat-anti-mouse IgM durante 30 minutos y luego de este periodo se procedió a repetir los lavados con solución PBS. Culminado este tiempo se realizaron lavados con PBS.

Nota: Cada paso de lavado donde se emplea solución PBS se realiza un total de 3 veces.

b) Determinación del aporte de Ca^{2+} proveniente del ER frente a la despolimerización de los F-actina.

Inicialmente se procedió a cargar las células con Rhod-2/AM (10 μ M) diluido en solución Tyrode, donde permanecieron durante 2 horas a 37°C en la incubadora. Es importante señalar que el Rhod-2/AM es un indicador de Ca^{2+} que tiene una longitud de onda de excitación de 552nm y emisión a 582nm. El Rhod-2 muestra una mejora de la fluorescencia en unión con Ca^{2+} pero no un cambio en la longitud de onda que es utilizada para medir la relación con el Ca^{2+} ; además presenta un Kd relativamente alta, cercana a 1000nM, que permite a Rhod-2 ser sensible a [Ca^{2+}] por lo menos hasta 10 μ M (Thomas y Delaville 1991, citado por McCormack y Cobbold 1991).

Luego del periodo de incubación con Rhod-2, el cubre-objeto con las células cargadas se colocó en una cámara abierta de perfusión en la zona de barrido del láser del microscopio confocal (LSCM, Nikon C1), montado en un microscopio invertido Nikon Eclipse TE-2000-U, equipado con un objetivo Nikon 100/1.40 PlanApo VC, junto a una unidad de C1-LU2 láser de Neon (543 nm). Posteriormente se continuó el experimento realizando una primera fase de perfusión con solución

iso-NaCa durante 2 min y luego se realizo perfusión con una solución iso-NaCa con Latrunculina B (10 μ M). La detección de la señal de Ca^{2+} se llevo a cabo usando la técnica de escaneo láser de microscopía confocal; descrito al inicio de la metodología en la sección de microscopía confocal, donde las $[\text{Ca}^{2+}]_s$ fueron monitoreadas en células individuales usando tiempos de escaneo en microscopía confocal.

5. RESULTADOS

5.1. Identificación inmunológica de astrocitos t-1.

La figura 11-a muestra dos imágenes obtenidas mediante microscopía confocal luego del inmunomarcaje con anti-GFAP y FITC, marcadores que realizan un reconocimiento específico para la GFAP (proteína ácida fibrilar glial) presente en astrocitos. En la imagen del extremo izquierdo se observan abundantes células unidas por ramificaciones del citoplasma, todas con coloración verde debido a la afinidad del FITC por el anti-GFAP; del lado derecho se observa la morfología de un astrocito t-1 con abundante citoplasma y largas prolongaciones. En la figura 11-b no se muestra coloración en las células, ya que la imagen representa un control (en ausencia del anticuerpo específico de GFAP), que evalúa la especificidad del marcador por el anticuerpo y permite discernir si la abundancia en la coloración se debe a la obtención de un cultivo primario con alta purificación de astrocitos, o si es producto de una baja especificidad del marcador por el anticuerpo que induce a un marcaje en todas las células.

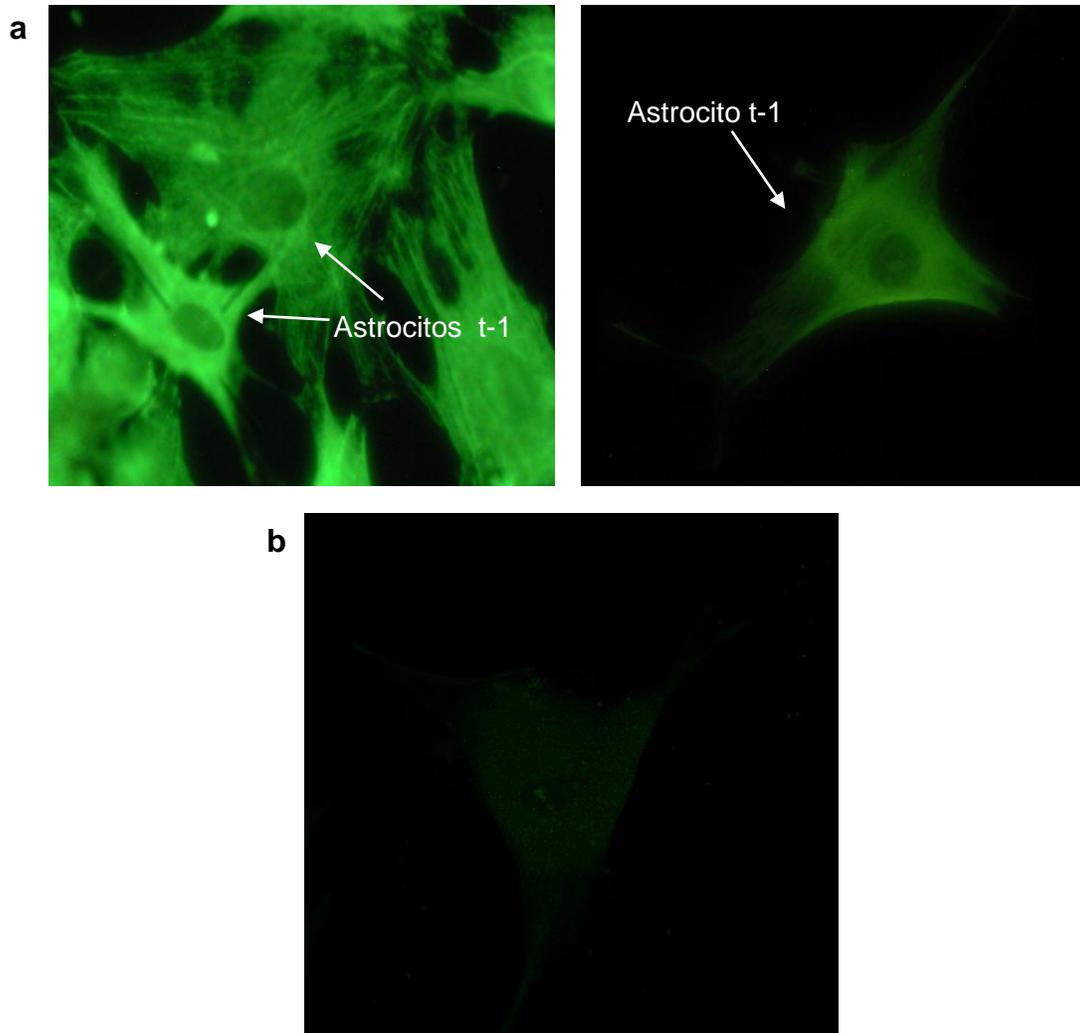


Figura 11. Marcaje por inmunofluorescencia de GFAP. a) Astrocitos t-1, células con forma poligonal, aplanada y abundante citoplasma. Coloración verde por emisión de fluorescencia de FITC. b) Control del inmunomarcaje en ausencia del anticuerpo específico de GFAP en glías (anti-GFAP).

5.2. Identificación farmacológica de astrocitos t-1, prueba de endotelina-3 (ET-3).

Los resultados presentados en esta sección, corresponden a los experimentos de identificación farmacológica para astrocitos t-1 o prueba de endotelina-3, donde la presencia de dicho péptido induce un incremento bifásico en la $[Ca^{2+}]_i$ de astrocitos t-1; razón por la que esta prueba fue empleada como segunda

vía de identificación para este tipo celular, permitiendo corroborar la presencia o no de estas células.

Cabe destacar que todas las soluciones utilizadas en los experimentos de la prueba de EDT-3 fueron de tipo iso-osmóticas, variando en su composición debido a la ausencia o no de los iones Na^+ y Ca^{2+} ; dichos cambios fueron identificados en los resultados con una flecha, como se presenta en las figuras 12, 13 y 14.

La Fig. 12 corresponde al primer tipo de experimento realizado con EDT-3, donde se busco identificar el efecto de dicho péptido sobre el nivel de calcio citosólico en una condición similar a la *in vivo*; razón por la que inicialmente se incorporo el medio Na_2Ca (Tyrode, Ca^{2+} 2 mM, ver métodos) que tiene una composición se similar a las condiciones fisiológicas estándar, encontrando que este medio no induce variaciones en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Posteriormente la incorporación del péptido EDT-3 (50 nM) produce un incremento en la señal de Ca^{2+}_i , evidenciando que el cambio en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es una respuesta a la presencia del péptido, comportamiento típico de los astrocitos t-1.

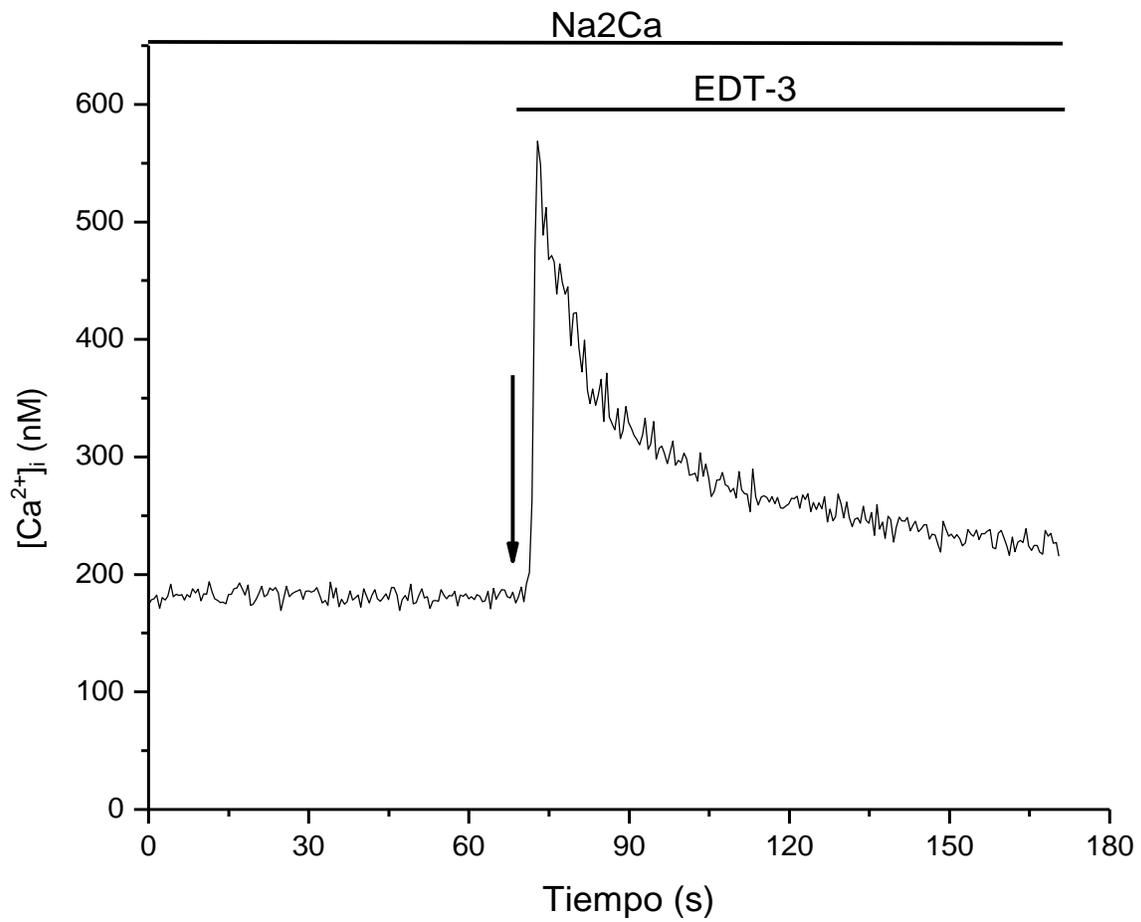


Figura 12. Efecto de la EDT-3 sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en astrocitos t-1. En solución normal no se ven cambios en la concentración de Ca^{2+} . Al agregar el péptido (flecha) este produce un aumento en el Ca^{2+}_i que luego decae lentamente hasta un valor mayor que la línea de base.

En función de los resultados anteriores, donde se generó un incremento en la señal de Ca^{2+}_i que coincide con el comportamiento típico de los astrocitos t-1 ante el péptido EDT-3; se plantearon experimentos para identificar la participación del NCX que es el principal mecanismo regulador de Ca^{2+} en este tipo celular. El resultado de uno de estos experimentos está representado por la Fig. 13, donde inicialmente al incorporar EDT-3 al medio Na2Ca se produce un aumento bifásico en la $[Ca^{2+}]_i$, posteriormente en la figura se muestra la participación que tiene el ión Na^+ sobre la restauración de la $[Ca^{2+}]_i$; encontrando que en presencia de Na^+_e y a pesar de la ausencia de Ca^{2+}_e (medio Na0Ca) se indujo un rápido descenso en la $[Ca^{2+}]_i$ que restablece el nivel basal de este ión.

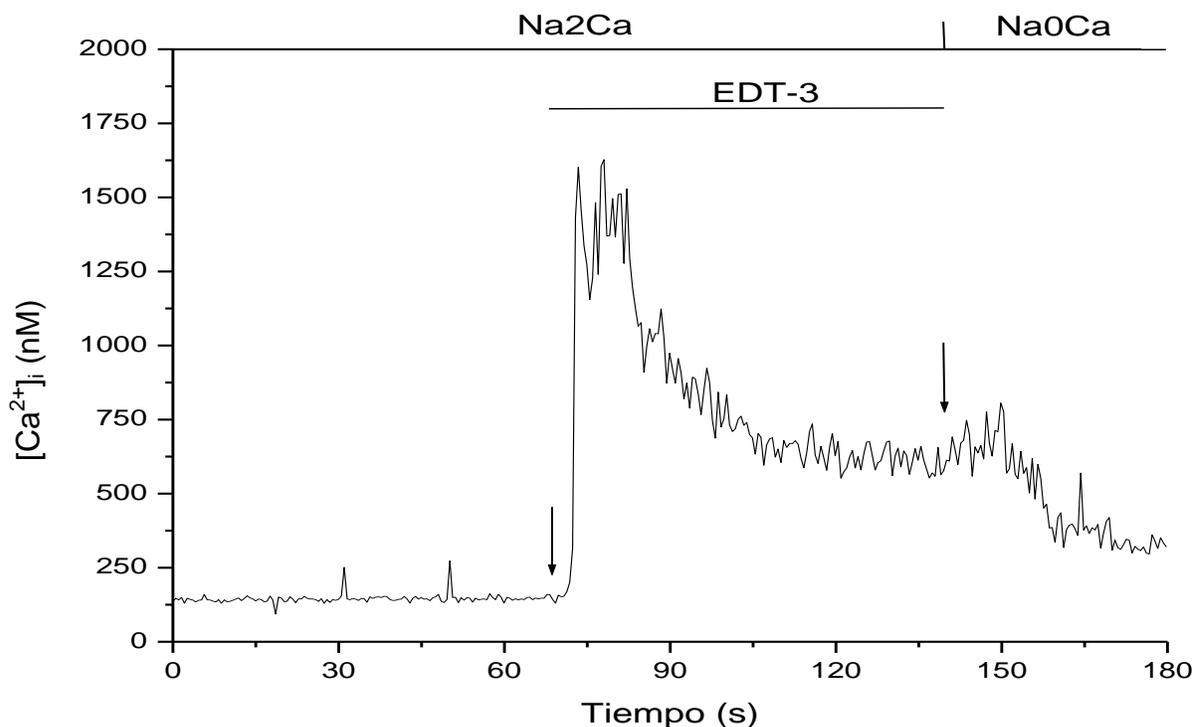


Figura 13. Efecto del Na^+ en la restauración de la $[Ca^{2+}]_i$ en astrocitos t-1 estimulados con EDT-3. En solución normal medio Na2Ca no se ven cambios en la concentración de Ca^{2+} . Al agregar el péptido (flecha) se produce un aumento del Ca^{2+}_i que luego decae lentamente hasta un valor mayor que la línea de base. El medio Na0Ca (libre de Ca^{2+}_e), activa el modo directo del NCX restaurando el Ca^{2+}_i .

Finalmente la Fig. 14 es el resultado de un tercer tipo de experimento, que evaluó la participación del NCX en la regulación de Ca^{2+}_i en astrocitos t-1 estimulados con EDT-3. Inicialmente se busco identificar si el aumento de Ca^{2+}_i frente a EDT-3, depende de la activación del NCX en modo reverso; razón por la que se inhibió la actividad en modo directo y reverso de dicho contra-transportador, con el medio 0Na0Ca (libre de Na^+ y Ca^{2+}) con EDT-3, donde se observa un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ que posteriormente decae hasta restablecer los niveles de Ca^{2+} inicial. La incorporación de un medio extracelular Na0Ca que activa el modo directo del NCX, genera la disminución de la $[Ca^{2+}]_i$ manteniendo la homeóstasis intracelular. En presencia de Ca^{2+} y en ausencia de Na^+ ocurre un rápido ascenso en la $[Ca^{2+}]_i$, indicando la activación del reverso del intercambiador, esta concentración disminuye rápidamente en un medio Na0Ca hasta restablecer la $[Ca^{2+}]_i$ inicial, este cambio indica la activación del NCX en sentido directo.

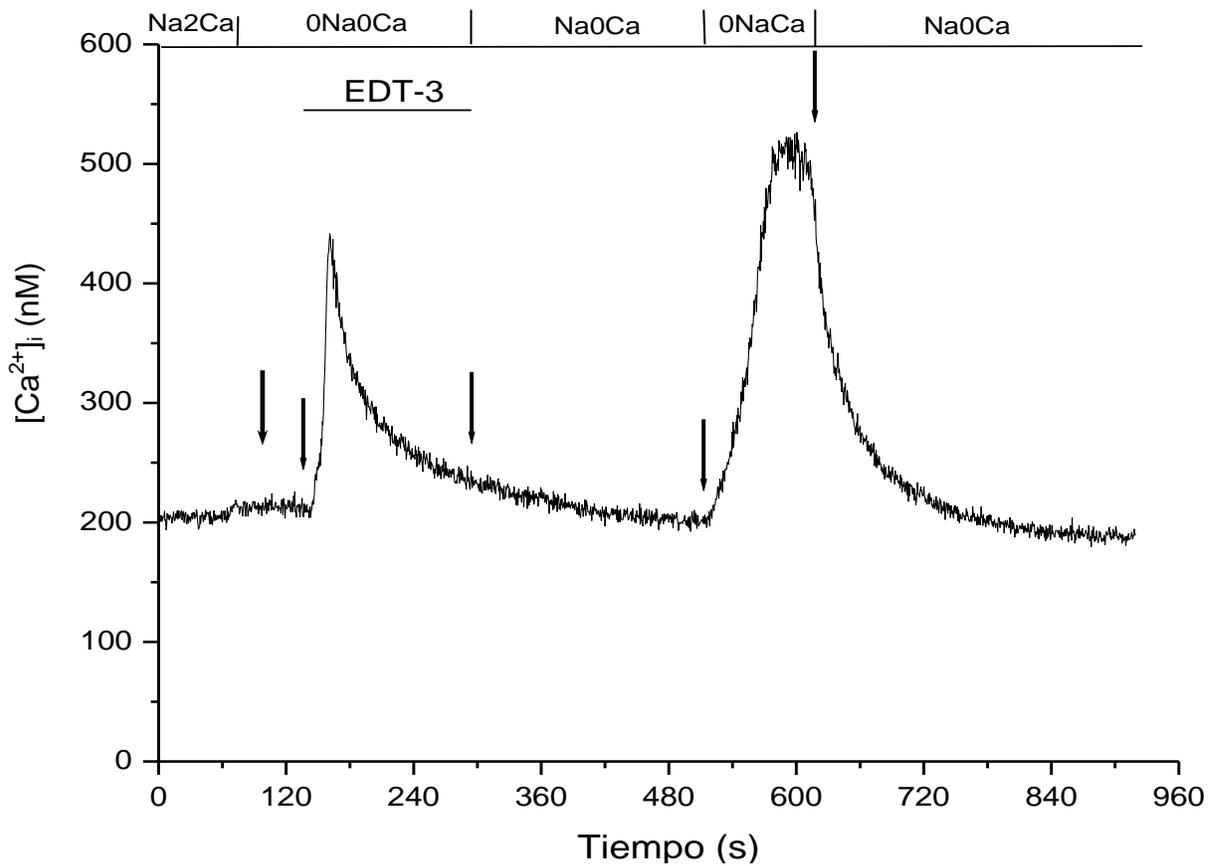


Figura 14. Participación del NCX en la restauración de la $[Ca^{2+}]_i$ en astrocitos t-1 estimulados con EDT-3. Na₂Ca (Tyrode): control de Ca^{2+} basal. 0Na0Ca (libre de Na^+ y Ca^{2+}): inhibe al NCX y actúa como control del medio en ausencia de EDT-3. 0Na0Ca con EDT-3: muestra el efecto del péptido bajo inhibición del NCX. Na0Ca (libre de Ca^{2+}): evaluación de la actividad directa del NCX y restauración de nivel del Ca^{2+}_i . 0NaCa (libre de Na^+): evaluación de actividad reversa del NCX.

5.3. Efecto de la hipo-osmolaridad sobre la actividad del Intercambiador Na⁺/Ca²⁺.

Luego de determinar la presencia de los astrocitos t-1 en los cultivos celulares, se procedió a realizar los experimentos en condiciones de hipo-osmolaridad, con el fin de evaluar su efecto sobre los niveles de Ca²⁺_i y en consecuencia sobre la actividad del NCX.

En los experimentos representados por la figura 15 se realizaron cambios sucesivos de soluciones. Solo se realizó un cambio osmótico, pasando de un medio iso-tónico a un hipo-tónico, condición que se mantuvo hasta el final del experimento modificando las concentraciones de Na⁺, como se indica desde la primera flecha.

En la figura 15 no se observan variaciones en la [Ca²⁺]_i frente a un medio iso-osmótico, posteriormente se observó un incremento de la [Ca²⁺]_i cercano a 200-210 nM respecto al nivel basal, causado por la exposición de la célula a un medio hipo-osmótico 0Na0Ca (libre de Na⁺ y Ca²⁺), este efecto se invierte en presencia del medio hipo-Na0Ca donde la [Ca²⁺]_i retorna a su nivel inicial (aprox. 140 nM) consecuencia de la activación del modo directo del NCX debido a la presencia de Na⁺ extracelular.

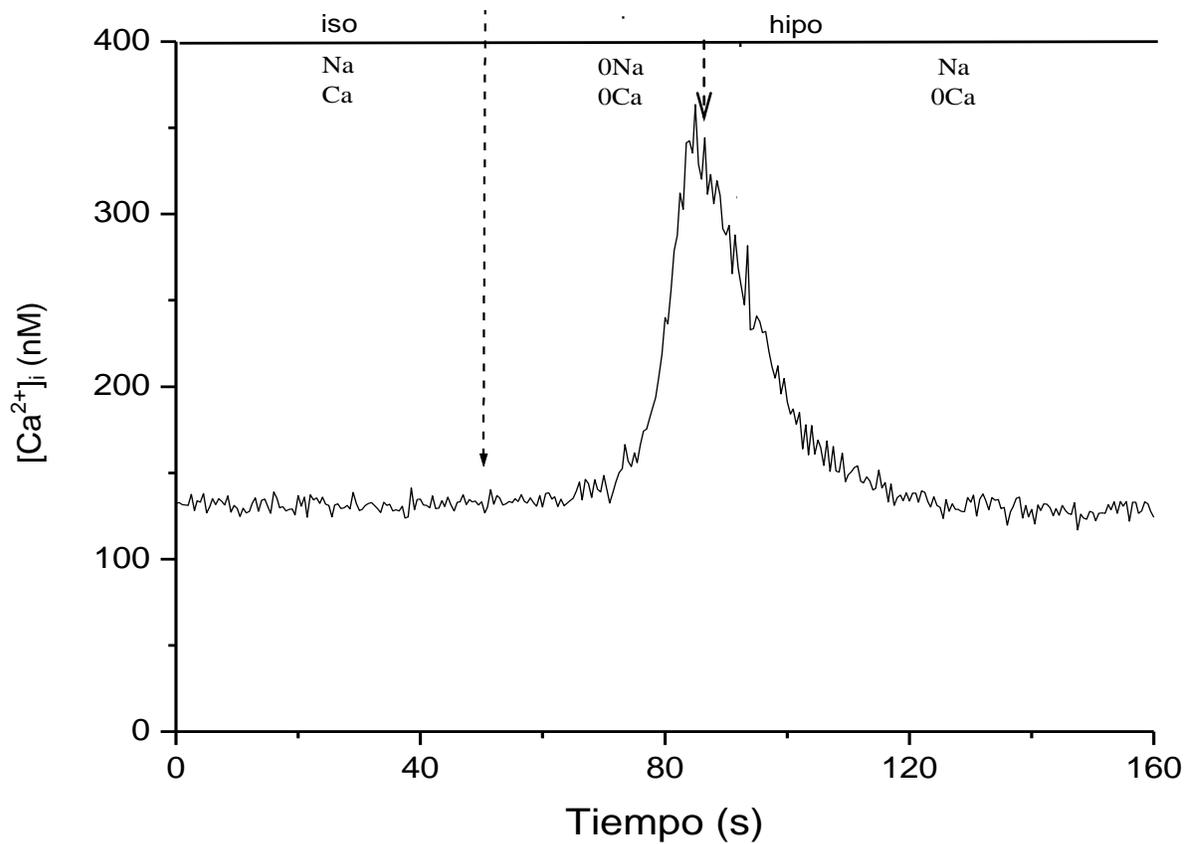


Figura 15. Efecto de la hipo-tonicidad sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en astrocitos t-1. Medios extracelulares: Iso-NaCa (iso-osmótico con Na^+ y Ca^{2+}): mantiene la $[Ca^{2+}]_i$ basal; hipo (hipo-osmótico): hipo-0Na0Ca (libre de Na^+ y Ca^{2+}): bloquea la actividad del NCX en modo directo y reverso, hipo-Na0Ca (libre de Ca^{2+}): Evalúa la dependencia entre la $[Ca^{2+}]_i$ y el Na^+ externo.

5.4. Efecto de la polimerización y despolimerización de los F-actina de astrocitos t-1, sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en medios: iso-osmótico, hipo-osmótico e hiper-osmótico.

Una vez conocido el efecto de la hipo-osmolaridad sobre los niveles de Ca^{2+}_i en astrocitos t-1, se realizaron una serie de experimentos donde se modificaron las condiciones osmóticas y se incluyeron toxinas despolimerizantes (Citocalasina D y Latrunculina B) y/o polimerizante (Jasplakinolide), para evaluar si las alteraciones en la estructura de los F-actina están asociados a los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ y en consecuencia la actividad del NCX, quien es el principal mecanismo regulador de dicho ión en astrocitos t-1.

Las células fueron sometidas a condiciones alternas entre medios iso-osmótico, hiper-osmótico e hipo-osmótico, de diferente composición (0Na0Ca, 0NaCa y Na0Ca).

a) Efecto de la Citocalasina D.

En la figura 16 se muestra que en presencia de un medio iso-osmótico conteniendo Na^+ y Ca^{2+} , la Citocalasina D (10 μ M, durante 10 min) no afecta los niveles de Ca^{2+}_i ; sin embargo la exposición del astrocito t-1 a un medio hipo-osmótico (0Na0Ca), produce un gran incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ asociado a una posible depleción de los reservorio de Ca^{2+}_i .

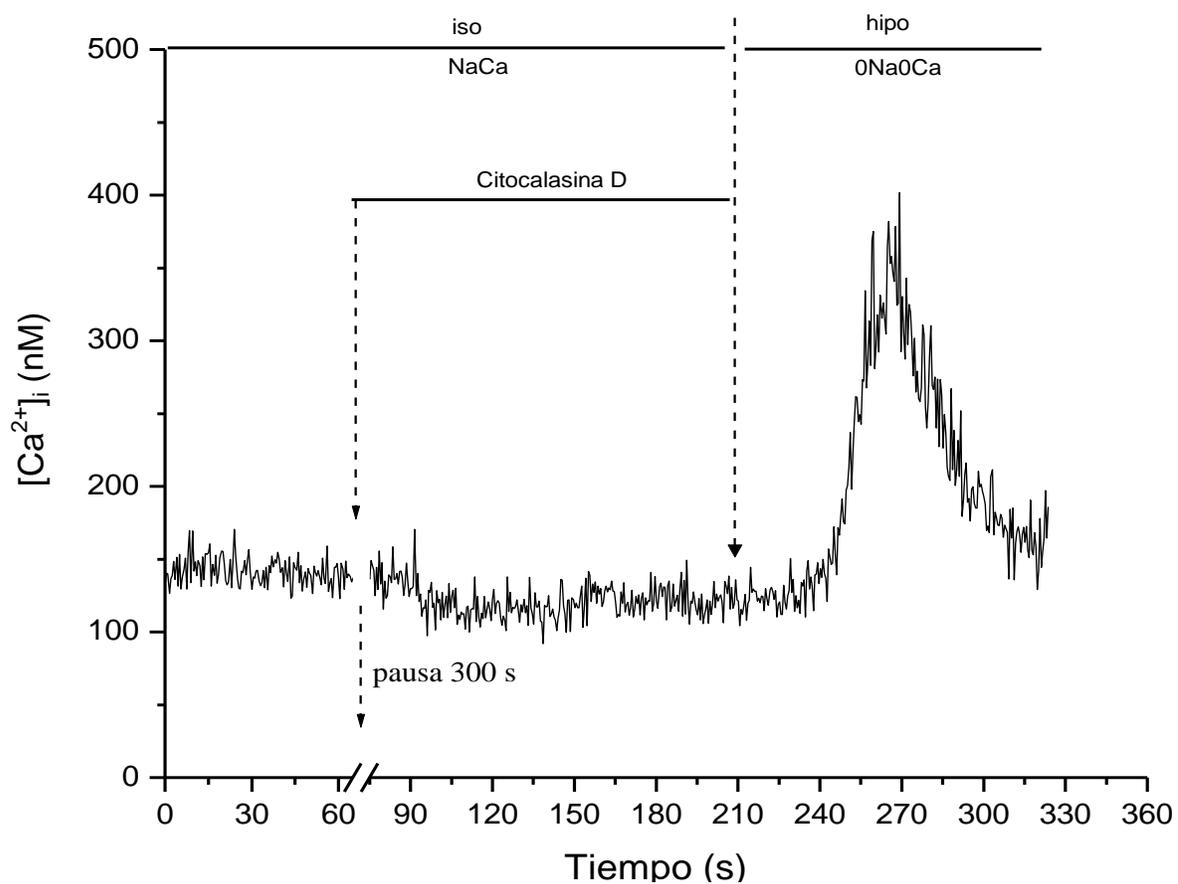


Figura 16. Efecto de la citocalasina sobre la $[Ca^{2+}]_i$. Medios extracelulares. Iso-NaCa (iso-osmótico con Ca^{2+} y Na^+): mantiene la $[Ca^{2+}]_i$ basal. Iso-NaCa con citocalasina D (CD): evalúa el efecto de CD sobre la $[Ca^{2+}]_i$. Hipo-0Na0Ca (hipo-osmótico, libre de Na^+ y Ca^{2+}): bloquea la actividad del NCX en modo directo y reverso.

Considerando el resultado anterior, se busco dilucidar si el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ se debe únicamente a la depleción de reservorios intracelulares; para ello se diseño un experimento cuyo resultado es representado por la figura 17, donde se bloquearon los RyR y en consecuencia la liberación de Ca^{2+} desde el ER. Adicionalmente se mantuvo una condición de iso-osmolaridad con cambios sucesivos del medio extracelular donde se modificaron las concentraciones de Na^+ y Ca^{2+} , para brindar las condiciones iónicas necesarias que activan al NCX.

El experimento se inició con el medio iso-osmótico NaCa, que luego de aproximadamente 60 s fue sustituido por el medio NaCa con Ryanodina (Ry, 50 μ M), para bloquear los receptores (RyR); a partir de este punto los sucesivos cambios en medio extracelular contenían Ry (50 μ M). El medio NaCa se reemplazó por 0NaCa con Ry, generando un leve incremento en la $[Ca^{2+}]_i$, el cual disminuyó rápidamente frente a la reperfusión del medio NaCa+Ry, que se mantuvo aproximadamente 60 s. Seguidamente se adicionó el medio NaCa con Ry y citocalasina D (CD, 10 μ M), realizando una pausa de 1211 s que permitió a la droga ejecutar su acción despolimerizante; luego de esta pausa se retomó el experimento, manteniendo las condiciones de perfusión por 120 s en los cuales no se presentaron cambios en los niveles de Ca^{2+}_i . Posteriormente se modificó el medio extracelular a 0NaCa+Ry+CD, periodo en el que se generó un drástico incremento en la $[Ca^{2+}]_i$, decayendo de forma abrupta frente a la reperfusión del medio NaCa+Ry+CD; al repetir la perfusión con el medio 0NaCa+Ry+CD se encontró un nuevo incremento en la $[Ca^{2+}]_i$. Al incorporar el medio extracelular NaCa+Ry+CD nuevamente se generó un descenso en el nivel de Ca^{2+}_i .

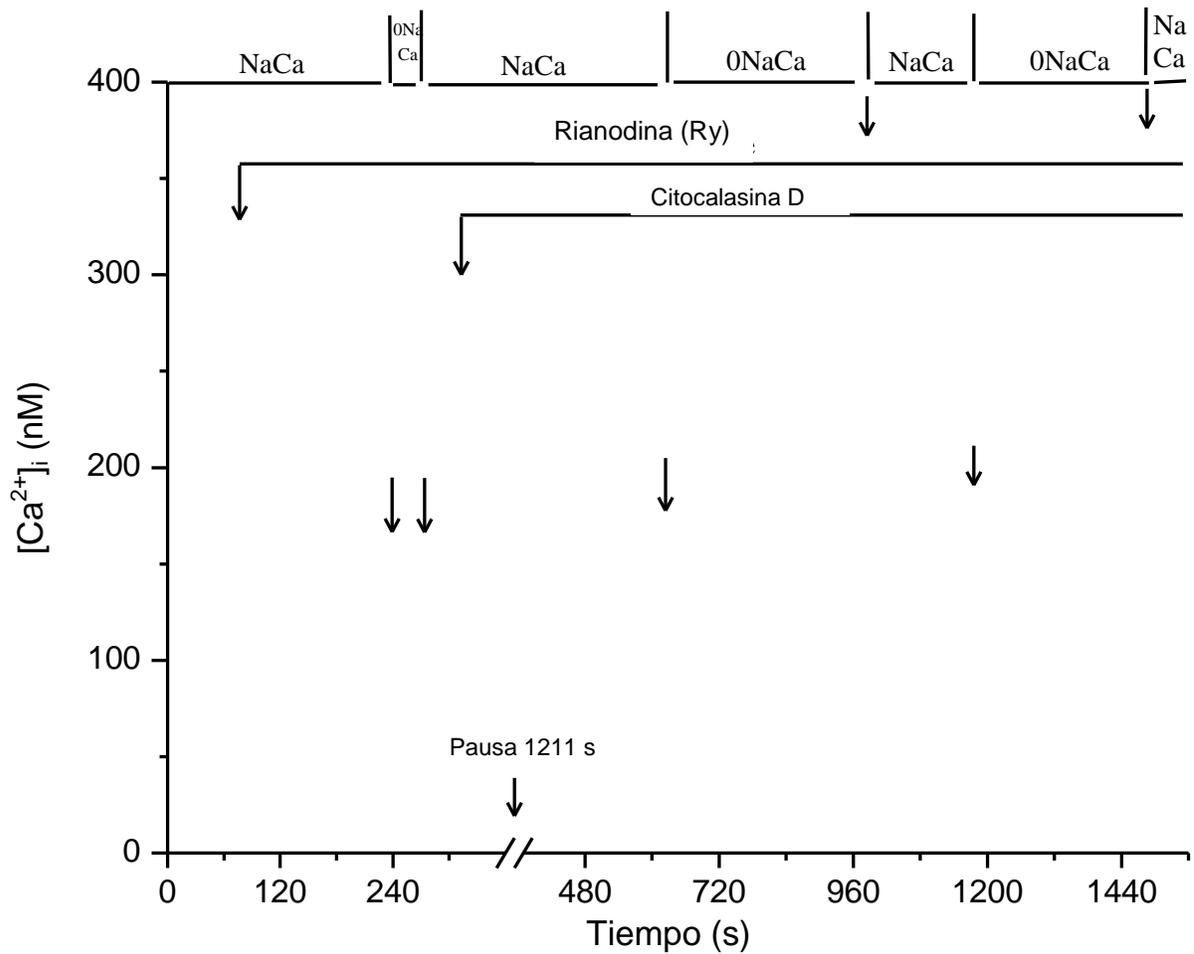


Figura 17. Efecto de la citocalasina sobre la regulación del Ca^{2+}_i en condiciones iso-osmóticas. Medios extracelulares iso-osmóticos. NaCa (con Ca^{2+} y Na^+): mantiene la $[Ca^{2+}]_i$ basal. 0NaCa (libre de Na^+): activa el reverso del NCX. Ry: bloquea el receptor de ryanodina. Citocalasina D: toxina de actina, con acción despolimerizante.

Considerando el resultado anterior, que indica la participación del NCX en el incremento de Ca^{2+} frente a los cambios estructurales inducidos con CD, similar al generado en condiciones de hipo-osmolaridad; los experimentos que se realizaron posteriormente buscaron dilucidar la relación entre el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en condiciones de hipo-osmolaridad y los cambios estructurales en los F-actina.

Respecto a los resultados de estos experimentos, se presentan en las figuras 18-a y 18-b donde se evidencia el efecto que tienen diferentes “shocks” osmóticos sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, en los cuales el cambio de un medio iso-osmótico a uno hiper-osmótico, ambos con Na^+ , Ca^{2+} y CD ($10 \mu\text{M}$) no induce cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Un subsecuente cambio a un medio hipo $0\text{Na}0\text{Ca}$, genera un moderado y lento incremento en el nivel de Ca^{2+}_i , que es superado al cambiar el medio extracelular por hipo 0NaCa , el cual decae rápidamente frente a una condición hipo-osmótica $\text{Na}0\text{Ca}$. En la figura 18-b se repitió el “shock” con hipo 0NaCa , encontrándose un segundo aumento en la señal de calcio. Cada solución extracelular de tipo hipo e hiper-osmótica contenía CD ($10 \mu\text{M}$).

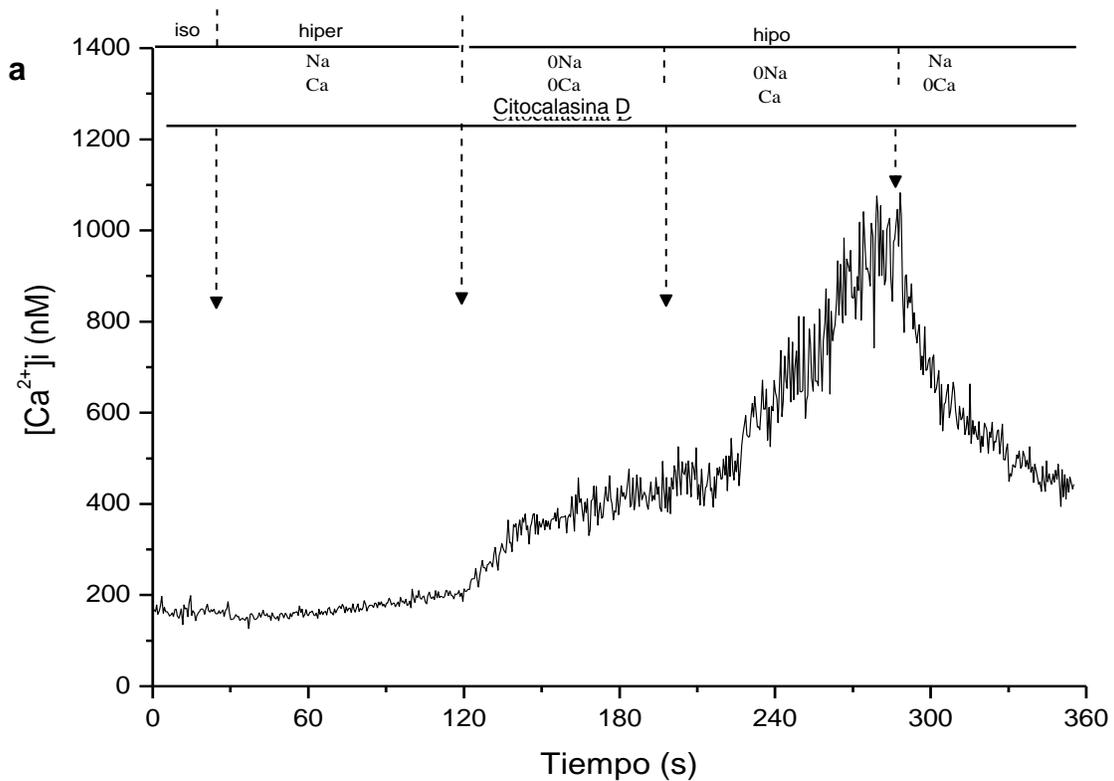


Figura 18-a. Efecto del “shock” h́iper-tónico e h́ipo-tónico sobre la actividad del NCX y la regulaci3n del Ca^{2+}_i en astrocitos t-1, en presencia de CD. Medios extracelulares: iso (iso-osm3ticos), h́iper (h́iper-osm3ticos), h́ipo (h́ipo-osm3ticos). iso-NaCa: mantiene la $[Ca^{2+}]_i$ basal, hiper-NaCa: no afecta la $[Ca^{2+}]_i$, hipo-0Na0Ca: bloquea la actividad del NCX en modo directo y reverso, hipo-0NaCa: activa el reverso del NCX, hipo Na0Ca: demuestra la dependencia entre la $[Ca^{2+}]_i$ y el Na^+_o , permite la actividad en el sentido directo del NCX. Citocalasina D (CD, 10 μ M): toxina de actina, con acci3n despolimerizante.

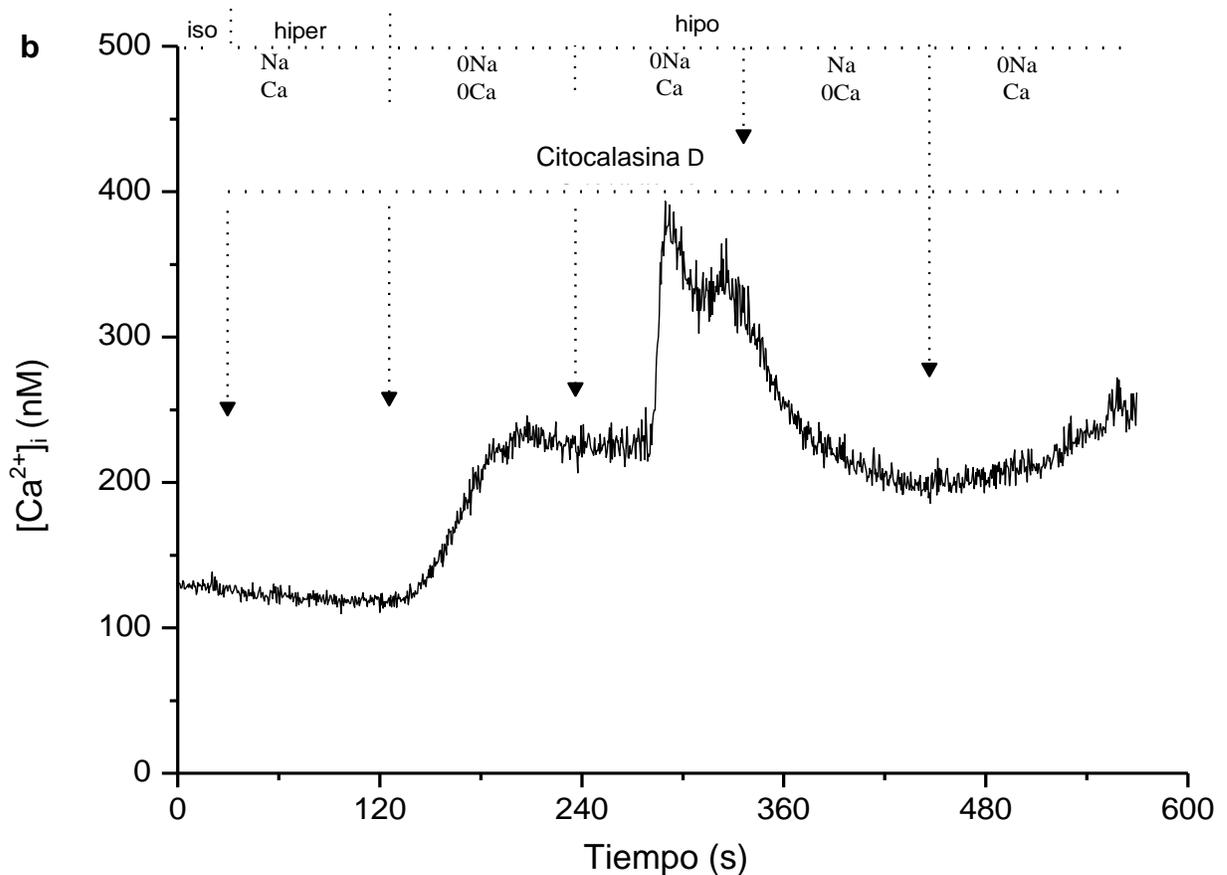


Figura 18-b. Efecto del “shock” hiper-tónico e hipo-tónico sobre la actividad del NCX y la regulación del Ca^{2+}_i en astrocitos t-1, en presencia de CD. Medios extracelulares: iso (iso-osmóticos), hiper (hiper-osmóticos), hipo (hipo-osmóticos). Iso-NaCa: mantiene la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basal, hiper-NaCa: no afecta la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, hipo-0Na0Ca: bloquea la actividad del NCX en modo directo y reverso, hipo-0NaCa: activa el reverso del NCX, hipo Na0Ca: demuestra la dependencia entre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y el Na^+_o , permite la actividad en el sentido directo del NCX. Citocalasina D (CD, 10 μM): toxina de actina, con acción despolimerizante.

b) Efecto de la Latrunculina B.

Este bloque de experimentos evaluaron el efecto de la despolimerización de F-actina manteniendo las variaciones osmóticas utilizadas para los experimentos en presencia de CD, sin embargo se utilizó la toxina latrunculina B, cuyo mecanismo de acción es diferente que el de CD.

La figura 19 es representativa de un experimento que evalúa el efecto de dicha toxina sobre la $[Ca^{2+}]_i$, donde se realizó una primera fase en presencia del medio iso-0Na0Ca como control, evidenciando que la presencia de este medio no induce cambios en el calcio citoplasmático. Al cambiar el medio a iso-0Na0Ca con latrunculina (Lat, 10 μ M), se realizó una pausa de 10 min, periodo en el que la toxina ejerce su efecto despolimerizante sobre los F-actina, esta perfusión se mantuvo por 300 s más sin generar cambios en la $[Ca^{2+}]_i$, la cual permaneció en el nivel basal. Seguidamente se generó un “shock” hipo-tónico 0Na0Ca sin latrunculina, este cambio en el medio extracelular produjo un rápido y elevado ascenso en la $[Ca^{2+}]_i$ (300 nM) el cual decae rápidamente luego de alcanzar este máximo en un medio extracelular hipo-Na0Ca el cual restituye la $[Ca^{2+}]_i$ hasta su nivel basal, indicando que Latrunculina no impide el aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ en medios hipo-tónicos.

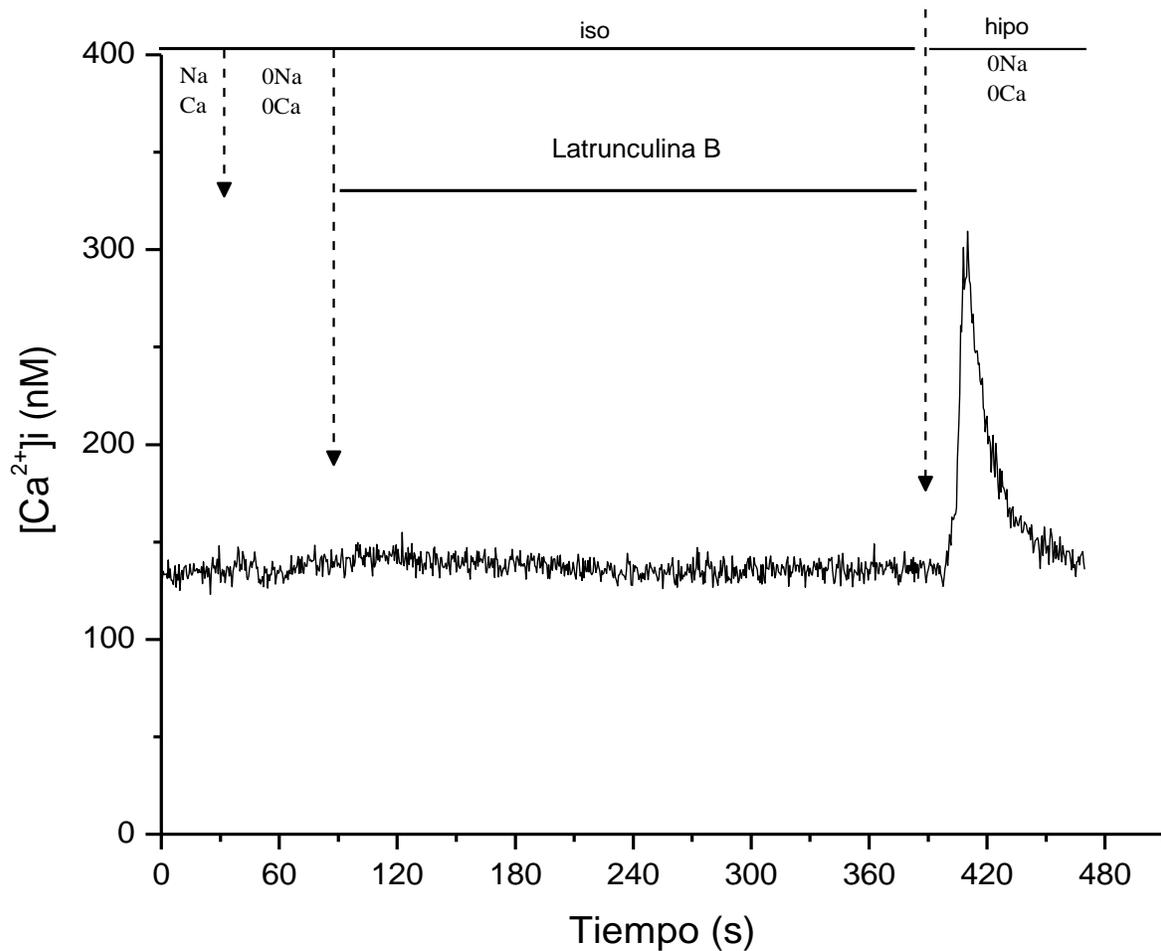


Figura 19. Efecto de la Latrunculina sobre el nivel de Ca^{2+}_i . Medios extracelulares: iso (iso-osmóticos), hipo (hipo-osmóticos), Latrunculina B (LatB, 10 μ M). iso-NaCa: mantiene la $[Ca^{2+}]_i$ basal, iso-0Na0Ca: inhibe el NCX, hipo-0Na0Ca: bloquea la actividad del NCX en el modo directo y reverso.

En los experimentos de las figuras 20 y 21 se evaluó el efecto de las soluciones de tipo iso e híper-osmóticas NaCa, cada una con la toxina de efecto despolimerizante Lat (10 μM); se encontró en ambos experimentos que la presencia de esta toxina en medio iso e híper-osmótico NaCa, no genera cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

La figura 20 muestra que en presencia de un medio extracelular hipo-osmótico 0Na0Ca con Lat, se produce un pequeño incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, el cual se vé modificado frente a un “shock” hipo-tónico 0NaCa que genera un gran incremento en el nivel de Ca^{2+}_i (400 nM). Esta concentración decae rápidamente en presencia de una solución hipo-osmótica Na0Ca alcanzando un nivel cercano al basal.

Para demostrar la reversibilidad del aumento en el calcio citoplasmático, se realizaron una serie de experimentos como el representado en la figura 21, donde se empleó un “shock” iso-tónico NaCa luego de alcanzar el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ generado frente a un medio extracelular hipo-osmótico 0Na0Ca; en este proceso el nivel de calcio disminuyó rápidamente re-estableciendo la concentración basal. Un nuevo “shock” hipo-tónico de tipo 0NaCa generó un rápido y elevado ascenso en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que descendió de forma inmediata al perfundir la célula con un medio hipo-Na0Ca; seguidamente al modificar el medio a hipo-0NaCa se generó un nuevo incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. La incorporación del medio extracelular hipo-Na0Ca provocó un rápido descenso en el nivel de calcio, hasta el nivel basal como consecuencia de la salida de Ca^{2+} por actividad en modo directo del NCX.

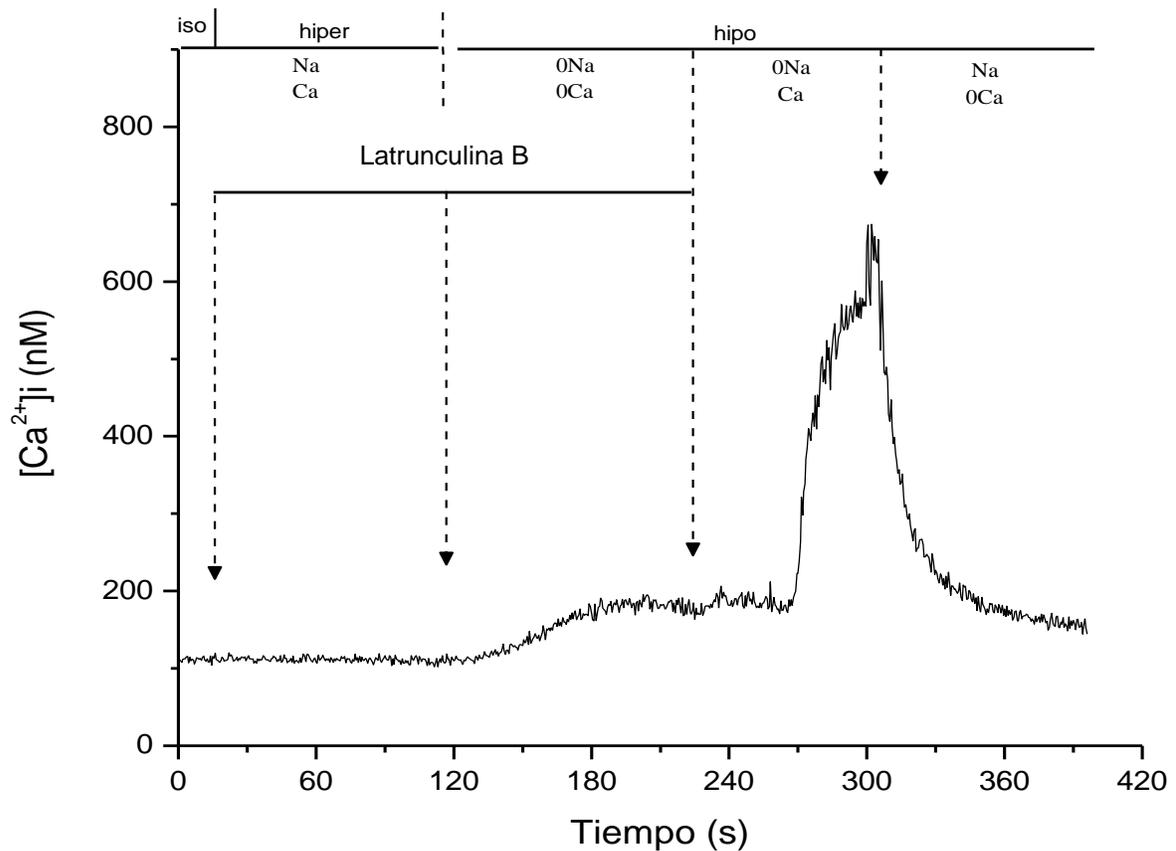


Figura 20. Efecto de la Latrunculina frente a cambios osmóticos y su relación con la actividad del NCX. Medios extracelulares: iso (iso-osmóticos), hiper (hiper-osmóticos), hipo (hipo-osmóticos), Latrunculina B (LatB, 10 μ M). iso-NaCa: mantiene la $[Ca^{2+}]_i$ basal, hiper-NaCa: no afecta la $[Ca^{2+}]_i$, hipo-0Na0Ca: bloquea la actividad del NCX en los modos directo y reverso, hipo-0NaCa: activa el reverso del NCX, hipo Na0Ca: demuestra la dependencia entre la $[Ca^{2+}]_i$ y el Na^+_o , permite la actividad en sentido directo del NCX.

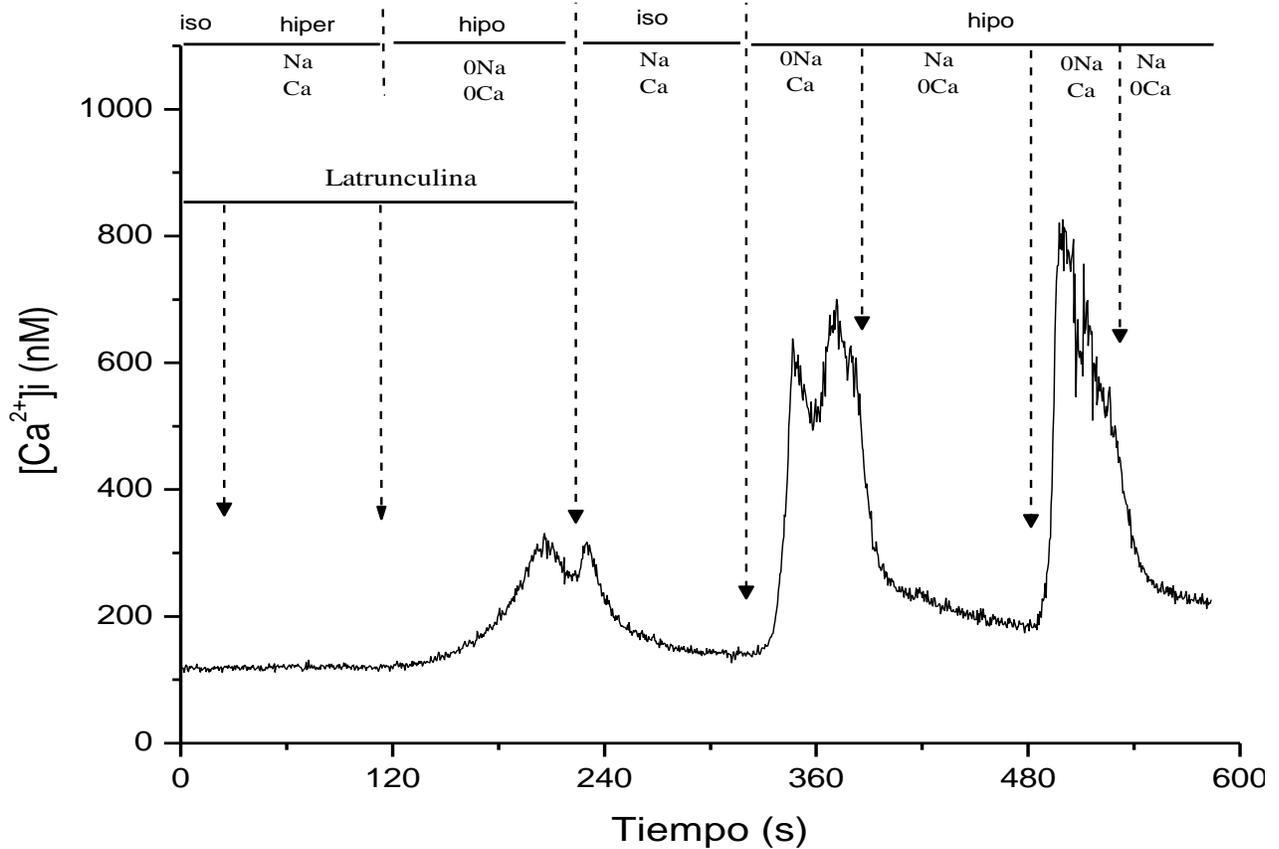


Figura 21. Efecto de la Latrunculina B sobre la restauración de la $[Ca^{2+}]_i$ en astrocitos t-1. Medios extracelulares: iso (iso-osmóticos), hiper (hiper-osmóticos), hipo (hipo-osmóticos), Citocalasina D (CD, 10 μ M). Iso-NaCa: mantiene la $[Ca^{2+}]_i$ basal, hiper-NaCa: no afecta la $[Ca^{2+}]_i$, hipo-0Na0Ca: bloquea la actividad del NCX en los modo directo y reverso, hipo-0NaCa: activa el reverso del NCX, hipo Na0Ca: demuestra la dependencia entre la $[Ca^{2+}]_i$ y el Na^+ , permite la actividad en sentido directo del NCX.

c) Efecto del Jasplakinolide.

Las figuras 22 y 23 muestran experimentos realizados en presencia de la toxina con efecto polimerizante de los F-actina, Jasplakinolide (Jpk, 10 μM). En la figura 22 se muestra que en presencia de Jpk en un medio extracelular de tipo iso-osmótico NaCa, no se generan cambios en el nivel basal de Ca^{2+}_i ; sin embargo, al modificar el medio a una condición hipo-osmótica libre de Na^+ y Ca^{2+} , se genera un rápido y elevado aumento en el nivel del calcio hasta establecer un plateau bajo estas condiciones que dura aproximadamente 4min.

El experimento de la figura 23 repite las condiciones anteriores, reportando el mismo patrón en las variaciones del Ca^{2+} , en las cuales al repetir la perfusión con el medio Iso-NaCa se genera un rápido descenso en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

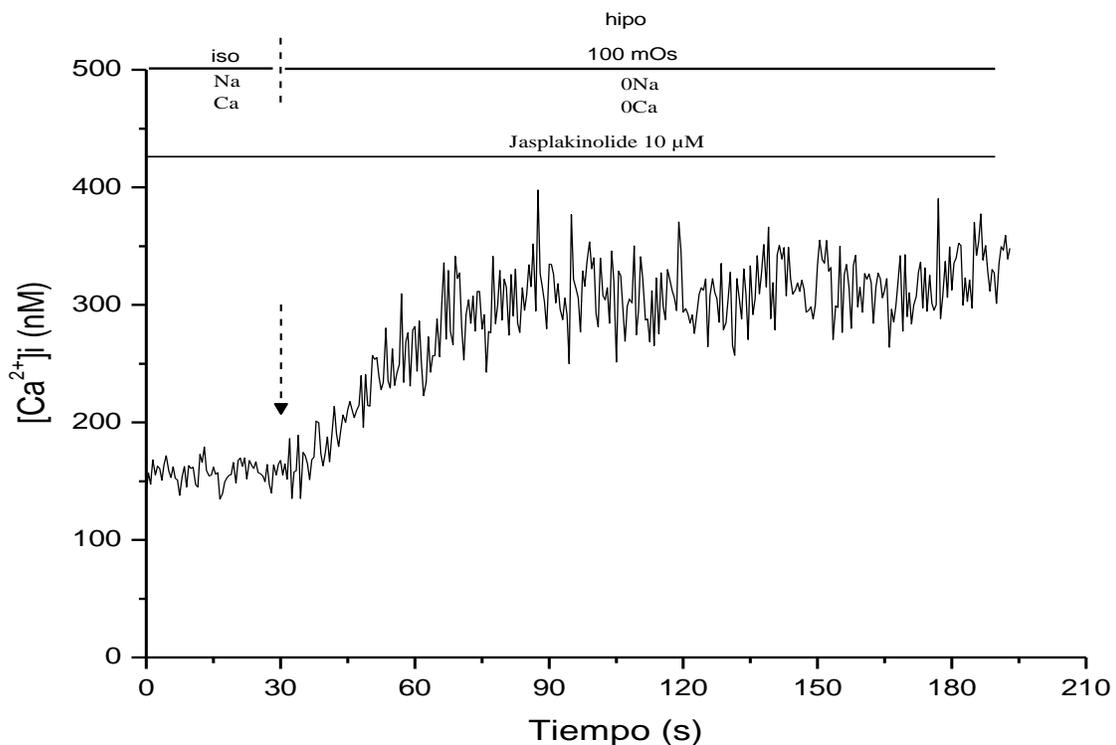


Figura 22. Efecto de Jasplakinolide sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en un medio hipo-osmótico. Medios extracelulares: iso (iso-osmóticos), hipo (hipo-osmóticos), Jasplakinolide (Jpk, 10 μM). Iso-NaCa: mantiene la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basal, hipo-0Na0Ca: bloquea actividad del NCX en los modos directo y reverso.

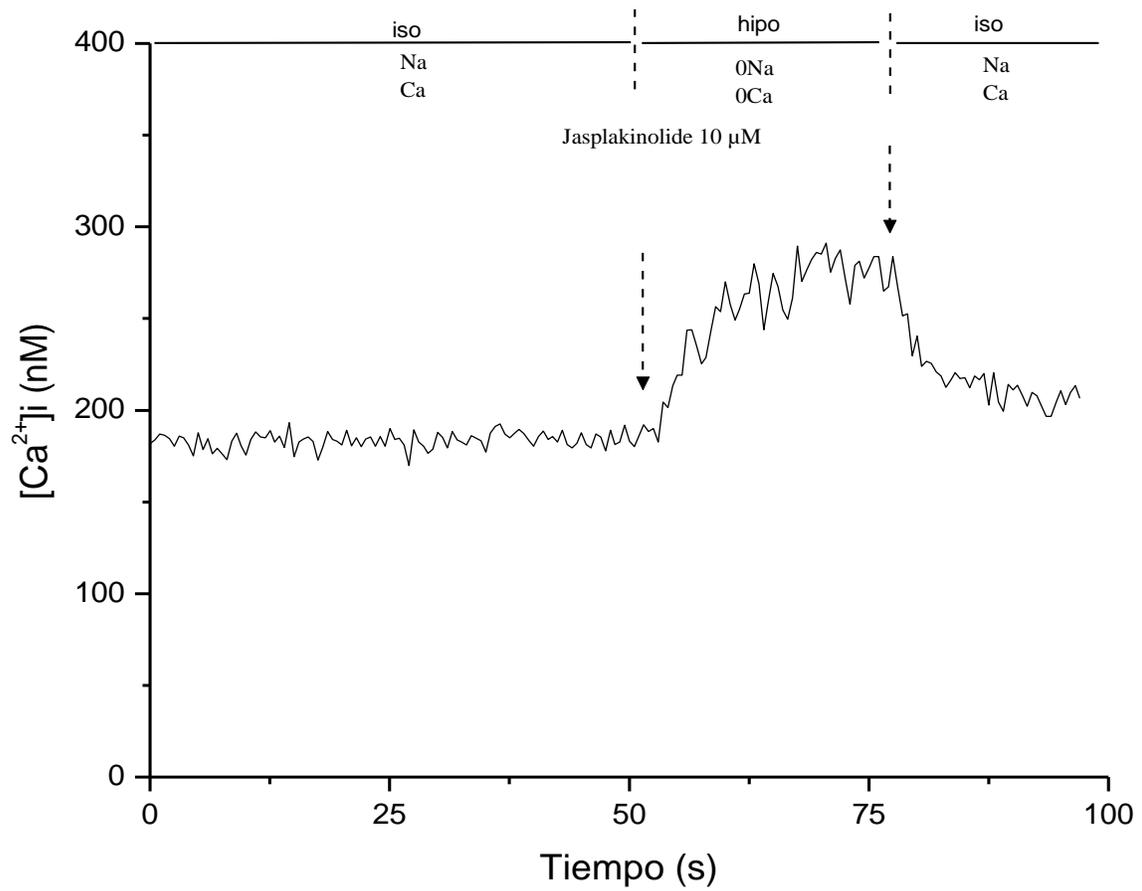


Figura 23. Efecto de Jasplakinolide sobre la restauración del Ca^{2+}_i en astrocitos t-1. Medios extracelulares: iso (iso-osmóticos), hipo (hipo-osmóticos), Jasplakinolide (Jpk, 10 μ M). Iso-NaCa: mantiene la $[Ca^{2+}]_i$ basal, hipo-0Na0Ca: bloquea la actividad del NCX en los modos directo y reverso.

5.5. Inmunomarcajes del NCX y F-actina en astrocitos t-1 bajo condiciones de polimerización y despolimerización, en medio iso-osmótico.

Esta fase de resultados está representada por los marcajes de inmunofluorescencia donde se identificó al NCX y a los F-actina, luego de someter a las células a condiciones que alteran la estructura del citoesqueleto de actina (polimerización y despolimerización); con el fin de evaluar si dichos cambios tienen o no efecto sobre el marcaje intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Las toxinas de actina con acción desestabilizadora o despolimerizante (Citocalasina D y Latrunculina B) y polimerizante (Jasplakinolide) se diluyeron de forma independiente en un medio iso-NaCa (iso-osmótico con Na^+ y Ca^{2+}), permitiendo establecer 2 condiciones experimentales: 1) polimerización, donde se evaluó el efecto de dos diferente toxinas y 2) despolimerización.

En todos los experimentos, la identificación de los F-actina se logró al realizar el inmunomarcaje con el anticuerpo conjugado Alexa Fluor Phalloidin-488 y posteriormente observar las células mediante microscopía confocal, equipo que permitió capturar la imagen de dicha estructura a través del canal 1 (verde) luego de la excitación del fluoróforo Alexa Fluor 488, cuya máxima absorción ocurre a 496 nm con una máxima emisión de color verde a 519 nm.

Adicionalmente se identifico al NCX en el citoplasma de las células, con el uso del anticuerpo secundario Alexa Fluor-546 goat anti mouse IgM, de excitación a 546 nm (máxima absorción a 556 nm) con una emisión máxima a 573 nm con una emisión máxima a 573 nm de emisión rojo-naranja. La imagen fue captada por el

canal 2 (rojo) luego de la excitación del fluoróforo Alexa Fluor 546, presente en el anticuerpo secundario.

a) Control experimental

La figura 24 muestra 3 imágenes, representativas de un experimento control del doble marcaje realizado en astrocitos t-1. En este caso el marcaje se llevó a cabo luego de exponer a la célula a un medio iso-osmótico NaCa a temperatura ambiente durante 15 min, condición que asemeja al estado *in vivo* y que permite determinar una medida basal de la fluorescencia asociada a los fluorocromos que identifican respectivamente al NCX y a los F-actina, sin alteraciones estructurales. En la figura 24-A) se observan los F-actina que fueron reconocidos por el anticuerpo conjugado Alexa Fluor Phalloidin-488, estos se presentan como estructuras delgadas y alargadas, que forman una malla o red, manteniendo la forma estrellada característica de los astrocitos t-1; adicionalmente se observa que se encuentran distribuidos en todo el citoplasma, manteniendo libre de marcaje la región central de célula, la cual se presume, de acuerdo a su forma y tamaño que corresponde al núcleo; esto implica gran especificidad del anticuerpo.

En la figura 24-B) se observa un marcaje positivo a la presencia del NCX, debido a la coloración rojiza que presenta la célula en su citoplasma.

Con este marcaje se logró conocer la medida basal o control de la medida de fluorescencia asociada a la identificación del NCX frente a un medio iso-NaCa, que simula la condición *in vivo* de las células; para ello se tomaron regiones circulares con un área de igual tamaño para todas las células que permitieron establecer una

medida de fluorescencia asociada a ese marcaje y determinar la homogeneidad de los datos (tabla 6). Posteriormente se determinó la media de la fluorescencia. Los datos obtenidos por análisis estadístico fueron calculados en el programa Origin 6.1 y se presentan en la tabla 7.

Tabla 6. Test de Normalidad (Shapiro-Wilk)

Estadístico de Prueba (W)	Valor P (p)	Decisión
0,91	0,08	Acepta hipótesis de normalidad, en nivel 0,05

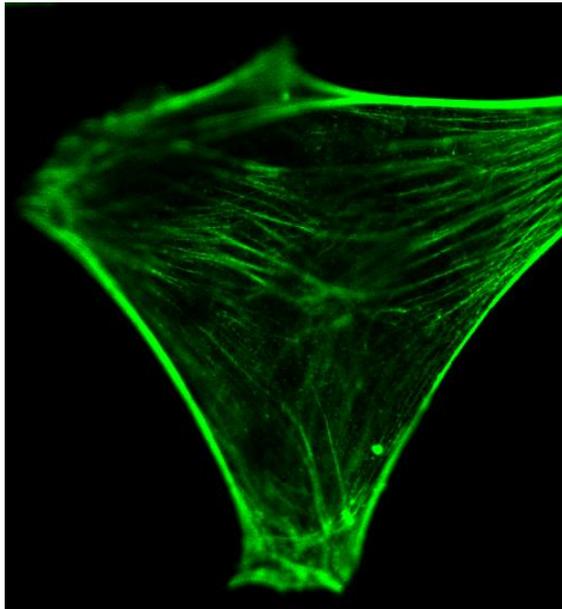
Datos calculados para un n>3

Tabla 7. Valores de fluorescencia del NCX en imagen control

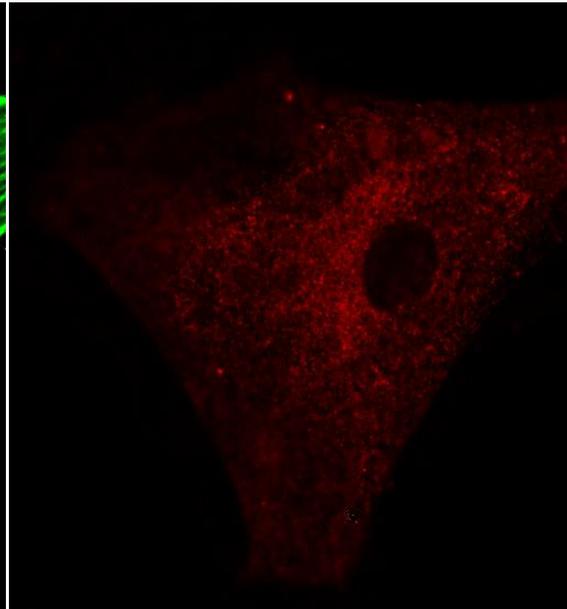
Media de Fluorescencia	Desviación estándar (SD)	Error estándar (SE)	Mínimo	Máximo
18,41	1,94	0,47	14	21

Datos calculados para un n>3

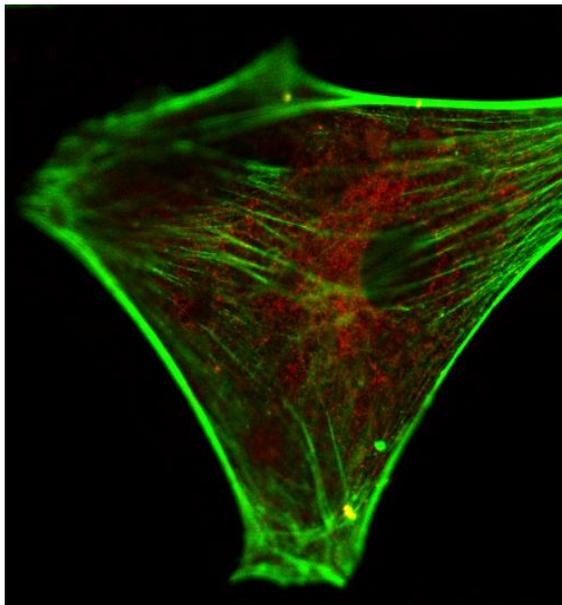
La figura 24-C) muestra una imagen de doble fluorescencia, que se obtuvo a partir de una combinación de las imágenes tomadas por dos canales independientes (1 y 2), en los cuales se capturó la fluorescencia de cada uno de los fluoróforos por separado; excitando a cada uno de ellos con una longitud de onda específica. En esta imagen se evidencia la ausencia de colocalización entre F-actina y el NCX, ya que el color de cada marcaje no se superpone ni forma zonas donde se hallen ambas moléculas fluorescentes y por tanto no se observa un color diferente a rojo y verde, consecuencia de su combinación. Para evaluar de forma cuantitativa la presencia o no de colocalización se determinó el coeficiente de correlación de Pearson (R), cálculo que permite establecer la correlación entre dos variables (ver tabla 8), indicando una correlación débil (entre 0,2 y 0,4).



A) Imagen de fluorescencia de F-actina en astrocitos t-1



B) Imagen de fluorescencia del NCX en astrocitos t-1



C) Imagen de doble fluorescencia que identifica los F-actina y el NCX en astrocitos t-1

Tabla 8. Nivel de colocalización, marcaje control

Media de R	Desviación estándar (sd)
0,39	0,14

R: coeficiente de correlación de Pearson.
Datos calculados para un n >3

Figura 24. Control de Inmunomarcaje que identifica el NCX y F-actina en astrocitos t-1, frente a un medio iso-osmótico. **A)** Fluorescencia emitida por excitación del fluorocromo Alexa fluor Phalloidin 488, captado por canal 1 (verde), que identifica F-actina. **B)** Fluorescencia emitida por excitación del fluorocromo Alexa fluor 546, captado por canal 2 (rojo), que identifica al NCX. **C)** Superposición de las imágenes de cada canal (A y B) en una única imagen para evaluar la colocalización.

b) Efecto de la Citocalasina (CD).

En la figura 25-A) se observa un astrocito t-1 con deterioro en los F-actina producto de su despolimerización o desdoblamiento, ocasionado por la toxina CD, al igual que en la imagen control, los F-actina se presentan como una malla o red que envuelve la célula. Adicionalmente se obtuvo una segunda imagen 25-B), correspondiente a la identificación del NCX, en este caso se puede observar una mayor intensidad en la coloración respecto a la figura 24-B), que representa el control de identificación del NCX. En este caso, también se determinó el valor de la fluorescencia asociada a la identificación del NCX, estableciendo la normalidad de los resultados (tabla 8), así como su media y desviación estándar reflejados en la tabla 9.

Tabla 9. Test de Normalidad (Shapiro-Wilk)

Estadístico de Prueba (W)	Valor P (p)	Decisión
0,91	0,08	Acepta hipótesis de normalidad, en nivel 0,05

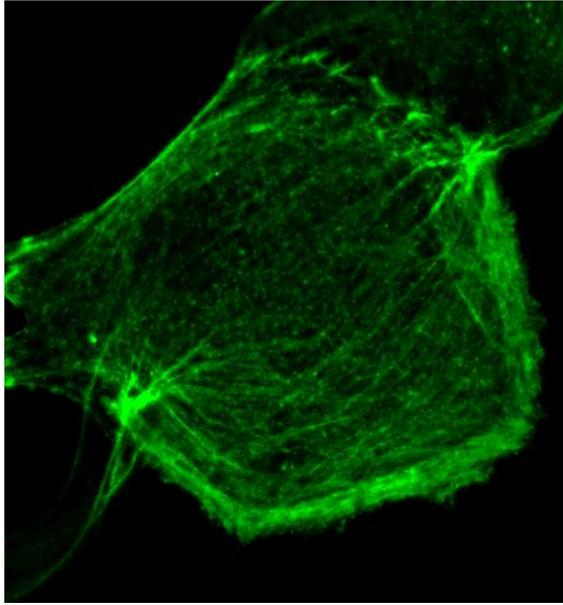
Datos calculados para un n>3

Tabla 10. Valores de fluorescencia del NCX en experimentos con CD.

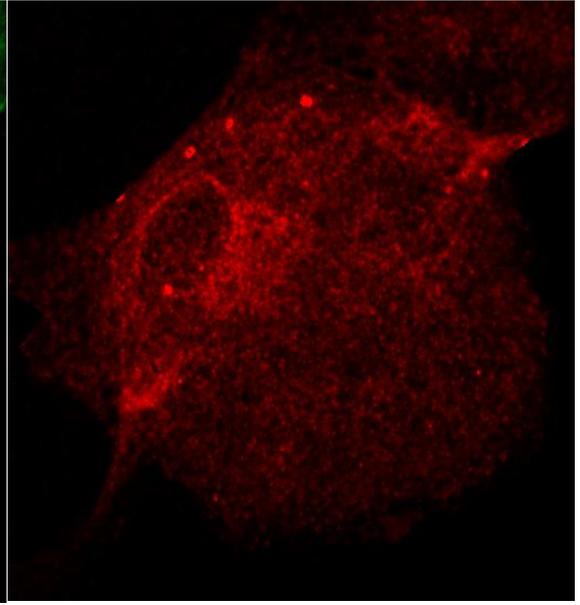
Media de Fluorescencia	Desviación estándar (SD)	Error estándar (SE)	Mínimo	Máximo
28,76	4,74	1,15	22	38

Datos calculados para un n>3

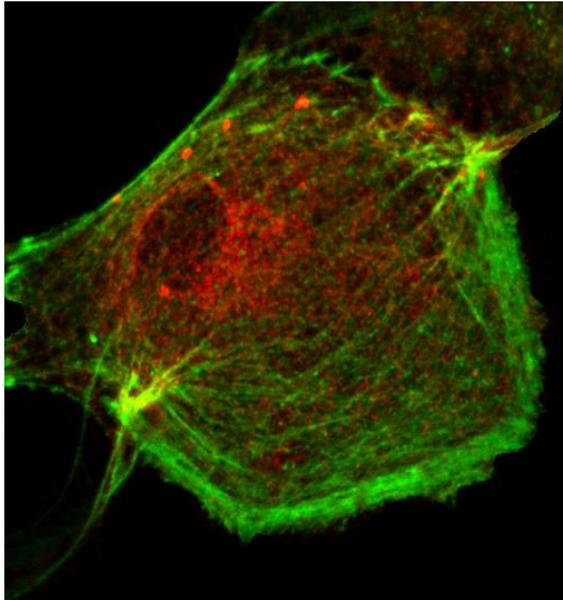
Otro resultado que se obtuvo en este experimento fue una imagen de doble fluorescencia, 25-C), en el cual se muestran regiones de color verde y rojo claramente definidas e independientes lo que implica ausencia de colocalización entre F-actina y el NCX; a pesar del aumento en la fluorescencia roja que identifica al NCX en el citoplasma de la célula. En la tabla 11 se presenta la media del cálculo de R, que indica una correlación moderada (entre 0,4 y 0,6).



A) Imagen de fluorescencia de F-actina en astrocitos t-1



B) Imagen de fluorescencia del NCX en astrocitos t-1



C) Imagen de doble fluorescencia que identifica los F-actina y el NCX en astrocitos t-1

Tabla 11. Nivel de colocalización, experimento con CD

Media de R	Desviación estándar (sd)
0,49	0,14

R: coeficiente de correlación de Pearson.
Datos calculados para un $n > 3$

Figura 25. Inmunomarcaje que identifica al NCX y F-actina en astrocitos t-1, luego de despolimerización con Citocalasina D. Las imágenes **A)**, **B)** y **C)** obtenidas mediante microscopia confocal, muestran el efecto de la CD sobre los F-actina y el NCX, encontrando en **A)** ruptura o desdoblamiento de dichos filamentos y de forma simultanea, un incremento en la fluorescencia captada por el canal 2 (rojo), que identifica al NCX, imagen **B)**. El incremento es considerado respecto a la imagen control. **C)** evaluación de la colocalización.

Finalmente, en la figura 26 se muestra la comparación entre la media de la fluorescencia calculada para los experimentos con Citocalasina vs la media del experimento control, en la cual se evidencia la diferencia entre ambas medidas de fluorescencia siendo mayor en el experimento de despolimerización de F-actina.

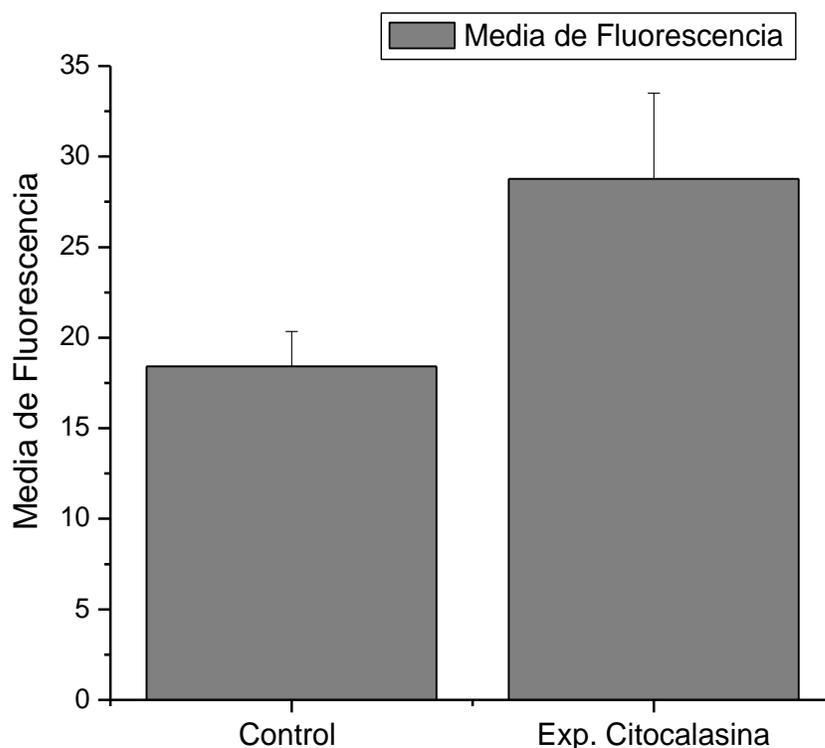


Figura 26. Comparación de la fluorescencia del NCX entre el experimento control y el experimento de despolimerización con CD. Las barras representan la media + SD de la fluorescencia obtenida en los experimentos control y en presencia de Citocalasina D. Media del control= 18,41; media del experimento con citocalasina= 28,76.

c) Efecto de la Latrunculina (LatB)

En la figura 27-A) se observa un astrocito t-1 con despolimerización de los F-actina generado por la acción de la toxina Latrunculina B utilizada al inicio del experimento; estas estructuras son identificadas por su coloración verde emitida por el fluoróforo Alexa Fluor 488. Adicionalmente se obtuvo una segunda imagen, 27-B), correspondiente a la identificación del NCX; en este caso, la imagen evidencia una mayor intensidad en la coloración respecto a la figura 24-B) que representa el control de identificación del NCX. En este tipo de imágenes se determinó el valor de la fluorescencia asociada al NCX, estableciendo el nivel de normalidad de los resultados (tabla 10); así como su medio y sd reflejados en la tabla 11.

Tabla 12. Test de Normalidad (Shapiro-Wilk)

Estadístico de Prueba (W)	Valor P (p)	Decisión
0,94	0,45	Acepta hipótesis de normalidad, en nivel 0,05

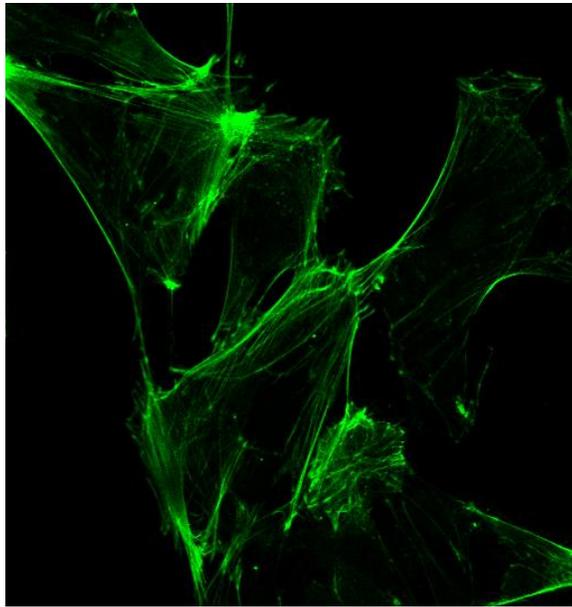
Datos calculados para un n>3

Tabla 13. Valores de fluorescencia del NCX en experimentos con Lat B.

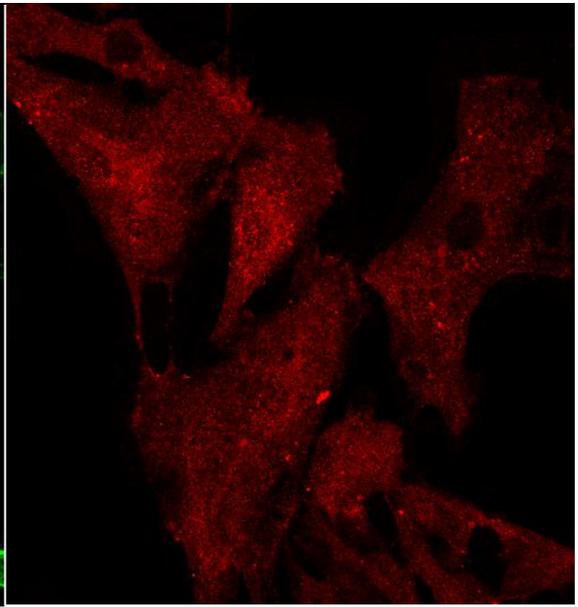
Media de Fluorescencia	Desviación estándar (SD)	Error estándar (SE)	Mínimo	Máximo
29,73	5,56	1,43	18	38

Datos calculados para un n>3

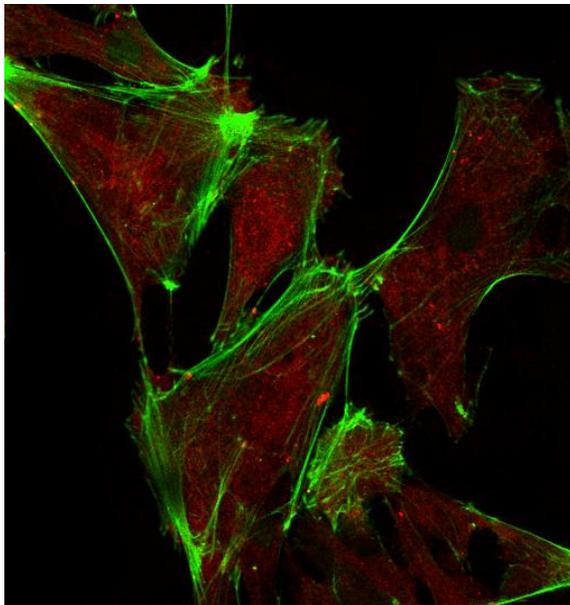
La imagen de doble fluorescencia, figura 27-C), muestra regiones de color verde y rojo claramente definidas e independientes lo que implica ausencia de colocación entre F-actina y el NCX; a pesar del incremento en la fluorescencia roja que identifica la presencia de NCX en el citoplasma de la célula. El cálculo de R indica una correlación moderada (entre 0,4 y 0,6), como se observa en la tabla 14.



A) Imagen de fluorescencia de F-actina en astrocitos t-1



B) Imagen de fluorescencia del NCX en astrocitos t-1



C) Imagen de doble fluorescencia que identifica los F-actina y el NCX en astrocitos t-1

Tabla 14. Nivel de colocación, experimento con Lat B

Media de R	Desviación estándar (sd)
0,47	0,15

R: coeficiente de correlación de Pearson.
Datos calculados para un $n > 3$

Figura 27. Inmunomarcaje que identifica al NCX y F-actina en astrocitos t-1, luego de despolimerización con Latrunculina B. Las imágenes **A)**, **B)** y **C)** obtenidas mediante microscopia confocal, muestran el efecto de la LatB sobre los F-actina y el NCX, encontrando en **A)** ruptura o desdoblamiento de dichos filamentos y de forma simultanea un incremento en la fluorescencia captada por el canal 2 (rojo), que identifica al NCX en la imagen **B)**. El incremento es considerado respecto a la imagen control. **C)** evaluación de la colocación.

La figura 28 muestra la comparación entre la media de la fluorescencia calculada para los experimentos en los cuales las células fueron sometidas a un medio iso-NaCa con Latrunculina vs la media del experimento control, evidenciándose una diferencia entre ambas medidas de fluorescencia, siendo esta mayor en presencia de la toxina de actina.

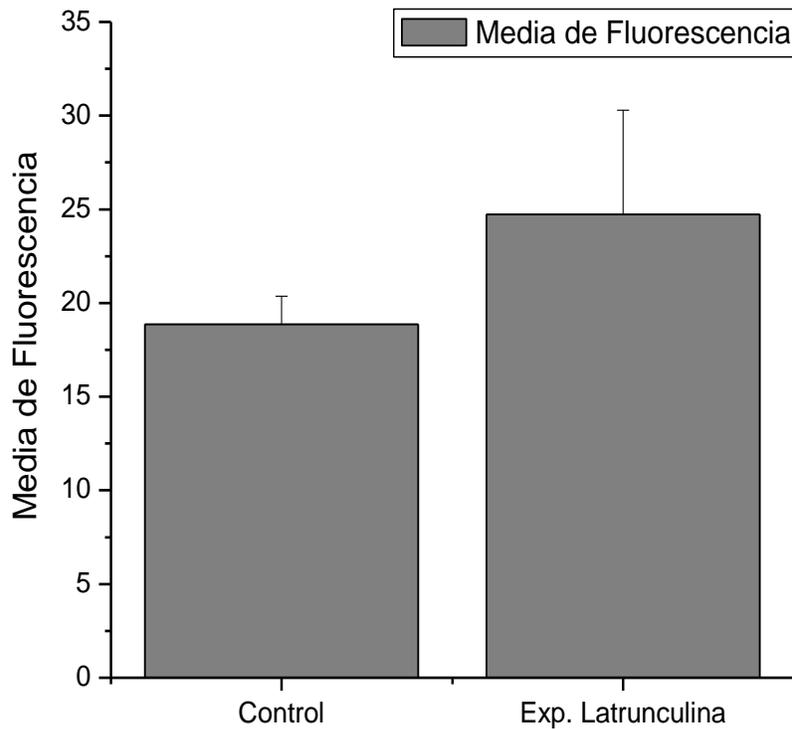


Figura 28. Comparación de la fluorescencia del NCX entre el experimento control y el experimento de despolimerización con Latrunculina B. Las barras representan la media + SD de la fluorescencia obtenida en los experimentos control y en presencia de Citocalasina D. Media del control= 18,41; media del experimento con citocalasina= 24,73.

d) Efecto del Jasplakinolide (Jpk).

En la figura 29-A) se observa un astrocito t-1 con F-actina claramente conservados, que a diferencia de los experimentos con CD y Lat no presentan ruptura; presentándose de forma semejante a la imagen control 24-A). Posteriormente se obtuvo una segunda imagen, 29-B), correspondiente a la identificación del NCX; en este caso la imagen evidencia una mayor intensidad en la coloración respecto a la figura 24-B) que representa el control de identificación del NCX.

En este tipo de imágenes se determinó el valor de la fluorescencia asociada a la identificación del NCX, estos datos se encuentran reflejados en la tabla 9.

Tabla 15. Test de Normalidad (Shapiro-Wilk)

Estadístico de Prueba (W)	Valor P (p)	Decisión
0,94	0,34	Acepta hipótesis de normalidad, en nivel 0,05

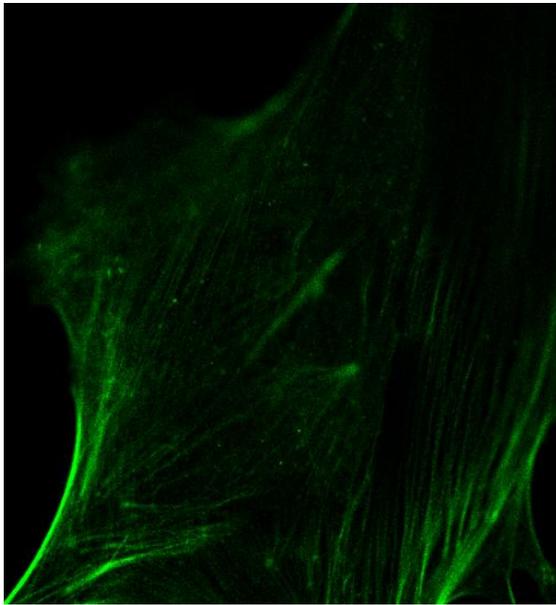
Datos calculados para un n>3

Tabla 16. Valores de la fluorescencia del NCX en experimentos con Jpk.

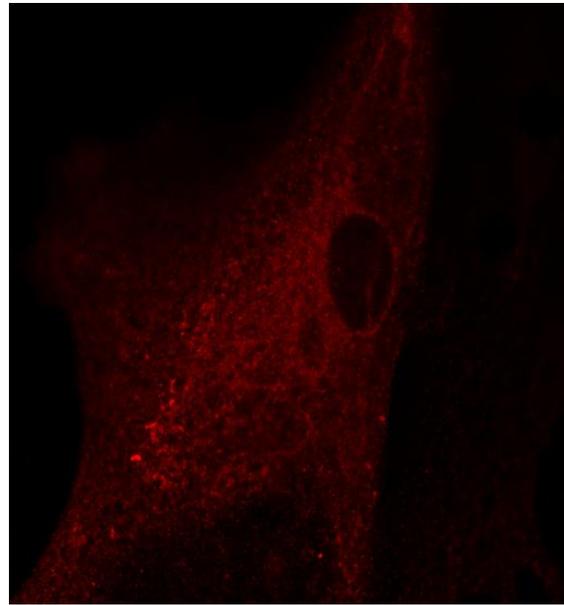
Media de Fluorescencia	Desviación estándar (SD)	Error estándar (SE)	Mínimo	Máximo
18,95	2,22	0,51	15	23

Datos calculados para un n>3

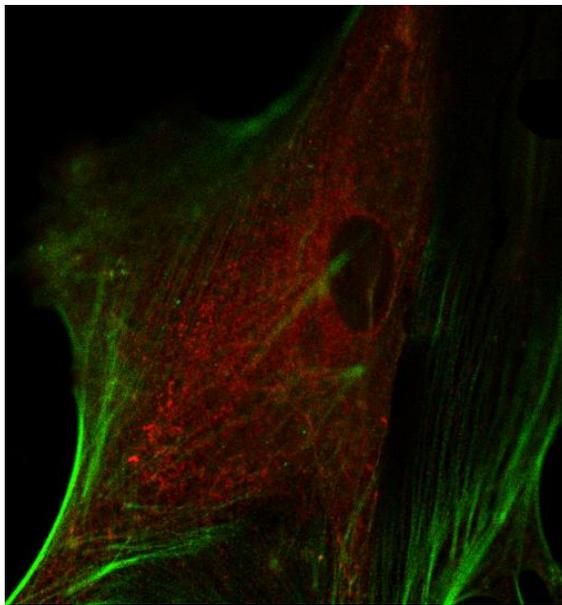
La imagen de doble fluorescencia 29-C), muestra regiones de color verde y rojo claramente definidas e independientes, lo que implica la ausencia de colocalización entre F-actina y el NCX; en este caso la fluorescencia roja que identifica la presencia de NCX, no presentó un aumento significativo. El cálculo de R indica una correlación débil, por ubicarse entre 0,2 y 0,4 (ver tabla 17).



A) Imagen de fluorescencia de F-actina en astrocitos t-1



B) Imagen de fluorescencia del NCX en astrocitos t-1



C) Imagen de doble fluorescencia que identifica los F-actina y el NCX en astrocitos t-1

Tabla 17. Nivel de colocalización, experimento con Jpk

Media de R	Desviación estándar (sd)
0,37	0,16

R: coeficiente de correlación de Pearson.
Datos calculados para un $n > 3$

Figura 29. Inmunomarcaje que identifica al NCX y los F-actina en astrocitos t-1, luego de tratamiento con Jasplakinolide (toxina polimerizante). Las imágenes **A)**, **B)** y **C)** obtenidas mediante microscopia confocal muestran el efecto del Jpk sobre los F-actina y el NCX, observando en la imagen **A)** preservación de la estructura de F-actina y de forma simultanea se aprecia que no hay modificación en la fluorescencia captada por el canal 2 (rojo), que identifica al NCX en la imagen **B)**; consideración que se hace tomando en cuenta la fluorescencia observada en la figura control. **C)** evalúa la colocalización.

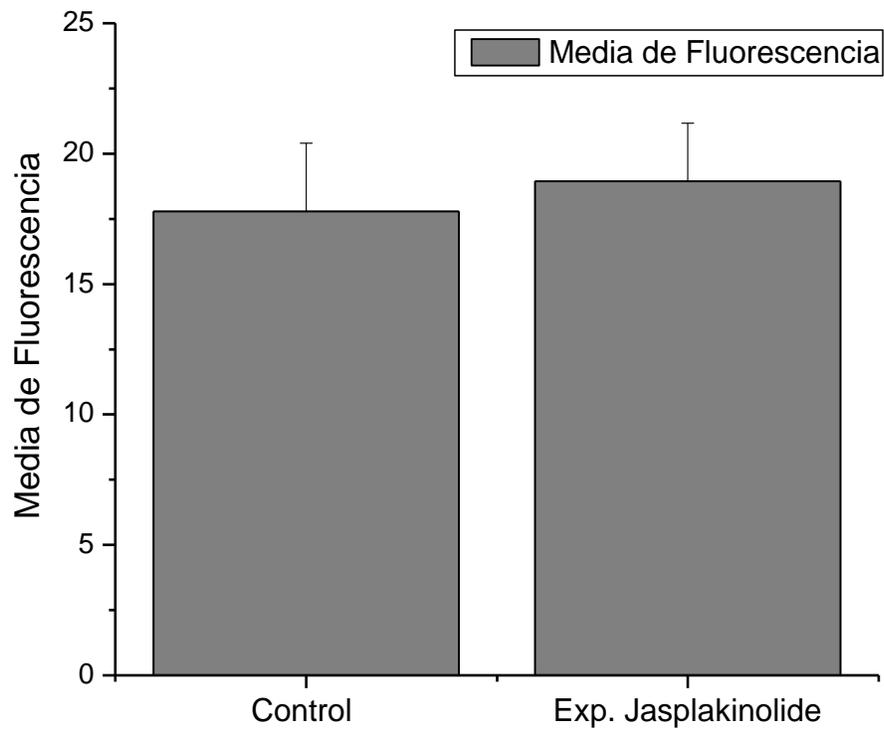


Figura 30. Comparación de la fluorescencia del NCX entre el experimento control y el experimento de polimerización con Jasplakinolide. Las barras representan la media + SD de la fluorescencia obtenida en los experimentos control y en presencia de Citocalasina D. Media del control= 17,79; media del experimento con citocalasina= 18,95.

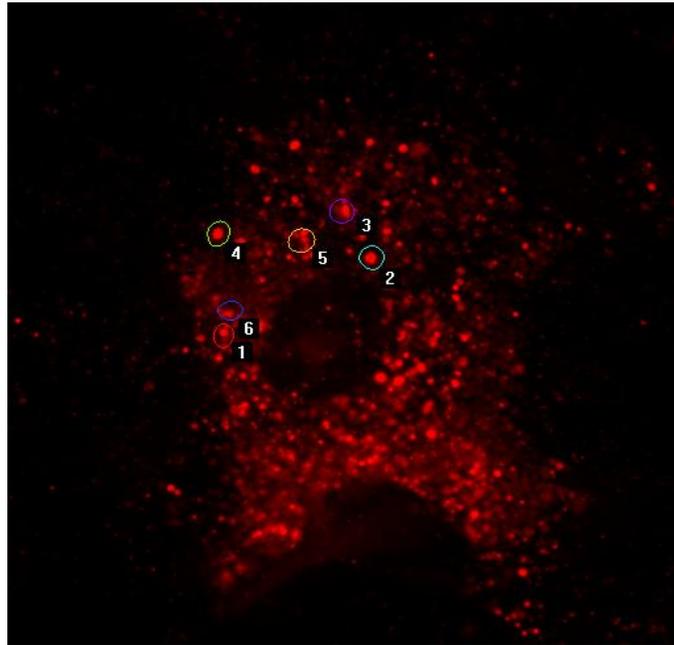
5.6. Determinación del aporte de Ca^{2+} proveniente del retículo endoplasmático (ER) frente a la despolimerización de filamentos de Actina.

Los resultados descritos a continuación corresponden a experimentos realizados con la técnica de escaneo láser de microscopía confocal (Laser Scanning Confocal Microscopy “LSCM”), en la cual el barrido de la preparación se realizó moviendo el haz de láser, sin mover el espécimen durante este proceso; esta técnica permitió monitorear la muestra viva y en consecuencia evaluar el contenido de Ca^{2+} dentro del ER, este ión fue identificado debido al uso del marcador Rhod-2AM, que debido a su baja afinidad por el Ca^{2+} marca principalmente en el ER, como reservorio de Ca^{2+} .

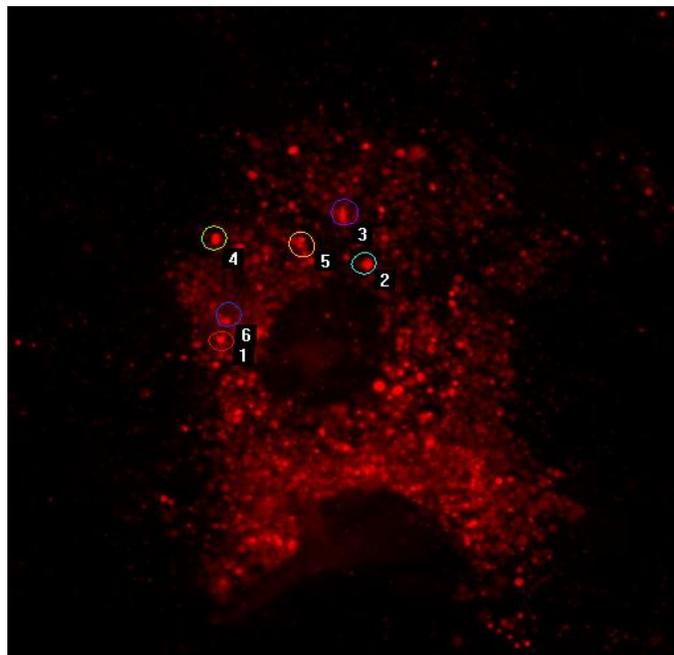
En este caso, las células cargadas con Rhod-2 fueron observadas mediante microscopía confocal, esta técnica permitió la captura de una imagen inicial o en $t=0$, en la cual se observaron pequeñas regiones con una alta fluorescencia, destacándose dentro de la célula. Esta primera imagen, figura 31-A), muestra 6 regiones que están identificadas con números y enmarcadas en círculos de diferentes colores, cada uno representativo de un reservorio de Ca^{2+} de tipo ER.

Las regiones seleccionadas fueron conservadas hasta el final del experimento ($t=10$ min), momento en el que se realizó la captura de la segunda imagen 31-B). En esta figura no se observan cambios en la fluorescencia de ninguna de las 6 regiones seleccionadas desde el inicio.

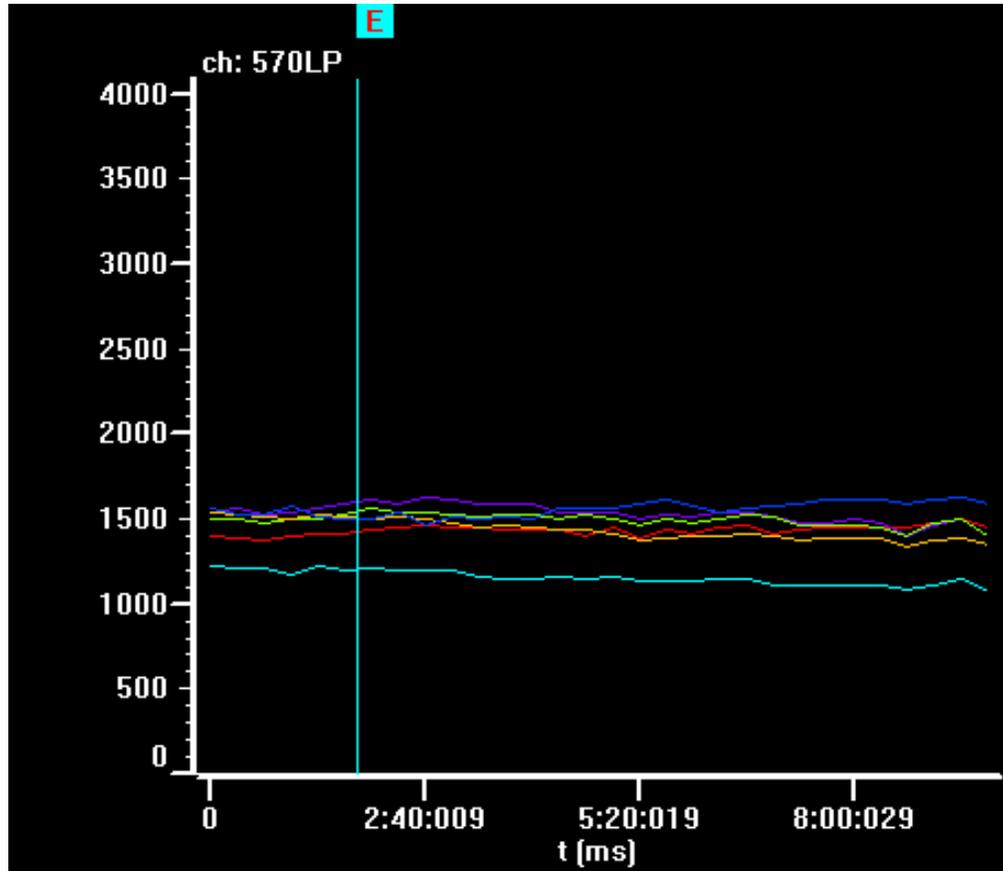
En la figura 31-C) se muestran los cambios de la fluorescencia durante el periodo de tiempo entre $t=0$ y $t=10$ min, que transcurrió en presencia de dos etapas de perfusión del medio extracelular, iniciando con un medio externo iso-NaCa, que no modifica la $[Ca^{2+}]_i$, lo que permitió identificar el nivel basal de la fluorescencia asociada al contenido del calcio de los reservorios. La línea vertical de color azul que se observa en la gráfica, indica el cambio del medio externo, el cual correspondió a una solución iso-NaCa con Latrunculina B $10 \mu M$, a un $t=2$ min; a partir de este tiempo y hasta finalizar el experimento se mantuvo la perfusión. En la gráfica se puede observar que el nivel de la fluorescencia se mantuvo en su mayoría constante, esto implica que no ocurre un vaciamiento del ER frente a la despolimerización ocasionada por la toxina LatB.



A) Astrocito t-1 cargado con Rhod-2 a t=0



B) Astrocito t-1 cargado con Rhod-2 a t=10min



C) Gráfica de la Fluorescencia: refleja los cambios en la fluorescencia de cada región señalada en las figuras A y B. Regiones 1- ●, 2- ●, 3- ●, 4- ●, 5- ●, 6- ●.

Figura 31. Determinación del aporte del Ca^{2+} proveniente del ER frente a la despolimerización de F-actina. En A y B se identifican 6 regiones circulares, cada una representativa de un ER. **A)** Imagen al inicio del experimento: luego de cargar al astrocito con Rhod-2 durante 2h, periodo requerido para lograr el depósito del marcador en el ER, estableciendo una asociación con el Ca^{2+} presente en dicho reservorio. **B)** Imagen al final del experimento, luego de perfundir la célula durante 8min con un medio iso-NaCa+LatB. La línea azul vertical indica el cambio de medio extracelular pasando de Iso-NaCa a iso-NaCa con Lat-B. **C)** Cada una de las 6 líneas horizontales dentro de la gráfica representan las variaciones en la fluorescencia emitida por el Rhod-2 (indicador de Ca^{2+}), contenido en cada una de las regiones identificadas en las imágenes A y B.

6. DISCUSIÓN.

Durante el último siglo, la función de los astrocitos se ha ampliado notablemente y hoy sabemos que desempeñan una función relevante en numerosos aspectos del desarrollo, el metabolismo y patologías del SNC, siendo decisivos en el soporte trófico y metabólico neuronal, la supervivencia, diferenciación y guía neuronal, el crecimiento neurítico y la sinaptogénesis; además, toman parte en la homeostasis cerebral regulando la concentración local de iones y sustancias neuroactivas (Perea y Araque, 2003).

En los últimos años ha surgido una nueva visión de la fisiología del SNC, donde las propiedades de excitabilidad y comunicación han dejado de ser función y propiedad exclusiva de las neuronas y en donde los astrocitos, que intercambian información recíprocamente con las neuronas, desempeñan un papel activo en el procesamiento de información del SNC.

La participación activa de los astrocitos en la fisiología del SNC se debe a su desempeño como regulador de la comunicación neuronal, ya que participan como células de señalización, donde las variaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ actúan como señal capaz propagarse a otros astrocitos y células adyacentes, con la consecuente liberación de neuropéptidos y antioxidantes.

Debido a la importancia de los astrocitos en el funcionamiento del SNC, a través de los años se han realizado diversas investigaciones que han identificado no solo al ión calcio como responsable de su señalización, sino además el estudio de los diferentes mecanismos asociados a la regulación de su concentración; cabe

destacar que la mayor parte de estas investigaciones corresponden a la última década del siglo XX, periodo en el que se desarrollaron nuevas y refinadas herramientas de estudio de la fisiología y biología celular.

Kimelberg y col. (1993), encontraron que el aumento de volumen de los astrocitos es un evento temprano en numerosos estados patológicos, tal como la isquemia cerebral, hiponatremia y encefalopatía hepática, resultado del incremento de K^+ y/o Glutamato extracelular o reducción de la osmolaridad extracelular. Además, el aumento de volumen en astrocitos induce procesos de transducción de señales dependientes de Ca^{2+} , resultando de gran importancia la homeostasis de dicho ión.

Posteriormente Rojas y col. (2004), demostraron por primera vez en astrocitos t-1 de cerebelo de rata, que la mayor parte del movimiento de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática es regulado por la actividad en sentido directo o reverso del intercambiador Na^+/Ca^{2+} ; hipótesis que se soporta en las siguientes observaciones: 1) en condiciones normales de temperatura y composición iónica, la eliminación de Na^+_e causa un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$, 2) la remoción de Ca^+_e en presencia de Na^+_e causa una importante caída en la $[Ca^{2+}]_i$, que es ausente en un medio con Li^+ o NMG^+ (N-metil-D-glucamina), 3) El KB-R7943 inhibidor de la actividad en modo reverso del NCX, imita el efecto de remoción de Ca^+_e solo en presencia de Na^+_e , y 4) en condiciones que elevan la $[Na^+]_i$ incrementa la actividad del NCX en modo reverso.

Partiendo del trabajo de Rojas y col. (2004) y continuando con el estudio del papel del NCX, sobre la regulación de Ca^{2+}_i en astrocitos t-1, la base para el desarrollo de esta investigación fue la obtención de cultivos primarios con alto contenido de astrocitos t-1. Es importante señalar que actualmente el uso de células *in vitro* representa una herramienta de gran utilidad, ya que permite desarrollar modelos experimentales cuyos resultados son altamente similares a los esperados en condiciones *in vivo* y pueden llegar a ser extrapolables a otros sistemas biológicos, de acuerdo al tipo y las características del sistema empleado para la práctica experimental.

Con el fin de obtener una alta purificación de astrocitos t-1, el cultivo primario se realizó de acuerdo al protocolo de: cultivo de astrocitos de rata de Lovelance y col. (2003), teniendo como variante el proceso de disección, el cual se realizó según el método para disección de neuronas de rata de Mintz y col. (1993). Para confirmar la alta purificación de astrocitos t-1, se realizaron dos pruebas de identificación: 1) inmunomarcaje de GFAP y 2) una prueba farmacológica con el péptido endotelina-3 (EDT-3).

6.1. Obtención de cultivos primarios de células gliales con “alta purificación” de Astrocitos t-1 e identificación inmunológica y farmacológica.

La identificación de astrocitos t-1 se basó en el reconocimiento de la proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP), que es una proteína de 50 kDa que constituye una parte del citoesqueleto de los astrocitos y se ha revelado como el marcador de

mayor especificidad para las células de origen astrocítico (Landis y Reese, 1981; Supattapone y col, 1989).

Al examinar las células mediante microscopia confocal, se observó un marcaje de color verde distribuido de manera uniforme en el citoplasma de la célula, característica de la emisión de fluorescencia a 517 nm del fluoróforo FITC previamente excitado por el láser a 490 nm. La respuesta positiva a este marcaje, no solo confirma la abundante presencia de astrocitos t-1 como se puede observar en la figura 11-A, además debido a la alta resolución de las imágenes, se puede apreciar claramente la morfología aplanada, poligonal y con abundante citoplasma propia de este tipo celular (Raff y col, 1983; Bustamante, 2007).

El control para este experimento basado en realizar el marcaje en ausencia del anticuerpo primario, evaluó la especificidad del anticuerpo conjugado y/o secundario por el anti-GFAP como se presenta en la figura 11-B; en este caso no se observó fluorescencia; indicando que el anticuerpo secundario no realizó reconocimiento debido a la ausencia del anticuerpo primario, confirmando así la especificidad de este marcaje para la identificación de células astrocitarias.

Debido a que la GFAP se encuentra presente tanto en astrocitos t-1 como t-2, fue necesario llevar a cabo una segunda prueba de identificación para astrocitos t-1 y determinar la abundancia de este tipo celular en los cultivos realizados, así como el nivel de purificación obtenido. Los astrocitos t-2 difieren morfológicamente de los t-1 por presentar ramificaciones más prolongadas y un citoplasma de menor tamaño (Verkhatsky y col, 1998), sin embargo, esta observación puede ser considerada en

ocasiones subjetiva, debido a la posición o forma que adquieren las células al adherirse a la superficie de los cubreobjetos. Considerando esta situación se realizó una identificación farmacológica, que permitió discernir entre uno u otro tipo celular, debido a su respuesta frente al péptido endotelina-3 (EDT-3).

El método de identificación farmacológica con EDT-3 permitió el reconocimiento de los astrocitos t-1, que responden con un incremento bifásico en la $[Ca^{2+}]_i$ frente al péptido; mientras los astrocitos t-2 no muestran una respuesta asociada a cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ (Supattapone y col, 1989; Koyoma y col, 1993).

De acuerdo a lo antes expuesto el rápido incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ observado en la figura 12 al incorporar el péptido EDT-3, se puede interpretar como una respuesta típica de los astrocitos t-1 frente al péptido, lo que permite identificar a este tipo celular dentro del cultivo. Como ha sido reportado anteriormente por Rojas y col. (2006), la apertura de los canales SOCE (entrada de calcio operado por reservorios) activados por la depleción de Ca^{2+} desde reservorios intracelulares, probablemente es el responsable del nivel de Ca^{2+}_i que se presenta de forma sostenida (“plateau” final), en la figura 13 frente al medio NaCa+EDT-3. El rápido descenso en la $[Ca^{2+}]_i$, frente al medio iso-osmótico Na0Ca presentado en la figura 13, es consecuencia de la activación del NCX en su modo directo, que se activa debido al desbalance en el flujo de Ca^{2+} generado por la remoción de Ca^{2+}_o y solo si está presente Na^+_o (Rojas y col, 2004), generando así la restauración del nivel de Ca^{2+} basal.

Respecto al aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ generado en presencia del medio externo iso-0Na0Ca+EDT-3 (figura 14), se observa que dicha concentración decae muy lentamente (120 s) en comparación con la señal de calcio generada frente a un medio que contiene Na^+ , Ca^{2+} y EDT-3 (~70 s, figura 13). Considerando que la remoción de Na^+_o y Ca^{2+}_o inhibe la actividad del NCX, es posible considerar la participación de otros mecanismos de eliminación como la bomba de Ca^{2+} de la membrana plasmática y/o de la mitocondria, cuya velocidad de transporte es menor que la del NCX; generando así un aporte de menor magnitud y en consecuencia un decaimiento más lento en la $[Ca^{2+}]_i$; similares con los resultados reportados por Rojas y col. (2004).

Nuestros resultados también indican que la reincorporación del Na^+_o y remoción de Ca^{2+}_o favoreció el descenso en la $[Ca^{2+}]_i$ (figura 14), lo que implica la restauración del gradiente de Na^+ hacia el interior celular y el desbalance en el flujo de Ca^{2+} , siendo de gran importancia la presencia de Na^+_o que activa el modo directo del NCX y en consecuencia la salida neta de Ca^{2+} (Blaustein y Lederer, 1999, citado por DiPolo y Beaugé, 2006). Seguidamente la remoción del Na^+_o e incorporación de Ca^{2+}_o indujo un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$, fenómeno asociado a la activación del modo reverso del NCX (remoción de Na^+_i por entrada de Ca^{2+}_o). Cabe destacar que la solución iso-0NaCa contiene Li^+ como sustituto del Na^+ y es utilizada como solución test para determinar la presencia del NCX en la membrana plasmática; por lo cual esta respuesta en la señal de Ca^{2+} confirma la presencia del contra-transportador Na^+/Ca^{2+} , presente de forma importante en astrocitos t-1 dentro del grupo de células astrocitarias (Supattapone y col, 1989).

Considerando el destacado papel que ha desempeñado el Na^+ sobre los cambios en la señal de Ca^{2+} presentados en nuestros resultados, se confirma que el mecanismo regulador de la concentración de dicho ión es dependiente de la energía almacenada en el gradiente electroquímico de Na^+ ; perfil que concuerda con el NCX como ha sido descrito por Nicoll y col. (1990) y Li y col. (1994); en este caso presente en astrocitos t-1.

Es importante señalar que cada gráfica es representativa de al menos la realización de tres experimentos, donde la unidad considerada para cada uno es una placa o cubre objetos donde se hallaban adheridas las células; encontrando que al menos 5 de cada 6 células evaluadas (83%) por experimento presentaban una respuesta como las mostrada en las graficas 12, 13 y 14.

Adicionalmente los resultados obtenidos en los experimentos 5.1 y 5.2, permiten puntualizar las siguientes observaciones: 1) El procedimiento de cultivo celular empleado para esta investigación, permite obtener una alta purificación de astrocitos t-1, 2) alta especificidad del anti-GFAP por la proteína acidíca fibrilar glial presente en astrocitos, 3) EDT-3 induce un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ manteniendo condiciones fisiológicas normales y frente a un bloqueo de la actividad en sentido directo y reverso del NCX, por lo cual este aumento puede estar asociado a otros procesos como depleción de Ca^{2+} desde reservorios intracelulares y/o función de otros mecanismo reguladores de Ca^{2+} .

6.2. Evaluación del efecto que tienen los cambios estructurales de los filamentos de actina en un medio hipotónico, sobre el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.

El mantenimiento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en astrocitos t-1 se encuentra asociado al funcionamiento de diversos mecanismos reguladores, como canales, bombas y tampones; sin embargo es conocido el papel que desempeña el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en este tipo celular, donde es el principal mecanismo regulador de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Rojas y col, 2004). Resulta particularmente interesante el hecho que en astrocitos la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ puede cambiar en respuesta a diferentes estímulos, entre ellos un shock hipo-osmótico (Fischer y col, 1997).

Los resultados presentados en la figura 15, apoyan el planteamiento anterior; donde la presencia de un medio hipo-osmótico libre de Na^+ y Ca^{2+} generó un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de aproximadamente 160 nM respecto al nivel basal, observado en presencia de un medio iso-osmótico con Na^+ y Ca^{2+} . De acuerdo a investigaciones previas como la realizada por Rojas y col. (2008), donde se observó este fenómeno en la señal de calcio frente a un medio hipo-osmótico, este incremento en el calcio citosólico es consecuencia de la liberación de Ca^{2+} desde reservorios intracelulares operados por receptores de ryanodina (RyRs). Cabe destacar que la magnitud de la señal de Ca^{2+} inducida por la hipo-tonicidad es controlada por la actividad del intercambiador operando en modo directo (Rojas y col, 2008), fenómeno que se evidencia en la figura 15, frente a un medio hipo-osmótico libre de Ca^{2+} donde el desbalance en la concentración de dicho ión, favorece el flujo de entrada de Na^+ por remoción de Ca^{2+} al exterior celular.

Adicionalmente se logro evidenciar que el proceso de vaciamiento de Ca^{2+} desde el ER que se produce frente a un medio hipo- $0\text{Na}0\text{Ca}$, se mantiene aun después de un tratamiento con CD (Figura 16), lo que parece indicar una independencia entre los cambios estructurales de F-actina y la liberación de Ca^{2+} desde el ER; encontrando una posible relación entre la osmolaridad de la célula y la depleción de Ca^{2+} a partir de este reservorio.

Con respecto a la relación entre el citoesqueleto de actina y el NCX, encontramos que la magnitud del aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ generado por la activación del modo reverso del NCX frente a un medio iso- 0NaCa , es incrementada en presencia de la despolimerización de F-actina (figura 17); lo que parece indicar una relación directa entre el NCX y el citoesqueleto de actina, en acuerdo con los resultados presentados por Condrescu y Reeves (2006), que señalan que cambios en el citoesqueleto de F-actina afectan la actividad del NCX. Cabe destacar que a pesar de la despolimerización de los F-actina, la restauración de las concentraciones de Na^+ y Ca^{2+} externo pueden revertir el aumento de Ca^{2+}_i hasta restablecer el nivel basal y posteriormente puede ser reactivado el modo reverso del NCX, generando un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (ver Figura 17).

Adicionalmente y luego de la despolimerización de los F-actina, nuestros resultados señalan que en condiciones de hiper-osmolaridad el nivel de Ca^{2+} basal no es modificado y muy importante, que en condiciones de hipo-tonicidad libre de Na^+ y Ca^{2+} se produce un aumento en la señal de calcio citosólico, que se ve considerablemente incrementado por la remoción de Na^+_o e incorporación de Ca^{2+}_o ; fenómeno generado por la activación del modo reverso del NCX (18-a y 18-b). La

magnitud alcanzada en la señal de Ca^{2+} parece indicar una mayor participación del NCX, hallazgo que parece concordar con el trabajo de Pedersen y col. (2001), donde señalan que eventos asociados a la transducción osmótica involucran la concentración de receptores en la superficie de la célula, capaces de participar en la regulación del volumen celular y otros eventos de señalización; que en nuestro caso corresponde a la regulación de Ca^{2+}_i y esto a su vez sugiere una interacción directa entre el citoesqueleto de F-actina y la actividad del NCX. (Yoneda y col, 2000).

Es importante destacar que a pesar del gran incremento que se produce en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$; esta puede ser revertida por la reincorporación de Na^+ y remoción de Ca^{2+} externo, que induce la actividad en modo directo del NCX y que además es posible la re-activación del modo reverso del NCX frente a un segundo shock hipotónico de tipo 0NaCa; todo en condiciones de despolimerización por acción de Citocalasina D (Figura 18-b).

En este trabajo al evaluar el efecto de la despolimerización utilizando Latrunculina B, cuyo efecto sobre los F-actina es menor que el generado por CD; encontramos el mismo patrón de cambio en la señal de Ca^{2+}_i : a) manteniéndose inalterada la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en un medio hipertónico con Na^+ y Ca^{2+} , b) incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en medio hipo 0Na0Ca, c) perfusión con medio hipo-0NaCa activa de manera importante el modo reverso del NCX, similar al encontrado con CD y d) medio hipo-0Na0Ca activa modo directo del NCX (Figura 19, 20 y 21).

De forma contraria el efecto de la polimerización de F-actina empleando la droga Jpk, parece carecer de efecto sobre la señal de Ca^{2+}_i (Figura 22 y 23),

encontrando que los aumentos en la $[Ca^{2+}]_i$ son semejantes a los reportados en ausencia de toxinas de actina, como se ha descrito en el trabajo de Rojas y col. (2008).

Dado que en este trabajo los resultados obtenidos mediante micro-espectrofluorimetría y perfusión, parecen indicar una relación entre la disrupción de los F-actina y un incremento en la participación del NCX, se realizaron inmunomarcajes de dicha proteína de membrana en condiciones iso-osmóticas empleando cada una de las toxinas de actina, que fueron observadas posteriormente a través de microscopía confocal con el fin de dilucidar si se produce o no un cambio sobre la actividad del NCX.

Los resultados de estos marcajes señalan que la despolimerización de F-actina inducida por CD, incrementa la fluorescencia asociada al marcaje del NCX presente en la membrana de los astrocitos t-1 (figura 24 y 25). Este cambio en el NCX se observa en las células tratadas con Lat B, sin embargo con el uso de este tratamiento la fluorescencia emitida es menor que con CD pero mayor respecto al marcaje control (figura 24 y 27). Nuestros hallazgos concuerdan con otros trabajos como el de Henson (1999), señalando que existe una dependencia entre los cambios de volumen celular, la organización estructural del citoesqueleto de actina y los transportadores de membrana, que se ve claramente identificada por el aumento en la fluorescencia asociada a la identificación del NCX frente a la despolimerización de los F-actina con CD y Lat B; así como en el aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ asociada al incremento en la actividad en modo reverso del NCX frente a un medio hipo-tónico, como se señala anteriormente.

Como señala Bretscher (1991), la interacción directa entre el citoesqueleto y los sistemas de transporte reguladores de volumen, puede estar dada por una simple función de anclaje para dichos transportadores; sin embargo, el incremento en la expresión y/o actividad del NCX, podría estar asociada a un proceso de inserción de proteínas transportadoras de membrana mediado por vesículas (Downey y col, 1995), donde el citoesqueleto desempeña un papel fundamental en la regulación de este proceso (Pedersen y col, 2001).

Un posible mecanismo de exocitosis o movimiento vesicular podría ser el responsable de la expresión del NCX en la membrana plasmática, como es reportado para los transportadores gliales que remueven glutamato, donde probablemente participa la exocitosis para su incorporación en la membrana plasmática de astrocitos de ratón (Cheng y col, 2002; Stenovec y col, 2007). Cabe desatacar que la entrega de vesículas a la membrana plasmática involucra una interacción con el citoesqueleto, en particular con microtúbulos y F-actina, donde los F-actina probablemente incrementan el tráfico de vesículas en astrocitos (Kreft y col, 2009).

Adicionalmente, las medidas de fluorescencia obtenidas en cada tratamiento mostraron una distribución normal de acuerdo al test de normalidad de Shapiro-Wilk, aceptando la hipótesis nula de normalidad en cada caso: Citocalasina ($p = 0,08981 > 0,05$), Latrunculina ($p = 0,45205 > 0,05$), Jasplakinolide ($p = 0,33828 > 0,05$) (ver tablas 6, 8 y 10). Respecto al marcaje correspondiente a la identificación del NCX, al calcular la media de fluorescencia en cada tratamiento y comparar dicho valor respecto al control, se encontró para Citocalasina un Δ fluorescencia ~ 10 unidades,

Δ Latrunculina~7 unidades y jasplakinolide Δ fluorescencia= 0,54 (ver figuras 26, 28 y 30); resultados que indican un considerable aumento en la fluorescencia asociada a la identificación del NCX en los astrocitos t-1 y en consecuencia confirman que el efecto de despolimerización del citoesqueleto tiene una relación directa con el NCX.

Considerando que el NCX es el principal mecanismo regulador de la $[Ca^{2+}]_i$ en astrocitos t-1 (Rojas y col, 2004) y que dicho ión se ha asociado frecuentemente con alteraciones en el volumen de la célula frente a cambios osmóticos (Foskett, 1994; Fischer y col, 1997); como choques hipo-tónicos que estimulan la actividad del NCX (Reeves y col, 2008; Rojas y col, 2008) y apoyado en nuestros resultados, podemos concluir que la alteración de tipo despolimerización o desdoblamiento de los F-actina probablemente son el mecanismo responsable de inducir una señal que incrementa la expresión y en consecuencia la participación del NCX en la regulación de la $[Ca^{2+}]_i$. Adicionalmente esta propuesta se ve apoyada por otros trabajos donde señalan que el incremento de volumen en diferentes tipos celulares conduce a cambios en la polimerización de los F-actina que podrían participar en la modulación de las funciones celulares por regulación o control del volumen celular, mediante la expresión de mecanismos reguladores de volumen como proteínas transportadoras o canales de membrana (Theodoropoulos y col, 1992; Mills y col, 1994).

Respecto a las alteraciones en los F-actina, estas pueden ser generadas en respuesta a la acción de toxinas de actina como Citocalasina D o Latrunculina B o por cambios de volumen inducidos por choques hipo-tónicos (Hallows y col. 1991). Esto indica que el NCX actúa como un sensor mecánico, donde su participación

como regulador de las $[Ca^{2+}]_i$; varía en respuesta a las alteraciones estructurales del citoesqueleto, asociadas a cambios de volumen (Reeves y col, 2008).

Respecto a los resultados obtenidos en la evaluación del doble marcaje, encontramos que tanto en la muestra control como la experimental en presencia de Jpk, el coeficiente de correlación de Pearson indica un nivel débil de correlación entre las variables, lo que implica una baja asociación entre el NCX y los F-actina; sin embargo, en condiciones de despolimerización el nivel de correlación es moderado, ubicado entre 0,4 y 0,6. Los resultados señalan que al producirse la despolimerización ocurre una reorganización en el citoesqueleto que conlleva a un incremento en la asociación con el NCX, que explica la relación directa entre ellos donde la disrupción de los F-actina induce un incremento en la participación y expresión del NCX.

6.3. Relación entre el aporte de Ca^{+2} proveniente del retículo endoplasmático (ER) frente a la polimerización de los filamentos de Actina.

Respecto al aporte de Ca^{2+} que genera la depleción de los reservorios intracelulares como el ER, resultó de gran interés, conocer si los cambios estructurales en el citoesqueleto de actina tienen relación con dichos reservorios.

Los resultados presentados en la figura 16 parecen indicar una independencia entre la liberación de Ca^{2+} y la despolimerización de F-actina; sin embargo otros trabajos han señalado que la alteración del citoesqueleto por CD genera una reorganización significativa en la membrana del ER capaz de alterar la relación espacial entre algunas proteínas, como receptores de IP3, fosfolipasa C y canales

de Ca^{2+} , presentes en dicha estructura (Pedrosa y col, 1997). Considerando esta discrepancia se planteo realizar la evaluación del Ca^{2+} contenido en el ER frente a la despolimerización del citoesqueleto de actina (figura 31), encontrando que durante este proceso de alteración estructural del citoesqueleto, no se produce la depleción de Ca^{2+} , resultado que parece indicar una independencia entre el Ca^{2+} presente en el ER y los F-actina, estableciendo que su liberación podría depender de forma directa de la osmolaridad de la célula.

7. CONCLUSIONES.

A partir del análisis de nuestros resultados y su comparación con lo previamente reportado, en este trabajo se presentan nuevos hallazgos sobre la relación entre el citoesqueleto de actina y la actividad del NCX, logrando concluir que:

- El test de EDT-3 y el inmunomarcaje con GFAP, son pruebas de alta especificidad para la identificación de astrocitos t-1.
- El gran incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ generada por la actividad en modo reverso del NCX, frente a un medio hipo-osmótico, indican que este contra-transportador es un sensor mecánico cuya actividad varía en respuesta a las alteraciones estructurales del citoesqueleto; inducidas por hipo-osmolaridad y simuladas con el uso de drogas despolimerizantes de los F-actina, como Citocalasina D o Latrunculina B.
- El incremento en el coeficiente de correlación entre el NCX y el citoesqueleto de actina, sugiere la existencia de una interacción directa entre ambas estructuras, donde los cambios generados en el citoesqueleto de actina aumentan la expresión del NCX.
- La polimerización de los F-actina inducida por la droga Jasplakinolide no genera cambios sobre la actividad del NCX.
- La liberación de Ca^{2+} desde el ER es un mecanismo independiente de la alteración de los F-actina.

8. BIBLIOGRAFIA

1. ALA Scientific Instruments Inc. 1993a. PTR-2000 Operating Instructions. New York-EE.UU.
2. ALA Scientific Instruments Inc. 1993b. PTR-2000 DAD-12 Superfusion System. New York-EE.UU.
3. Alvarez, F. y Reuss, L. 1996. Operación Orquestada de los sistemas de transporte a través de la membrana plasmática: regulación y mantenimiento del volumen celular. Capítulo 7. En Latorre, R., Lopez-Barneo, J., Bezanilla, F., Linás, R. Biofísica y Fisiología Celular. Editorial Universidad de Sevilla. Sevilla, España.
4. Araque, Alfonso. 2008. Astrocytes process synaptic information. *Neuron Glia Biology*. **4**: 3-10.
5. Berridge, M.J., Lipp, P., Bootman, M.D. 2000. The versatility and universality of calcium signaling. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **1**: 11-21.
6. Berridge, M.J., Bootman, M.D., Roderick, L. 2003. Calcium signaling: dynamics, homeostasis and remodeling. *Nat. Rev. Mol. Cell. Bio.* **4**: 517-529.
7. Bourke, R.S., Kimelberg, H.K., Nelson, L.R., Barron, K.D., Auen, E., Poop, A., Waldman, J. 1980. Biology of glia swelling in experimental brain edema. *Adv. Neurol.* **28**: 99-109.
8. Bretscher, A. 1991. Microfilament structure and function in the cortical cytoskeleton. *Annu. Rev. Cell Biol.* **7**: 337-374.
9. Brown, S.S. y Spudich J.A. 1981. Mechanism of action by cytochalasin: evidence that it binds to actin filament ends. *J. Cell. Biol.* **88**: 487-491.

10. Bubb, M.R., Senderowicz, A.M., Sausville, E.A., Duncan, K.L., Korn, E.D. 1994. Jasplakinolide, a Cytotoxic Natural Product, Induces Actin Polymerization and Competitively Inhibits the Binding of Phalloidin to F-actin. *J. Biol. Chem.* **269** (21): 14869- 14871.
11. Bubb, M.R., Spector, I., Beyer, B.B., Fosen, K.M. 2000. Effects of Jasplakinolide on the Kinetics of Actin Polymerization. An explanation for certain *in vivo* observations. *J. Biol. Chem.* **257**: 5163- 5170.
12. Bustamante, E. 2007. El sistema nervioso: desde las neuronas hasta el cerebro humano. Editorial Universidad de Antioquia, Primera Edición, Medellín, Colombia.
13. Brini, M., Carafoli, E. 2000. Calcium signaling: a historical, recent developments and future perspectives. *Cell Mol. Life Sci.* **57**: 354-370.
14. Carafoli, E. 2002. Calcium signalling: A tale for all seasons. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**: 1115-1122.
15. Catterall, W.A., Perez-Reyes, E., Snutch, T.P., Striessing, J. 2005. International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Calcium Channels. *Pharmacol. Rev.* **4**: 411-425.
16. Cheng, C., Glover, G., Banker, G., Amara, S. 2002. A novel sorting motif in the glutamate transporter excitatory amino acid transporter 3 directs its targeting in Madin-Darby canine kidney cells and hippocampal neurons. *J. Neurosci.* **22**: 10643-10652.
17. Clapham, D.E. 2007. Calcium Signaling. *Cell.* **131**:1047-1058.

18. Cooper J.A. 1987. Effects of Cytochalasin and Phalloidin on Actin. *J. Cell Biol.* **105**: 1473-1478.
19. Cornet, M., Delpire, E., Gilles, R. 1988. Relations between cell volume control, microfilaments and microtubules networks in T2 and PC12 cultured cells. *J. Physiol. (Paris)*. **83**:43-9.
20. Cornet, M., Ubl, J., Kolb, H.A. 1993. Cytoskeleton and ion movements during volume regulation in cultured PC12 cells. *J. Membr. Biol.* **133**: 161-170.
21. Cramer, L. P. 1999. Role of actin-filament disassembly in lamellipodium protrusion in motile cells revealed using the drug jasplakinolide. *Curr.Biol.* **9**: 1095-1105.
22. Dieguez, L.F. 2008. Implicación de los filamentos de actina en la arquitectura, homeostasis y tráfico de salida del aparato de Golgi y estudio de la formación y degradación de un agregosoma de actina. Tesis de Doctorado, Universidad de Barcelona. Barcelona, España.
23. DiPolo, R. 1978. Ca^{2+} pump driven by ATP in squid axons. *Nature*. **274**: 390-392.
24. DiPolo, R. 1996. Homeóstasis Intracelular del Calcio Iónico. Capítulo 6. En Latorre, R., Lopez-Barneo, J., Bezanilla, F., Linás, R. *Biofísica y Fisiología Celular*. Editorial Universidad de Sevilla. Sevilla, España.
25. DiPolo, R y Beaugé, L. 1979. Physiological role of ATP-driven calcium pump in squid axons. *Nature*. **278**: 271-273.

26. DiPolo, R y Beaugé, L. 2006. Sodium/Calcium Exchanger: Influence of Metabolic Regulation on Ion Carrier Interactions. *Physiol. Rev.* **86**: 155-203.
27. Doussau, F., Agustine, J.G. 2000. The actin cytoskeleton and neurotransmitter release: An overview. *Biochimie.* **82**: 353-363.
28. Downey, G.P., Grinstein, S., Sue, A., Czaban, B., Chan, C. 1995. Volume regulation in leukocytes: requirement for an intact cytoskeleton. *J. Cell Physiol.* **163**: 96-104.
29. Fan J., Mansfield, S.G., Redmond, T., Gordon-Weeks, P. R., Raper, J.A. 1993. The Organization of F-Actin and Microtubules in Growth Cones Exposed to a Brain-derived Collapsing Factor. *J. Cell. Biol.* **121**: 867-878.
30. Fischer, R., Schliess, F., Häussinger, D. 1997. Characterization of the Hypo-Osmolarity-Induced Ca²⁺ Response in Cultured Rat Astrocytes. *Glia.* **20**:51-58.
31. Flanagan, M.D. y Lin S. 1980. Cytochalasins block actin filament elongation by binding to high affinity sites associated with F-actin. *J. Biol. Chem.* **255**: 835-838.
32. Foskett, J.K. 1994. The Role of Calcium in the control of Volume-Regulatory Transport Pathways. Chapter 15. En Cellular and molecular physiology of cell volume regulation. EE.UU.
33. García, O., Massieu, L. 2004. Interacción entre las células gliales y neuronales y su papel en la muerte y sobrevivencia neuronal. *Arch. Neurocién.* **9**:39-46.

34. Guyton Arthur C. y Hall John E. 2005. Textbook of medical physiology. 11 edition. ELSEVIER Science. Missouri. EE.UU.
35. Hallows, K.R., Packman, C.H., Knauf, P.A. 1991. Acute cell volume changes in anisotonic media affect F-actin content of HL-60 cells. *Am. J. Physiol.* **261**: 1154-1161.
36. Henson, J.H. 1999. Relationships between the actin cytoskeleton and cell volume regulation. *Microsc. Res. Tech.* **47**: 155-62.
37. Hewavitharana, T., Deng, X., Soboloff, J., Gill, D.L. 2007. Role of STIM and Orai proteins in the store-operated calcium signaling pathway. *Cell Calcium.* **2**: 173-182.
38. Kardos, R., Vig, A., Orbán, J., Hild, G., Nyitrai, M., Lórinçzy, D. 2007. The effect of *jasplakinolide* on the thermodynamic properties of ADP.BeF_x bound actin filaments. *Acta Thermochimica.* **463**: 77–80.
39. Kreft, M., Potokar, M., Stenovec, M., Pangrsic, T., Zorec, R. 2009. Regulated Exocytosis and Vesicle Trafficking in Astrocytes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1152**: 30-42.
40. Koyoma, Y., Ishibashi, T., Hayata, K., Baba, A. 1993. Endothelins modulate dibutyryl cAMP-induced stellation of cultured astrocytes. *Brain Reserch.* **600**: 81-88.

41. Landis, D. y Reese, T. 1981. Membrane structure in mammalian astrocytes: a review of freeze-fracture studies on adult, developing, reactive and cultured astrocytes. *J. exp. Biol.* **95**:35-48.
42. Li, Z., Matsuoka, S., Hryshkot, L.V., Nicoll, D.A., Bersohn, M.M., Burke, E.P., Lifton, R.P., Philipson, K.D. 1994. Cloning of the NCX2 Isoform of the Plasma Membrane Na⁺-Ca²⁺ Exchanger. *J. Biol. Chem.* **269**: 17434-17439.
43. Linshaw, M.A., Fogel, C.A., Downey, G.P., Koo, E.W., Gotlieb, A.I. 1992. Role of cytoskeleton in volume regulation of rabbit proximal tubule in dilute medium. *Am. J. Renal Physiol.* **262**: F144-F150.
44. Long, D.M. 1982. Traumatic brain edema. *Clin. Neurosurg.* **29**: 174-202.
45. Maragakis, N.J y Rothstein, J.D. 2006. Mechanisms of Disease: Astrocytes in Neurodegenerative Disease. *Nat Clin Pract Neurol.* **2**:679-689.
46. McCormack, J.G., Cobbold, P.H. 1991. Cellular Calcium: A practical Approach. Series Editors: D. Rickwood and B.D. Hames. New York, United States.
47. Mills, J.W., Scwiebert, E.M., Stanton, B. 1994. Evidence for the role of actin filaments in regulating cell swelling. *J. Exp. Zool.* **268**: 111-120.
48. Moligner, A., Oster, G. 1996. Cell Motility Driven by Actin Polymerization. *Biophys. J.* **71**: 3030-3045.
49. Montuenga, B.L., Ruiz, F.J., Calvo, A. 2009. Técnicas de Histología y Biología Celular. Elsevier Masson. Barcelona. España.

50. Nicoll, D.A., Longoni, S., Phillipson, K.D. 1990. Molecular cloning and functional expression of the cardiac sarcolemmal Na⁺-Ca²⁺ exchanger. *Science*. **250**:562-565.
51. Pedersen, S.F., Hoffmann, E.K., Mills, J.W. 2001. The cytoskeleton and cell volume regulation. *Comp. Biochem. Phys. A*. **130**: 385-399.
52. Pedrosa, R., C.M., Reece, J., Putney Jr., J.W. 1997. Role of the cytoskeleton in calcium signaling in NIH 3T3 cells. *J. Biol. Chem.* **272**: 26555-26561.
53. Raff, M., Abney, E., Cohen, J., Lindsay, R., Noble, M. 1983. Two types of astrocytes in cultures of developing rat white matter: differences in morphology, surface gangliosides, and growth characteristics. *J. Neurosci.* **3**:1289-1300.
54. Reeves, J., Abdellatif, M., Condrescu, M. 2008. The sodium-calcium exchanger is a mechanosensitive transporter. *J. Physiol.* **586**. 1549-1563.
55. Rafols, J.A., Krause G.S. 2000. Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *J. Neurol. Sci.* **179**:1-33.
56. Rojas, H., Ramos, M., Mijares, A., DiPolo, R. 2003. Role of Na⁺/Ca²⁺ Exchange in Clearance in Rat Culture in Rat Culture Purkinje Neurons Requires Reevaluation. *Jpn. J. Physiol. Sci.* **53**: 259-269.
57. Rojas, H., Ramos, M., DiPolo, R. 2004. A Genistein-Sensitive Na⁺/Ca²⁺ Exchange Is Responsible for the Resting [Ca²⁺]_i and Most of the Ca²⁺ Plasma Membrane Fluxes in Stimulated Rat Cerebellar Type 1 Astrocytes. *Jpn. J. Physiol.* **54**: 249-262.

58. Rojas, H., Ramos, M., Benaim, G., Caputo, C., DiPolo, R. 2008. The Activity of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Exchanger Largely Modulates the Signal by Hypo-Osmotic Stress in Rat Cerebellar Astrocytes. The Effect of Osmolarity on Exchange Activity. *J. Physiol. Sci.* **58**: 277-290.
59. Schliwa, M. 1982. Action of cytochalasin D on cytoskeletal networks. *J. Cell. Biol.* **92**: 79-91.
60. Sergeeva, M., UBL, J.J., Reiser, G. 2000. Disruption of actin cytoskeleton in cultured rat astrocytes suppresses ATP- and Bradykinin-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ oscillations by reducing the coupling efficiency between Ca^{2+} release, capacitive Ca^{2+} entry, and store refilling. *Neuroscience.* **97**: 765-769.
61. Snutch, T.P., Leonard, J.P., Gilbert, M.M., Lester, H.A., Davidson, N. 1990. Rat brain expresses a heterogeneous family of calcium channels. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**: 3391-3395.
62. Spector, I., Shochet, N. R., Blasberger, D., Kashman, Y. 1989. Latrunculins- novel marine macrolides that disrupt microfilament organization and affect cell growth: I. Comparison with cytochalasin D. *Cell Motility and the Cytoskeleton.* *J. Physiol.* **13**: 127-144.
63. Stenovec, M., Kreft, M., Grilc, S., Potokar, M., Kreft, M., Pangrsic, T., Zorec, R. 2007. Ca^{2+} -dependent mobility of vesicles capturing anti-VGLUT1 antibodies. *Exp. Cell. Res.* **313**: 3809-3818.

64. Supattapone, S., Simpson, A., Ashley C. 1989. Free calcium rise and mitogenesis in glial cells caused by endothelin. *Biochem. Bioph. Res. Co.* **165**: 1115-1122.
65. Theodoropoulos, P., Stournaras, C., Stoll, B., Markogiannakis, E., Lang, F., GravAnis, A., Häussinger, D. 1992. Hepatocyte swelling leads to rapid decrease of the G-total actin ratio and increases actin mRNA levels. *FEBS.* **311**: 241-245.
66. Torsten, L. 2004. Cranial Osteopathy. Principles and Practice. Edition 2. ELSEVIER Churchill Livingstone. EE.UU.
67. Verkhratsky, A., Orkand, R.K., Kettenmann, H. 1998. Glial Calcium: Homeostasis and Signaling Function. *Physiological Reviews.* **78**: 99-141.
68. Wakatsuki, T., Schwab, B., Thompson, N.C., Elson, E.L. 2000. Effects of cytochalasin D and latrunculin B on mechanical properties of cells. *J. Cell Sci.* **114**: 1025-1036.
69. Weber, K y Glenney, J.R.Jr. 1982. Calcium-modulated Multifunctional Proteins Regulating F-Actin Organization. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **46**: 541-552.
70. White, B.C., Sullivan, J.M., DeGracia, D.J., O'Neil, B.J., Neumar, R.W., Grossman LI., Rafols, J.A., Krause, G.S. 2000. Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *J. Neurol. Sci.* **179**: 1-33.
71. Yoneda, M., Nishizaki, K., Tasaka, K., Kurachi, H., Miyake, A., Murata, Y. 2000. Changes in actin network durin calcium-induced exocytosis in permeabilized

GH3 cells: calcium directly regulates F-actin disassembly. *J. Endocrinol.* **166**: 677-687.

Consultas en línea:

72. Díaz-Horta, O. El ión calcio: su regulación y función en la célula β -pancreática. *Rev. Cubana Endocrinol.* 14(3), 2003. Fecha de Ingreso a la pág.: 28/01/2009. http://www.bvs.sld.cu/revistas/end/vol14_3_03/end08303.htm.
73. Duarte Rodrigo. Microscopio de Epifluorescencia. Universidad de la República. Facultad de Ingeniería. Instituto de Ingeniería Eléctrica. Grupo de Tratamiento de Imágenes. Uruguay 2007. Fecha de Ingreso a la pág.: 28/01/2009. <http://iie.fing.edu.uy/investigacion/grupos/gti/timag/trabajos/2007/proteus/epifluorescencia.html>.
74. Reina M. Conceptos de Inmunocitoquímica: Microscopio de Fluorescencia. Universidad de Barcelona. Web de Biología Celular. Barcelona-España. 2003. Fecha de Ingreso a la pág.: 20/04/2009. http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/principio_microscopia_fluorescencia.htm
75. Universidad de Uvigo. Escuela de Inmunología. Actina. Fecha de Ingreso a la pág.: 22/10/2009. <http://webs.uvigo.es/mmgias/5-celulas/7-actina.php>
76. SIGMA. Catalogo de Productos. Citocalasina D. Fecha de Ingreso a la pág.: 12/09/2009. http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?N4=C8273%7CSIGMA&N5=Product%20No.%7CBRAND_KEY&F=SPEC

77. SIGMA. Catalogo de Productos. Latrunculina B. Fecha de Ingreso a la pág.: 12/09/2009.

http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?D7=0&N5=Product%20No.%7CBRAND_KEY&N4=L5288%7CSIGMA&N25=0&QS=ON&F=SPEC

78. The University of Edinburgh. School of Biomedical Sciences. Jasplakinolide.

Fecha de Ingreso a la pág.: 22/10/2009.

<http://www.bms.ed.ac.uk/research/others/smaciver/encyclop/Abp-j/jasplakinolide.htm>