

106
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Biología

"CANALES IONICOS MECANOSENSIBLES
EN ASTROCITOS CULTIVADOS DEL
CEREBELO DE RATA"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A I

LEON DAVID ISLAS SUAREZ



MEXICO, D.F.

NOVIEMBRE DE 1992

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

INDICE

INTRODUCCION	3
Transducción y transporte en la membrana plasmática.....	3
Propiedades de los canales iónicos.....	5
Canales mecanosensibles.....	14
Canales iónicos en los astrocitos.....	17
Regulación del volumen celular.....	20
OBJETIVOS	22
MATERIALES Y METODOS	23
Obtención de cultivos primarios.....	23
Electrofisiología.....	23
Soluciones.....	26
RESULTADOS	27
Expresión de canales en astrocitos cerebelares.....	27
Canales mecanosensibles en astrocitos cerebelares de rata en cultivo primario.....	28
DISCUSION	35
CONCLUSIONES	45
REFERENCIAS	46
AGRADECIMIENTOS	52

INTRODUCCION

Transducción y transporte en la membrana plasmática.

La membrana plasmática es una estructura de fundamental importancia para el funcionamiento normal de las células, entre sus principales funciones se cuentan el transporte de sustancias dentro y fuera de la célula y la transducción de señales externas.

Generalmente, estas dos funciones son realizadas por estructuras discretas y distintas de la membrana; el transporte es un fenómeno que ocurre mediado por dos tipos diferentes de proteínas membranales: a) los transportadores y b) los canales iónicos, siendo una de las principales diferencias entre los dos sistemas la velocidad con que realizan el transporte; los canales iónicos catalizan el flujo de iones a altas velocidades, de el orden de 10^7 a 10^8 iones/s, mientras que los transportadores tienen números de recambio bajos; el intercambiador Na-K transporta alrededor de 500 iones Na⁺/s (Moczydlowski, 1986). La función de los transportadores depende estrictamente del suministro de energía metabólica, es decir de ATP, mientras que los canales iónicos funcionan independientemente del estado energético de la célula y dependen de la energía libre almacenada en el gradiente electroquímico de los iones para transportarlos -o sea, de las diferencias de concentración de los iones en ambas caras de la membrana plasmática y de la diferencia de potencial eléctrico a través de la misma- y del potencial de membrana o de la interacción con un ligando para activarse. Este hecho se refleja en las

dependencias de temperatura; la conductancia de los canales tiene un $Q_{10} = 1.3-1.6$ cercano a la difusión en agua, mientras que los transportadores tienen Q_{10} cercanos a 3.0.

La transducción, por el contrario, es una función llevada a cabo por receptores específicos de membrana, generalmente acoplados a un sistema complejo de enzimas membranales que constituyen la maquinaria que convierte la señal recibida por el receptor en un mensaje intracelular (como el sistema de proteínas G, los de nucleótidos cíclicos o los fosfoinosítidos).

No obstante muchos de los receptores funcionan ellos mismos como canales iónicos, convirtiendo la recepción del mensaje extracelular en un flujo rápido de iones; este flujo es el resultado directo de la transducción y es útil para la señalización a través de los cambios en el potencial de membrana de que son responsables (Hille, 1992).

En general, los canales iónicos que tienen un papel directo en la transducción de señales externas, funcionan en una escala de tiempo muy corta, del orden de milisegundos y han evolucionado para dar respuestas rápidas a estímulos mediados por sustancias químicas; tal es el modo de funcionar de las sinapsis químicas. Esta forma de transducción es bastante bien conocida y se halla en la base del funcionamiento de los sistemas nerviosos. (Kuffler et al., 1984).

Un segundo tipo de transducción rápida mediada por canales iónicos y que se ha reconocido como tal desde hace poco tiempo (Sachs, 1991), es la transducción de señales mecánicas y los canales

involucrados en ella han recibido el nombre genérico de canales mecanosensibles o mecanotransductores (Morris, 1990).

Propiedades de los canales iónicos.

La gran mayoría de los fenómenos que ocurren en la membrana plasmática están dominados por los canales iónicos. Estos son proteínas oligoméricas transmembranales que permiten y regulan el paso de solutos ionizados dentro y fuera de la célula. La estructura más simple para un canal, es la de una proteína que forma un poro en su interior y se encuentra embebida en la membrana. El poro comunica los espacios intra y extracelular; en general, este poro está alineado por residuos de aminoácidos con carga o por grupos funcionales que se comportan como dipolos eléctricos, lo que le confiere a los canales la propiedad de admitir en su interior moléculas ionizadas de diversos tamaños y cargas por interacción electrostática. La capacidad que tiene un canal para permitir la entrada diferencial de iones de distinto tamaño y carga se denomina selectividad iónica y está determinada por la organización molecular de la región del poro, es decir, el diámetro del poro, los sitios con carga dentro del mismo, su longitud, etc. y por las propiedades físicas de los iones.

La selectividad iónica de un canal no es un fenómeno todo o nada, por ejemplo, un canal que es selectivamente permeable al ión potasio también permite el paso de otros cationes monovalentes y divalentes, pero con mayor o menor facilidad con respecto al

potasio, sin excluirlos del todo. La facilidad con que un determinado ión permea, se puede cuantificar mediante una medida que se denomina coeficiente de permeabilidad y que es una propiedad específica para cada ión y de cada canal iónico. Existen varias definiciones de la permeabilidad las cuales dependen del tipo de suposiciones que se hagan para describir el proceso de permeación de los iones a través del canal. La más simple se obtiene cuando se supone que los iones atraviesan el canal debido a la suma de la energía almacenada en el gradiente de concentración y en la diferencia de potencial eléctrico transmembranal a lo que se denomina electrodifusión. La definición de permeabilidad a la que se llega es la siguiente: $P = D\beta/l$.

Donde D es el coeficiente de difusión, β es el coeficiente de partición del ion en un lípido y l es la longitud del canal.

Una de las explicaciones más sencillas de por qué la permeabilidad es selectiva se basa en dos suposiciones básicas; a) que las diferentes permeabilidades a distintos iones de un mismo canal se deben a sus diferentes velocidades de movimiento en agua, (caracterizadas por el coeficiente de difusión) y a que tienen distintas solubilidades en agua (coeficientes de partición), y b) que el movimiento de los iones dentro del canal es cualitativamente igual a la difusión en solución acuosa. Bajo las suposiciones anteriores, se aplica la teoría de la electrodifusión de Nernst-Planck, que predice relaciones cuantitativas entre la corriente iónica (flujo) y el voltaje y los flujos unidireccionales del ion que lleva la carga, que se pueden resumir en el principio de

independencia (Hille, 1992), que predice que los iones se mueven dentro del canal sin interactuar entre sí, ni con el canal. Sin embargo, se conocen una serie de fenómenos en prácticamente todos los canales, que violan las predicciones del principio de independencia y que se pueden explicar satisfactoriamente si se considera que los iones interactúan, por lo menos, con sitios dentro del canal y muchos otros no se pueden explicar si no es suponiendo que los iones interactúan entre sí además de sitios del canal, mientras permean.

Si se considera que los iones interactúan con un sitio de carga neta dentro de la luz del canal, las permeabilidades relativas de los iones que un canal permite permear, dependen, en el caso más general, de la diferencia entre la energía de hidratación del ion (esta es una medida de que tan fuertemente interactúa una molécula ionizada con las moléculas del agua en que está disuelta) en una solución de no muy alta fuerza iónica y la energía del proceso de adsorción del mismo ión a un sitio cualquiera de carga neta dentro del canal. Esta diferencia es una función del radio cristalino del ión permeante y de la carga eléctrica del sitio de interacción del interior del canal. Para una sola carga fija y constante y para un diámetro del poro mayor que dos veces el radio del ión hidratado, la relación entre el radio cristalino de Pauling y la diferencia de energía en cuestión determina todas las secuencias de permeabilidad conocidas para prácticamente todos los canales iónicos (Hille, 1992). Esta explicación fenomenológica de la selectividad iónica en un canal,

es válida no sólo para los cationes monovalentes, sino también para los aniones de la serie liotrópica y para muchos cationes orgánicos de mayor tamaño que los cationes alcalinos.

Ya que la selectividad iónica se puede explicar en términos de las interacciones de los iones con el canal, otros fenómenos se deben poder explicar con los mismos conceptos; los movimientos del ión dentro del canal pasando entre estos sitios, se pueden entender como un proceso de unión y desunión a los sitios cargados, que depende del escalamiento de barreras energéticas que son más o menos constantes en función del tiempo y son una propiedad de los sitios de unión determinada por la arquitectura molecular del canal iónico en cuestión, las barreras energéticas son por el contrario funciones de la diferencia de potencial eléctrico a través del canal y de la especie iónica que acarrea la carga, por lo que la magnitud de los flujos de iones mediados por el canal, es también una función del potencial eléctrico y varían de acuerdo al ión que lleva la corriente, determinando así la forma general de la relación entre el voltaje transmembranal y la corriente a través del canal. A esta relación se le denomina curva corriente voltaje (I-V) y es una de las mejores maneras de caracterizar la permeabilidad de los canales iónicos. Estas conclusiones generales sobre el mecanismo del transporte de iones en el canal, han permitido estudiar el transporte de solutos por los canales iónicos con las herramientas de la teoría cinética de Eyring, que caracteriza la corriente iónica como una función de las constantes de velocidad del proceso de "salto" sobre barreras energéticas y

considera a su vez que éstas son funciones del voltaje, y no solo con las aproximaciones basadas en la electrodifusión.

En los párrafos anteriores se ha explicado como ocurre el paso de un soluto en un canal iónico que no presenta más limitaciones al paso de los iones que las de la selectividad, es decir, se ha supuesto que el canal permanece con las aperturas a los lados citoplásmico y extracelular no obstruidas por ningún agente, ya sea inherente o extraño a la estructura del canal, sin embargo, una de las características de los canales iónicos es que permiten el paso de iones pero también lo regulan en muy diferentes maneras.

La gran mayoría de los canales iónicos, con excepción quizás de algunos tipos de uniones comunicantes, están contruidos de forma tal que poseen estructuras que les permiten interrumpir la continuidad entre los ambientes citoplásmico y extracelular de la membrana y, así, controlar la corriente que pasa a través de ellos, estas estructuras se denominan genéricamente compuertas, y se han conceptualizado como verdaderas puertas de acceso, aunque se conozca pobremente su construcción molecular. La posición espacial de las compuertas le confieren al canal, en el más sencillo de los casos, dos posibles conformaciones con respecto al paso de iones, conductora o abierta y no conductora o cerrada, de esta forma el canal fluctúa entre las conformaciones permitiendo el flujo iónico si está en el estado abierto e impidiéndolo si está en el estado cerrado; la frecuencia a la que ocurren las fluctuaciones, es una función de algún factor fisiológico como el voltaje (potencial de

membrana), la interacción en una región extracelular especializada con algunas moléculas, en el caso de canales-receptores, la interacción con moléculas pequeñas y enzimas solubilizadas en el citoplasma o insertadas en la membrana, como ocurre en los fenómenos de modulación de los canales y finalmente el grado de tensión tangencial de la membrana plasmática, en el caso de los canales mecanosensibles. Si se supone que las frecuencias de la transición del estado cerrado al estado abierto están en equilibrio, entonces la proporción de canales abiertos y la de canales cerrados están dadas por la distribución de Boltzmann y por lo tanto el cociente entre la cantidad de canales abiertos y el total de canales, es una función sigmoideal del estímulo que provoca la transición al estado abierto del canal, sea éste el voltaje, la concentración del agonista o la tensión.

Cuando se examinan las corrientes generadas por un gran número de canales abiertos o corrientes macroscópicas, es posible determinar la proporción de canales abiertos como el cociente entre la corriente a cada valor constante del estímulo que abre los canales (concentración de agonista, voltaje, etc) y la corriente máxima generada. Esta determinación se hace usualmente variando el potencial de membrana en un rango amplio, para poder estudiar las partes del proceso que son dependientes de voltaje. En el caso de los registros de la actividad de un solo canal, la misma determinación se logra estudiando el cociente entre el tiempo que el canal permanece abierto y el tiempo total del registro, lo cual es equivalente a determinar la probabilidad de apertura. En las

corrientes macroscópicas, la dependencia del voltaje de la apertura de canales controlados por el voltaje, se refleja en las curvas corriente-voltaje macroscópicas, por lo que éstas poseen dos tipos de información: la concerniente a la permeación de la especie iónica acarreadora de corriente en el canal y la correspondiente al número de canales abiertos a un determinado voltaje. Es por la razón anterior que para extraer información sobre estos dos procesos se deben realizar experimentos en que se minimicen los efectos del número de canales abiertos sobre las corrientes para estudiar la permeación; es decir, se midan las corrientes que pasan a través de un número constante de canales abiertos o se mida la corriente que pasa a través de un solo canal abierto. En el caso de los registros de canal único, la curva I-V también contiene información sobre la dependencia de voltaje de la apertura aunque está mayormente determinada por la permeación de los iones. Se ha demostrado así que la corriente que fluye a través de un solo canal abierto cuando el voltaje transmembranal es constante no varía y que no existe, a nivel unitario relación entre la duración de la apertura del canal y la corriente que pasa por él. Los estudios del transporte de iones a través de canales unitarios también han revelado que las fluctuaciones que el canal realiza entre los estados conductores y no conductores ocurren de manera aleatoria y se observan como pulsos cuadrados de corriente constante cuando el potencial de membrana es también constante. La duración de las aperturas del canal, revelada por la duración de los pulsos de corriente, es una variable aleatoria, es decir, el canal no se abre

un número constante de veces en un intervalo de tiempo dado y la duración de las aperturas no es tampoco fija sino que varía típicamente entre algunos cientos de microsegundos y algunos cientos de milisegundos, de tal forma que la distribución de intervalos de tiempo que el canal permanece abierto, es en el caso más general, una suma de términos exponenciales, donde el número de componentes de la sumatoria es igual al número de estados conformacionales o estructuras conductoras o no conductoras, que puede adoptar el canal. Se puede demostrar que las constantes de tiempo de cada término exponencial de las distribuciones de tiempos abierto y cerrado, son proporcionales a los inversos de las constantes de velocidad que caracterizan cinéticamente a las transiciones entre los estados conductores y no conductores del canal, y que son estas constantes cinéticas, o al menos una de ellas, las que dependen del factor que determina la apertura del canal, ya sea el voltaje transmembranal, la concentración de un ligando, etc. De esta forma, si una constante que determina la transición entre el estado cerrado y abierto se hace grande, el canal tenderá a pasar mayor tiempo en el estado abierto y por lo tanto la probabilidad de encontrar al canal abierto o la fracción de tiempo que permanece en ese estado, en un intervalo de tiempo fijo, tenderá a su valor máximo. Es interesante notar que el mismo resultado se obtiene si la constante para la transición inversa, es decir, para el cierre del canal, se hace pequeña y esta diferencia cualitativa sólo se puede evidenciar del detallado estudio de las funciones de densidad de probabilidad que determinan las formas de

distribución de los intervalos de tiempo de aperturas y cierres del canal (Horn y Vandenberg, 1982). Adicionalmente, una diferencia cualitativa de esta naturaleza se puede interpretar en términos del o los sitios de acción del factor que regula la apertura de los canales y por ende tiene información acerca de la arquitectura molecular del canal iónico.

En párrafos anteriores, cuando se presentó el proceso de permeación en los canales iónicos, se mencionó el hecho de que se puede ganar información sobre la estructura del poro del canal al aplicar modelos basados en estructuras fijas del canal abierto, sin embargo esta información debe ir acompañada con investigaciones sobre la forma en que los iones permeantes compiten por ocupar el interior del canal y sobre como ocurre el proceso de bloqueo de las corrientes por moléculas que son impermeables o muy poco permeables. Así se puede determinar si los procesos anteriores son dependientes del voltaje y por ende ocurren dentro del campo eléctrico de la membrana, en un sitio específico dentro del canal (Woodhull, 1973), o no son afectados por el potencial eléctrico transmembranal y por lo tanto ocurren en sitios adyacentes al canal, en regiones no estructurales o bien en una zona localizada en la superficie del acceso de los iones permeantes al poro del canal. Finalmente, una de las aproximaciones más recientes en el estudio, tanto de la permeación en los canales como de la apertura y cierre de los mismos, lo constituye la manipulación molecular de los canales cuya biología molecular se conoce con mayor detalle. La aplicación de técnicas de biología molecular permite la

manipulación directa de los componentes primarios de la proteína formadora del canal, es decir, se pueden llevar a cabo mutaciones puntuales y estudiar de esta forma la contribución de regiones o residuos de aminoácidos específicos en el procesos bajo estudio, no obstante, las manipulaciones genéticas de las moléculas del canal afectan la estructura cuaternaria del mismo y no es fácil separar los efectos debidos a cambios estructurales o cambios conformacionales más generales.

Canales mecanosensibles.

Aunque los canales iónicos no dependen de energía metabólica para su funcionamiento, si necesitan una fuente de energía para llevar a cabo las transiciones entre los estados abiertos y cerrados. Los canales activados por voltaje utilizan la energía almacenada en el potencial de membrana para este fin mientras que los canales activados por agonistas usan la energía libre de la interacción con el agonista para favorecer la misma transición.

Existe otro tipo de canales que usan la energía potencial almacenada al someter la membrana plasmática a una tensión tangencial, y por ende funcionan como elementos transductores mecanoeléctricos. Estos canales han sido llamados sensibles a estiramiento o mecanotransductores y fueron descritos por primera vez en 1984 en el músculo embrionario de pollo (Guharay y Sachs, 1984). Posteriormente se han descrito en prácticamente todos los tipos celulares en que se han buscado, aunque no corresponden a un único tipo biofísico.

La mayor diferencia entre estos canales en distintas células, corresponde a la selectividad iónica. En células de metazoarios, los canales mecanosensibles son catiónicos exclusivamente y se pueden agrupar en dos tipos, los no selectivos y los selectivos a potasio (Morris, 1990; Uhl et al., 1988). En algunos procariontes, por el contrario, existen canales no selectivos que permiten la permeación de aniones (Gustin et al., 1988 ;Kulberg, 1987). Los canales de el tipo no selectivo son los más comunes y los que presentan la mayor cantidad de similitudes, pues casi todos son rectificadores anómalos y pueden mediar corrientes de calcio cuando la concentración extracelular de éste es baja y son bloqueados por calcio cuando su concentración se eleva. A los canales mecanosensibles de este tipo se les ha asociado con varias funciones celulares. En el músculo liso se supone que participan en la depolarización inducida por la contracción y en el músculo esquelético de algunos insectos se les ha responsabilizado de la contracción miogénica de alta frecuencia. En el epitelio coroidal (Christensen, 1987) y en la glía de Muller (Puro, 1990), se ha propuesto que el incremento en $[Ca^{2+}]_i$, producido por la entrada de calcio mediada por estos canales en condiciones anisomóticas, activa flujos de potasio que contribuyen a la regulación del volumen celular. En el epitelio corneal se cree que participan en el control de la secreción del humor vítreo y en el mantenimiento de la transparencia de la cornea (Cooper et al., 1986).

En cuanto a los canales mecanosensibles selectivamente permeables a potasio, sus posibles funciones están menos claras. En

sólo un caso, en una línea celular de neuroblastoma, se ha demostrado una correlación entre la regulación del volumen celular y la activación de flujos de potasio mediados por estos canales (Sakin, 1989; Falke y Misler, 1989). En los ovocitos de un pez, se ha demostrado que durante la división de las blastómeras se producen cambios cíclicos en el potencial de membrana y que éstos se deben a la activación también cíclica de canales de potasio activados por estiramiento, aunque se desconoce el significado de estos cambios (Medina y Bregestovski, 1988). También en conos de crecimiento neuronal se supone que estos canales participan en la regulación del potencial de membrana del cono y que esto tiene alguna relevancia en el control de la migración y diferenciación neuronal (Sigurdson y Morris, 1989). En las células mecanosensibles de los órganos del oído, el canal responsable de la transducción mecanoeléctrica es un canal de potasio (Corey y Hudspeth, 1979), éste es quizá el único caso en que la función de un canal mecanosensible se encuentra plenamente justificada y se ha estudiado con mucho detalle (Roberts et al., 1988). En otras células especializadas en la mecanotransducción como el huso neuromuscular, aunque se ha reportado la existencia de canales mecanosensibles, no se ha establecido el papel que juegan en la mecanotransducción.

A diferencia de los canales no selectivos, los canales mecanosensibles permeables a potasio tienen curvas corriente voltaje lineales y aunque no se ha estudiado exhaustivamente, ni se ha probado en todos los tipos celulares su farmacología, son

generalmente sensibles a las mismas drogas que otros canales de potasio no sensibles al estiramiento.

La explicación más aceptada de la sensibilidad al estrés mecánico en los canales mecanosensibles es que están estrechamente relacionados con el citoesqueleto de la membrana (Alberts et al., 1990) el cual actúa como un elemento visco-elástico cuando se incrementa la tensión tangencial de la membrana, acoplándola directamente al mecanismo de apertura del canal. Los modelos cuantitativos que se han desarrollado para explicar la dependencia de la probabilidad de apertura con la tensión se basan en ésta suposición (Sachs y Lecar, 1991; Roberts et al., 1988), sin embargo, se ha obtenido alguna evidencia experimental de que estos canales podrían ser mecanosensibles por efecto de un artefacto, es decir, la formación del sello de alta resistencia podría alterar la estructura del citoesqueleto y hacer que un canal adquiriera una sensibilidad mecánica que en condiciones normales no posee (Morris y Horn, 1991), sin embargo, existen pruebas en contra de esta hipótesis. Guharay y Sachs (1984) reportaron que el canal de la acetilcolina es insensible a la presión.

Canales iónicos en los astrocitos.

Los astrocitos son un tipo celular del sistema nervioso (SN) al que se han atribuido una serie de funciones en el mantenimiento de la homeóstasis del medio extracelular de las neuronas, que se

consideran como las células más importantes en el SN. Los astrocitos participan en la recaptura de neurotransmisores, como el ácido glutámico y el GABA, siendo indispensables para completar la síntesis del ácido glutámico, pues lo degradan a glutamina y la recirculan de regreso a las neuronas, donde es nuevamente transformada en glutamato, existen evidencias, por lo menos en astrocitos de anfibios, de que son responsables del control de la concentración extracelular de potasio mediante un sistema de sifón (Kuffler et al, 1984); al aumentar la concentración extracelular de potasio debido a la actividad eléctrica de las neuronas, los astrocitos internan el potasio a través de canales de potasio rectificadores anómalos y lo liberan a la región opuesta a la de captura a través también de canales de potasio. Este mecanismo de sifón, implica una regionalización en la distribución por lo menos de los canales de potasio, la cual a sido demostrada en células gliales de la retina (Ashcroft et al 1988). También se ha demostrado la existencia de varios tipos de canales de potasio en los astrocitos de mamíferos; poseen un canal de potasio dependiente de voltaje muy similar al rectificador tardío de muchas células excitables, en cuanto a su dependencia del voltaje, cinética, permeabilidad y sensibilidad farmacológica a drogas como el TEA y Cs; existe también, aunque no se encuentra en todas las células, un canal del tipo rectificador anómalo que no ha sido bien caracterizado. En los astrocitos de tipo 2, que en general tienen un fenotipo más o menos neuronal, se ha demostrado la existencia de canales, también permeables a potasio, activados por calcio

intracelular y otros similares a los tipo A de muchas neuronas. Aparte de los canales de potasio, por lo menos el 50% de astrocitos en cultivos primarios expresan un canal de sodio dependiente de voltaje, que es bastante similar a los canales de sodio de tipo neuronal, aunque tiene una cinética más lenta, finalmente, se han descrito canales de calcio de tipo L cuya expresión se induce por factores presentes en los sueros de cultivo que son totalmente desconocidos (Barres et al., 1988). Un hecho interesante, común a todos los canales dependientes del voltaje en los astrocitos, es que las curvas de activación por el voltaje se encuentran corridas hacia el sentido negativo con respecto a sus análogos neuronales, lo cual se correlaciona con los potenciales de reposo más negativos de los astrocitos. Algunos de los canales de potasio presentes en los astrocitos son los responsables del potencial de membrana, que es muy negativo y depende casi exclusivamente de la distribución pasiva de potasio.

No obstante que los astrocitos del SN de mamíferos parecen tener la batería de canales iónicos, mínima necesaria para participar en el amortiguamiento espacial de la concentración del potasio extracelular, no se ha demostrado aún una distribución diferencial de sus canales de potasio, ni existen pruebas conclusivas de que lleven a cabo un amortiguamiento de la concentración del potasio por sifoneo, tampoco se ha encontrado una explicación a la presencia de canales iónicos que se sabe son responsables de la excitabilidad y su regulación en neuronas (Hille, 1992), ya que los astrocitos son células inexcitables, que

no participan en la señalización nerviosa. Una posibilidad es que sean intermediarios en un reciclaje de los canales iónicos de las neuronas; otra, que por lo menos los canales de potasio sean necesarios para procesos tales como la regulación de volumen celular.

Regulación del volumen celular.

El volumen de una célula es una característica que debe ser controlada en forma precisa, debido a que las concentraciones intracelulares de muchas moléculas se deben mantener en límites muy estrechos y cualquier cambio de volumen conlleva un cambio en la concentración de solutos. Además, cambios importantes en el volumen pueden provocar la lisis celular (Cala, 1990).

Existen muchos procesos patológicos en el sistema nervioso en los que están implicados cambios en el volumen celular, como las isquemias, algunas epilepsias, etc., aunque no se conoce la relación causal entre estas patologías y los cambios de volumen (Macknight, 1988).

No todos los tipos celulares poseen los mismos mecanismos que les permiten regular el volumen cuando éste es alterado. Cuando la osmolaridad del medio que rodea a una célula disminuye, ésta gana agua forzada osmóticamente y tiende a extruir solutos que se denominan osmóticamente activos; muchas células sacan aniones mediante la activación del intercambiador aniónico $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (Sarkadi et al., 1984). En otros tipos celulares, se ha descrito la salida de poliols, uréa y aminoácidos (Law y Burg, 1991), finalmente se han

observado cambios en la permeabilidad al potasio en algunas células y en otras se han estudiado los flujos de salida de potasio, probablemente mediados por canales de potasio y en algunas células, acoplados con la activación de canales mecanosensibles no selectivos (Christensen, 1987). En el caso de las moléculas orgánicas, no se conocen totalmente los mecanismos por los que son movilizadas. Algunos autores han propuesto que los aminoácidos son extruidos por los mismos sistemas de transportadores por los que son internados, mientras otros favorecen un mecanismo de bombeo activo acoplado con uno difusional (Schousboe et al., 1991, Pasantes-Morales et al., 1990).

Los solutos inorgánicos como el K^+ , Na^+ , Cl^- y HCO_3^- , por el contrario, se sabe que son movilizadas por transportadores específicos o por canales iónicos; en este último caso, el hecho más documentado es que en algunas células existen eflujos de potasio acoplados con eflujos de cloruro. El propósito de todos estos mecanismos es expulsar solutos que acarrear agua osmóticamente al interior de la célula, y de así, reestablecen el volumen celular; a este proceso se le conoce como disminución reguladora del volumen.

OBJETIVOS

El propósito del presente trabajo, es investigar la existencia de canales iónicos mecanosensibles en astrocitos en cultivos primarios de cerebelo de rata y caracterizar sus propiedades biofísicas básicas. Esta es una preparación que se usa extensamente para estudiar la regulación de volumen celular y los canales mecanosensibles pueden ser relevantes para dicho proceso, por lo que es necesario conocer su comportamiento para determinar si tienen o no un papel en este proceso.

MATERIALES Y METODOS

Obtención de cultivos primarios de astrocitos.

Los cultivos de astrocitos de cerebelo se preparan de acuerdo al método descrito por (Patel y Hunt, 1985). Brevemente, se disocian los cerebelos de ratas de 7 días de edad, las suspensiones de células disociadas se siembran a una densidad de 225×10^3 células/ml en cajas de petri de plástico que contienen 4-5 piezas de vidrio cortadas de cubreobjetos y previamente tratadas con poli-L-lisina (5 $\mu\text{g/ml}$). El medio de cultivo contiene medio basal Eagle suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (Gibco), Glutamina 2 mM, penicilina 50 U/ml y estreptomycin 50 $\mu\text{g/ml}$. Las cajas se mantienen en una incubadora a 37°C con una atmósfera húmeda de 5% CO_2 - 95% aire. Estudios inmunocitoquímicos anteriores en el laboratorio (Morán y Pasantes, 1991), muestran que los cultivos de astrocitos obtenidos de esta forma tienen un 95% de pureza.

Electrofisiología.

La caracterización de los canales mecanosensibles en los astrocitos, se realizó mediante el empleo de la técnica de fijación del voltaje en microáreas de membrana plasmática (Patch-Clamp) (Hamill et al., 1981). Mediante esta metodología se pueden registrar las corrientes que fluyen a través del canal y se pueden estudiar los cambios conformacionales que sufre el canal. El

procedimiento consiste en aislar una región de membrana con una micropipeta de vidrio que interactúa molecularmente con la membrana y forma un sello eléctrico de muy alta resistencia, del orden de Gigaohms (GOhm), lo que permite resolver las pequeñas corrientes que pasan por los canales que se encuentran en la membrana atrapada en la micropipeta. Las corrientes se hacen pasar por un convertidor corriente-voltaje que funciona al mismo tiempo como un circuito de tierra virtual, lo que permite fijar el voltaje entre la tierra y el microelectrodo. La resistencia de retroalimentación en el convertidor corriente-voltaje es la que determina la ganancia del amplificador.

En el sistema de registro, el ruido eléctrico depende estrechamente de la resistencia del sello, por lo que para poder resolver las corrientes que pasan en el canal se deben tener resistencias mayores o del orden de 10 GOhm (Ver diagrama 1).

Dado que el sello es mecánicamente muy estable, se le puede manipular en varias formas. Por ejemplo, se pueden obtener registros de parches de membrana separados de la célula al retirar la pipeta de registro de la superficie de ésta, lo que permite controlar si ambigüedad la composición de las soluciones que bañan al canal, así como el voltaje transmembranal.

La técnica de registro es la descrita por Hamill et al, 1981 y se utilizó la configuración del lado citoplásmico hacia afuera, (inside-out). Las micropipetas se construyeron en dos pasos con un estirador de pipetas (Narishige) y se pulieron con calor en una microforja de manufactura casera. Las pipetas tenían una

Diagrama 1

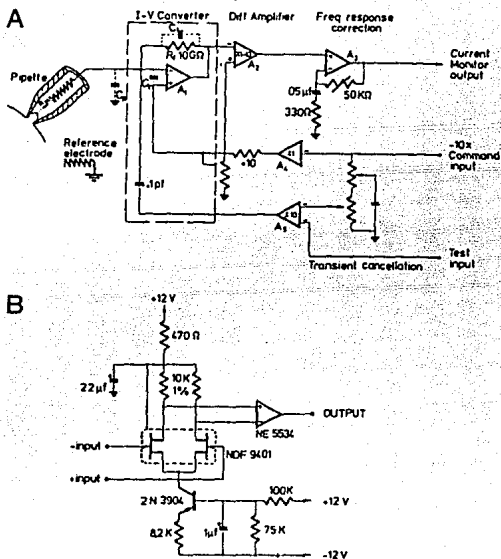


Diagrama del circuito del convertidor corriente-voltaje (I-V).

La constante de tiempo R_1C_1 , se compensa con el compensador de frecuencia, el amplificador A_3 suma dos señales filtradas con constantes de tiempo variables para cancelar los transientes capacitivos. En B se muestra en detalle el circuito del amplificador A_1 para el convertidor I-V. El convertidor I-V se monta directamente sobre un micromanipulador y el portapipetas se conecta a él sin cables (Tomado de Hamill et al., 1981).

resistencia, en solución con alto potasio, de 4-8 Mohms, lo cual corresponde, según Neher y Sakmann (1984), a un diámetro de apertura de 1-2 μm . El electrodo de las micropipetas se fabricó con alambre de plata y se cloruró electrolíticamente, lo mismo que el electrodo de tierra, que se construyó con agar en solución del normal (ver Soluciones), el amplificador usado fue un List EPC-7 (List Medical), el cabezal se montó sobre un micro manipulador hidráulico (Narishige) de tres ejes, en la platina de un microscopio invertido Nikon TMD; los cubreobjetos que contienen las células se transfirieron de las cajas de cultivo a la cámara de registro, con un volumen de 0.7 ml, que contiene la solución que se desea bañe el lado intracelular de la membrana, y se lavaron por lo menos cuatro veces durante 5 min. Las soluciones del baño se cambiaron con un sistema de perfusión por gravedad y una bomba de vacío.

Se obtuvieron gigasellos mediante la aplicación de succión al interior de la micropipeta a través de una manguera en serie con un manómetro de mercurio, con el cual se determinó la presión aplicada mediante una jeringa de 5 c.c.; este sistema se empleó también para aplicar succión variable, con el fin de estudiar la dependencia de los parámetros del canal con la succión. Una vez obtenidos los sellos, se logró la configuración inside-out retirando rápidamente la pipeta de la superficie de la célula, dado que la solución "intracelular" contiene calcio 1.2 o 2 mM, en varios experimentos se formaron vesículas en el electrodo, éstas se rompieron mediante una rápida exposición de la vesícula en la punta del electrodo al

aire.

Los datos fueron filtrados antes del muestreo con el filtro Bessel de cuatro polos del EPC-7 a una frecuencia de corte de 3KHz, se muestrearon en una computadora (Gama PC) a una frecuencia de 10KHz con el uso de un programa comercial (PCLAMP 5.5), después de ser digitalizados mediante un convertidor analógico-digital (Labmaster) con una resolución de 12 bits y se almacenaron en disco duro. En algunos experimentos donde se necesitaban registros largos, los datos se capturaron analógicamente en cinta magnética con una grabadora de instrumentación (Hewlett-Packard), a una velocidad de 7 1/2 pulgadas/s y posteriormente se digitalizaron para su análisis.

Todos los datos se analizaron en una computadora mediante el uso de PCLAMP 5.5 Y ASYSTANT.

Soluciones.

Las soluciones se prepararon con reactivos de grado analítico (Sigma Co.) y utilizando agua bidestilada; el pH se ajustó siempre a 7.4 con HCl, NaOH o KOH (0.1 N); todas las soluciones se filtraron con filtros de 0.22 μ m.

Concentraciones en mM:

- i) Solución intracelular: NaCl 5, KCl 130, KH_2PO_4 1.4, HEPES 5,
- ii) Solución normal: NaCl 130, KCl 5, KH_2PO_4 1.4, HEPES 5
- iii) Solución sin Cl^- (III): NaCl 5, Gluconato de K 130, KH_2PO_4 1.4, HEPES 5.

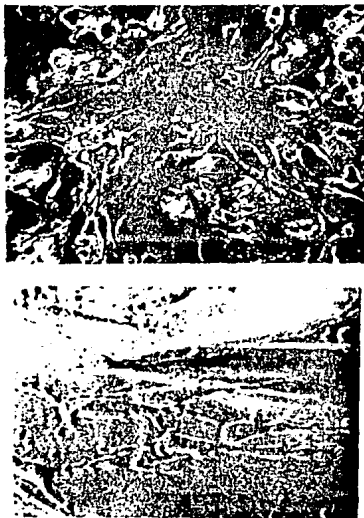
Todas las soluciones contienen CaCl_2 1.5 o 5 mM, según se indique.

RESULTADOS.

Expresión de canales en astrocitos cerebelares.

Los astrocitos cerebelares en cultivos que no han alcanzado la confluencia, son células aplanadas de las cuales es difícil obtener sellos de alta resistencia (>10 GOhm) estables (Figura 1); por esta razón, los cultivos fueron tratados con dibutiril-AMPC (db-AMPC), que es un análogo permeable del AMPC y que se sabe produce cambios morfológicos en astrocitos y en algunas neuronas, siendo los más notables el aumento en el volumen somático y la aparición de procesos. Tanto en astrocitos corticales de rata, como en algunos otros tipos celulares, se sabe que produce alteraciones en la expresión y algunas propiedades de proteínas de membrana incluidos canales iónicos de calcio y de potasio (Barres et al., 1989), razón por la cual se realizaron experimentos en células tratadas con y sin db-AMPC, sin encontrarse diferencias por lo menos en lo que respecta a las propiedades y densidad de los canales mecanosensibles, no obstante, se encontró que las células tratadas con db-cAMP expresaban una mayor cantidad de canales de potasio dependientes de voltaje que las células control. En algunas pocas células (4) se encontró un canal de alta conductancia que corresponde probablemente al canal de cloro reportado por Kettenman (1990).

Figura 1



Fotomicrografías que muestran: A) La apariencia de un cultivo primario de astrocitos en confluencia a la edad de una semana. La mayoría de las células son aplanadas, pero en general, de grandes dimensiones. Diámetro medio: 20 μm .

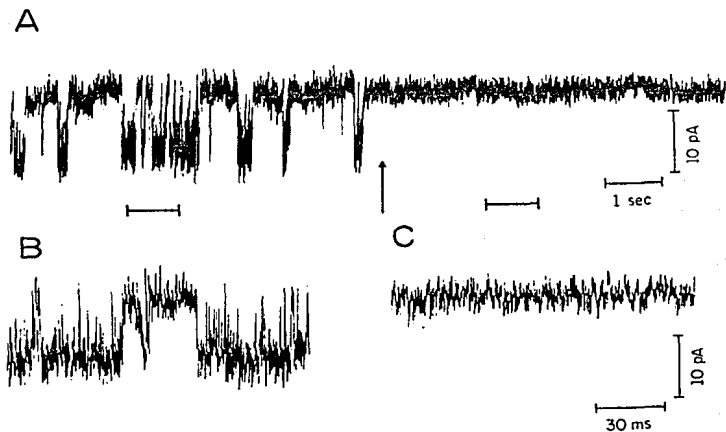
B) Astrocito con una típica pipeta en su superficie. Alrededor del 50% de las células usadas formaron sellos de alta resistencia. Iluminación Köhler, campo claro. 200x.

Canales mecanosensibles en astrocitos cerebelares de rata en cultivo primario.

La membrana de estas células presenta un canal iónico que puede ser activado al aplicar succión a la luz de la micropipeta, después de obtener un sello en la configuración "on-cell e "inside-out", la activación del canal no se obtiene si se varía el voltaje. La figura 2 muestra el trazo de un registro continuo de 10 s de duración. Durante la primera mitad del registro, se aplicó una succión de 40 mmHg y en donde indica la flecha, se dejó de aplicar la succión, lo cual hace que cese la actividad del canal. De las aproximadamente 500 células que se utilizaron, solo en unas 20 se encontró este canal y prácticamente en todas se encontró actividad unitaria, es decir, el parche de membrana contenía un solo canal.

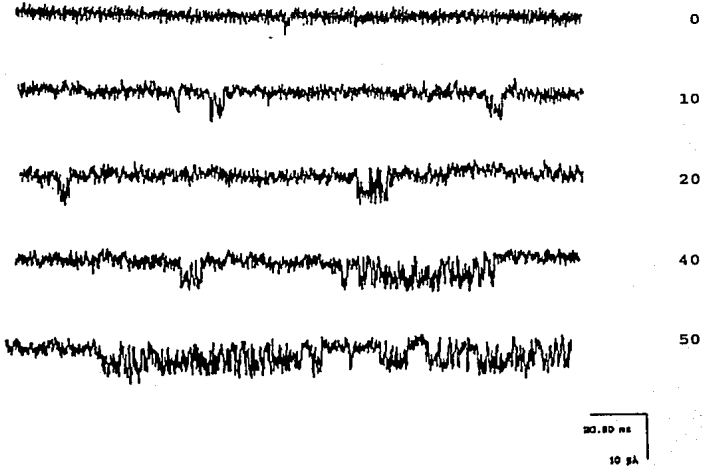
La figura 3 muestra registros obtenidos en el mismo experimento de la figura 2 a diferentes intensidades de succión; es notorio el incremento de la actividad del canal conforme se aumenta la succión. El incremento en la succión no afecta la amplitud de la corriente, lo cual es un resultado relevante para entender las fuerzas que activan a los canales mecanosensibles. La figura 4 muestra una gráfica de la duración de los eventos contra la amplitud de cada uno de ellos, en ausencia y en presencia de succión. La amplitud promedio no cambia, no hay correlación entre la amplitud y la duración de los eventos individuales y por el contrario el número de eventos (aperturas) se incrementa significativamente cuando se incrementa la succión. En la Tabla I

Figura 2



Aperturas del canal inducidas por la succión. La parte A muestra corrientes unitarias inducidas por un pulso de succión de 40 mm Hg, medidas a un potencial de -100 mV. La flecha indica el término de la aplicación de la succión. Las partes B y C muestran segmentos del trazo A graficadas en una escala expandida de tiempo. La ganancia del registro es de 100 mV/pA.

Figura 3



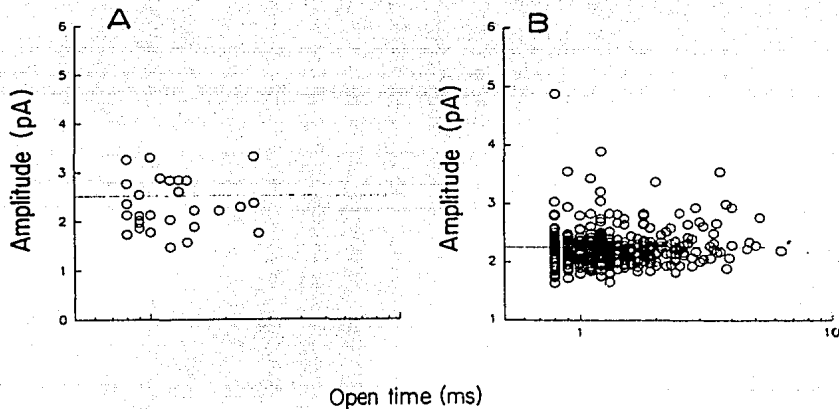
Efecto de la succión sobre la probabilidad de apertura del canal. El mismo parche de membrana con un sólo canal se sometió a distintas intensidades de succión, que se indican a la derecha de cada trazo, en mm Hg. Se observa un incremento en el número de aperturas al aumentar la succión. Potencial de membrana: -90 mV.

se resumen estos efectos. La amplitud de la corriente no cambia al variar la intensidad de la succión y sólo se altera al cambiar la fuerza impulsora de los iones i.e. el voltaje transmembranal.

Existe la posibilidad de que la succión no active directamente al canal, sino que incremente el área de la membrana del sello, reclutándose de esta manera algunos canales que se encuentran en la región del sello, los llamados "canales de la orilla" (Hamill et al., 1981), y que sean éstos los canales que se registran durante el pulso de succión, anulando la teoría de que los canales bajo estudio sean activados mecánicamente. Para probar tal posibilidad se aplicaron pulsos de voltaje al sello y se midió el cambio en el componente capacitivo de la corriente, con y sin succión. La magnitud de la corriente capacitiva transitoria es proporcional al área de la membrana, dado que la membrana plasmática tiene una capacidad específica constante de $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$. Al sustraer digitalmente registros control (sin succión) y registros con succión, el componente capacitivo desaparece totalmente, indicando que la succión no produce cambios en la capacidad de la membrana y por lo tanto del área de la misma y descartando así la posibilidad de que los canales de la orilla contribuyan a los registros. No obstante la succión produce un aumento en la corriente de fuga, lo que indica que la resistencia del sello disminuye, pero éste es un artefacto totalmente reversible (Figura 5).

Con los datos obtenidos de registros largos se puede construir la curva de probabilidad de apertura o fracción del tiempo que el canal permanece abierto en función de la intensidad de la succión.

Figura 4



Gráfica de dispersión de la amplitud de las transiciones unitarias del canal a un potencial de -40 mV. La parte A muestra el control. Se detectaron solo 31 transiciones durante 5 s. En el panel B se detectaron 317 transiciones con una succión de 40 mm Hg durante un tiempo igual de observación. Las líneas horizontales representan la amplitud promedio de la corriente 2.51 pA en A y 2.25 pA en B. Las dos gráficas corresponden al mismo experimento.

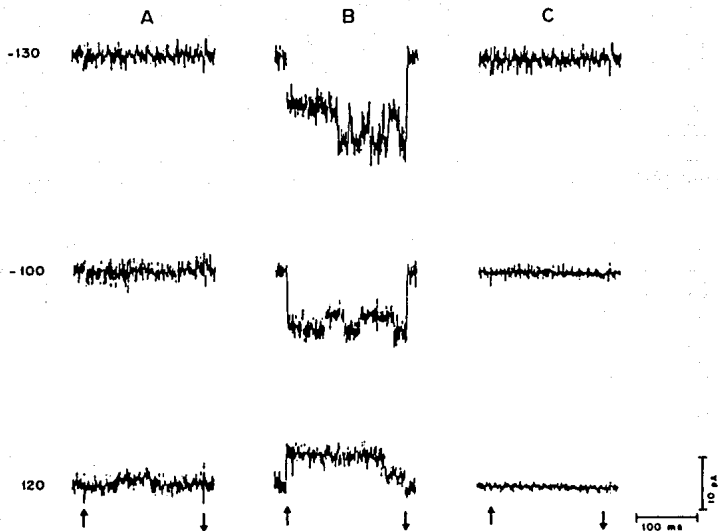
TABLA I

Efectos de la succión sobre la corriente unitaria

Voltaje (mV)	Amplitud promedio de 0 a 70 mmHg
-30	-2.86 +- 0.088
-40	-3.33 +- 0.300
-50	-3.60 +- 0.214
-60	-4.66 +- 0.610
-80	-5.53 +- 0.065
-90	-5.89 +- 0.247
-100	-7.12 +- 0.157

Los resultados están expresados como la media +- D.S. de la corriente unitaria en al menos cuatro diferentes succiones en el intervalo indicado incluyendo 0 mm Hg, al mismo potencial de membrana. Parche "Inside-out" bañado en soluciones asimétricas de potasio.

Figura 5



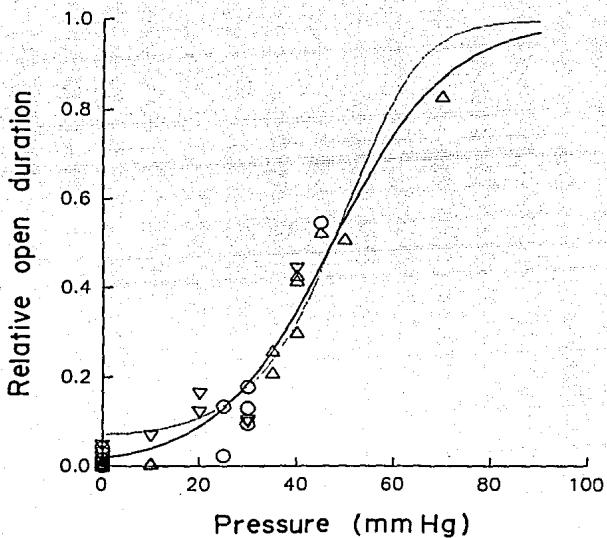
Aperturas del canal inducidas por la succión durante la aplicación de pulsos de fijación de voltaje. La columna A es el control, en B se muestran las aperturas inducidas por 30 mm Hg de succión, la columna C muestra la reversibilidad. Las flechas muestran el inicio y término del pulso de voltaje cuyo valor se muestra a la izquierda de cada línea. El potencial de mantenimiento es de 0 mV. Soluciones de alto potasio simétricas (solución i).

En la Figura 6, se observa que el aumento en la succión incrementa la probabilidad de apertura (P); cuantitativamente, los datos se ajustan a una ecuación similar a la distribución de Boltzmann con parámetros $E'=46.6$ mmHg, $K=10.5$ mmHg, donde E' es la presión a la que los canales permanecen 50% del tiempo en el estado abierto y K es una medida de la pendiente de la función. La forma de la ecuación es:

$$P = \frac{1}{1 + \exp[(E' - E)/K]} \quad (1)$$

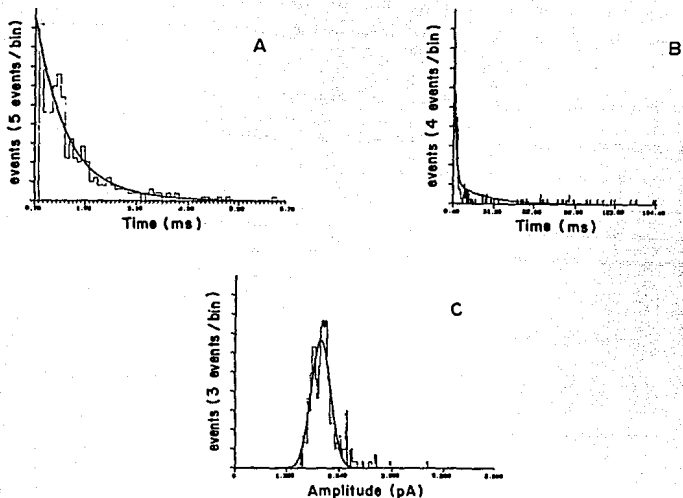
Los parámetros y la función a la que se ajustaron los datos, son similares a los reportados para otros canales mecanosensibles (Yang y Sachs, 1990; Guharay y Sachs, 1984; Cooper et al., 1986). Se construyeron las distribuciones de tiempos abiertos y cerrados considerando sólo eventos de apertura y cierre mayores de 500 μ seg, dado que los eventos menores a este intervalo no se pueden validar totalmente debido a la frecuencia de muestreo. Los histogramas se pueden ajustar a la suma de dos componentes exponenciales con una constante de tiempo larga y otra corta. Para realizar el ajuste de los componentes exponenciales se utilizó un método de mínimos cuadrados no lineal que está implementado en los programas de PCLAMP. La figura 7 muestra algunos de los histogramas de tiempo abierto y cerrado y de amplitud de corriente a -10 mV y 30 mmHg de

Figura 6



Efecto de la succión sobre la probabilidad de apertura del canal. Cada símbolo representa un experimento diferente de por lo menos 10 s. de duración. El potencial de membrana es de -90 mV en todos los experimentos. La línea continua es el ajuste a la ecuación de Boltzmann con $E' = 46.6$ mm Hg y $K = 10.5$ mm Hg.

Figura 7



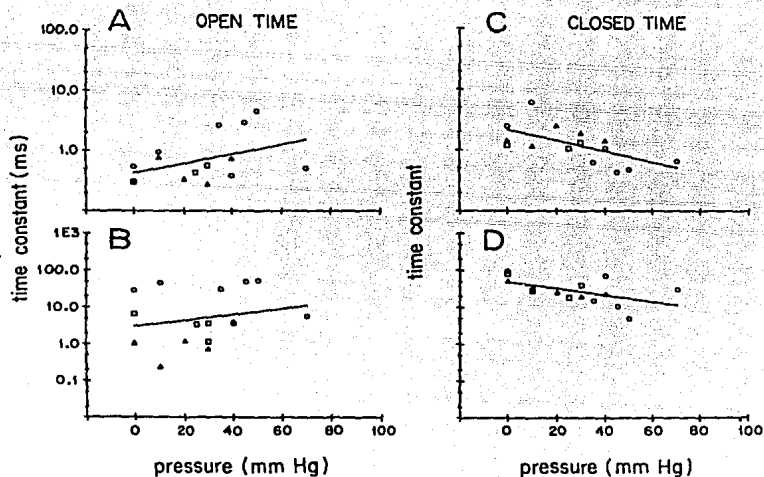
Distribuciones de tiempos abiertos (A) y cerrados (B) del canal sensible a estiramiento con una succion de 30 mm Hg. Las lineas continuas se calcularon con una regresion no lineal de los histogramas a la suma de dos exponenciales. Las constantes de tiempo son: Panel A; $\tau_1=0.6$ ms, $\tau_2=27.3$ ms. Panel B; $\tau_1=1.5$ ms, $\tau_2=23.2$ ms. Panel C; histograma de amplitud de la corriente. Media 2.2 pA, S.D.=0.2 pA.

succión.

En la figura 8 se muestra el efecto de la succión sobre las constantes de tiempo de las distribuciones de tiempo abierto y cerrado en escala logarítmica; claramente las constantes de tiempo abierto se alargan y las de tiempo cerrado tienden a disminuir, estos dos efectos son responsables del incremento en la probabilidad de apertura dependiente de la succión. La pendiente de la línea de regresión da una medida de la sensibilidad de cada constante a la succión y muestra que las constantes de tiempo cortas son las más sensibles a la succión.

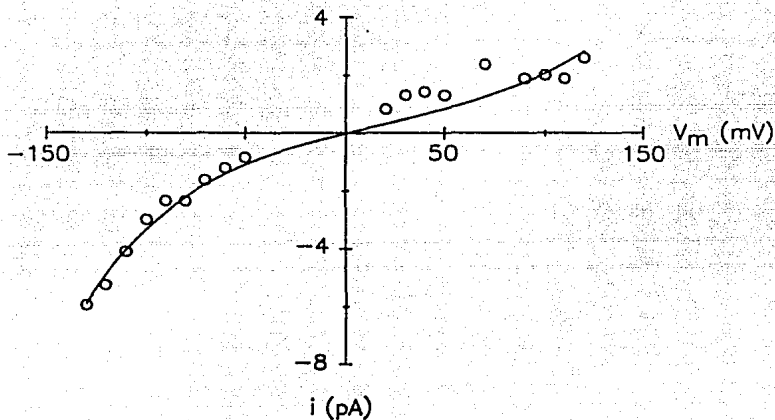
La selectividad iónica del canal se estudió con los protocolos de pulsos de fijación de voltaje y cambiando las concentraciones de los iones a ambos lados del parche de membrana. La figura 9 muestra la curva corriente-voltaje (I-V) de un canal en soluciones de KCl simétricas (solución 1). Se observa que el potencial de inversión es igual a cero mV, sugiriendo que el canal es selectivo a potasio. Sin embargo, el mismo resultado se obtendría para un canal no selectivo en las mismas condiciones iónicas. Si se sustituye el KCl por gluconato de potasio, la curva I-V permanece esencialmente inalterada, (Figura 10), lo que significa que el Cl⁻ no permea por el canal, aún cuando la fuerza impulsora para éste es muy grande. La figura 11 muestra el efecto de sustituir el K⁺ en la cara intracelular del parche de membrana por Na⁺ en forma asimétrica: el potencial de inversión se corre en el sentido depolarizante y la corriente saliente se hace muy difícil de detectar; si, por el contrario, se sustituye la solución extracelular por una mezcla de

Figura 8



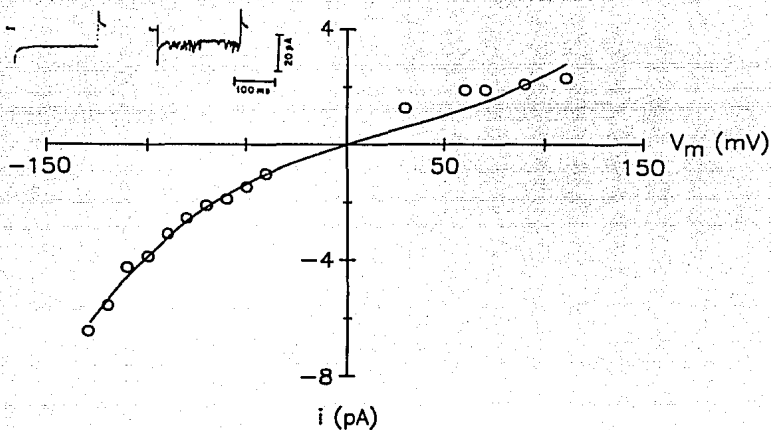
Las constantes de tiempo como funciones de la succión. A y B; constantes de tiempo del estado abierto; C y D, constantes de tiempo del estado cerrado. Las sensibilidades a la succión determinadas de las pendientes son (mm Hg^{-1}): $A=0.0078$, $B=0.0081$, $C=-0.0089$, $D=-0.0090$.

Figura 9



Relación corriente-voltaje para el experimento de la figura 5. Los símbolos son los datos experimentales y la línea continua representa el mejor ajuste al modelo de dos barreras con $G_1=4.9$ kcal/mol, $G_2=7.9$ kcal/mol, $w=3.2$ kcal/mol y $\delta=0.25$. Soluciones de alto potasio simétricas.

Figura 10



Efecto de la sustitución de aniones sobre las corrientes activadas por estiramiento. Solución de la pipeta contiene KCl 130 mM y la solución del baño Gluconato de K 130 mM. Los símbolos son datos experimentales y la línea continua representa el ajuste al modelo de permeación con $G_1=4.9$ kcal/mol, $G_2=6.4$ kcal/mol, $W=1.6$ kcal/mol y $\delta=0.25$. El inserto muestra corrientes de membrana a -120 mV antes (izquierda) y durante 30 mm Hg de succión (derecha).

NaCl y KCl, el potencial de inversión se corre en el sentido hiperpolarizante y la corriente saliente se hace más prominente (Figura 12). En su conjunto, éstos son los resultados esperados para un canal que permite más fácilmente la permeación del potasio sobre otros cationes monovalentes, tales como el sodio.

Al graficar el potencial de inversión de las curvas I-V de las figuras 9, 11 y 12 como función del cociente de concentraciones extra e intracelular de potasio, se observa una desviación de la predicción de la ecuación de Nernst para un electrodo de potasio perfecto; esta desviación se puede explicar si se aplica la ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz (Hille, 1992) con un cociente de permeabilidades sodio/potasio $\alpha = P_{Na}/P_K = 0.1$, esto indica que el canal tiene una permeabilidad pequeña pero finita para el sodio.

$$E_{rev} = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[K]_o + \alpha [Na]_o}{[K]_i + \alpha [Na]_i} \quad (2)$$

Las curvas I-V en potasio simétrico muestran una marcada rectificación entrante, es decir, la conductancia es mayor cuando el potencial es negativo. Este resultado contradice la ecuación de corriente derivada de la teoría de electrodifusión (Hille, 1992), por esta razón, para tratar de explicar como ocurre la rectificación en condiciones simétricas, se consideró el modelo de permeación de Eyring más sencillo de dos barreras simétricas y un pozo de potencial (Hille, 1992; Lewis y Stevens, 1977).

El esquema cinético del modelo es el siguiente:

$$X + S_o \frac{k_1}{k_{-1}} X S \frac{k_1}{k_{-1}} X + S_i \quad (3)$$

La ecuación de corriente y las ecuaciones cinéticas que se obtienen suponiendo que el sistema está en el estado estacionario son las siguientes:

$$I_s = z e \frac{k_{-1} k_2 [S]_i - k_1 k_2 [S]_o}{k_{-1} + k_2 + k_1 [S]_o + k_2 [S]_i} \quad (4)$$

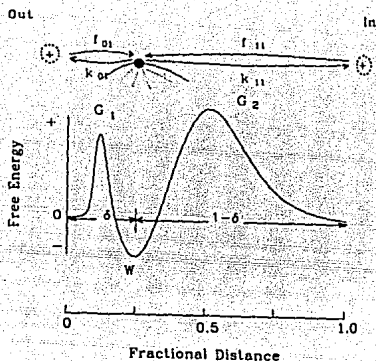
$$K_i = b_i \exp(-\delta v_s / 2) \quad (5)$$

$$K_j = b_j \exp[-(1-\delta) v_s / 2] \quad (6)$$

donde:

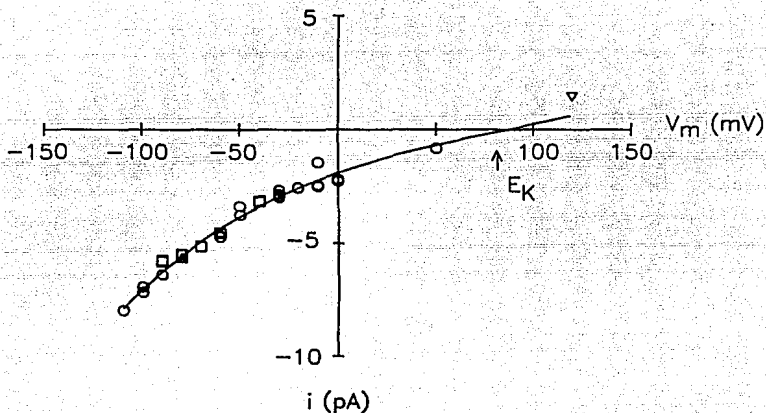
$$b_{j,i} = \frac{kT}{h} \exp\left(-\frac{G_a - G_b}{RT}\right) \quad (7)$$

Las K_i corresponden a las constantes de velocidad para la transición sobre las barreras $i > j$ en unidades de sec^{-1} y las $G_{a,b}$ son las alturas de las barreras energéticas en Kcal/mol, v_s es el potencial de membrana. La distancia eléctrica del sitio de unión δ se tomó con respecto al exterior del canal y se dejó como parámetro fijo con un valor de 0.25 de acuerdo con Lewis y Stevens (1977) y Yang y Sachs (1990). La estructura energética del modelo es la que sigue:



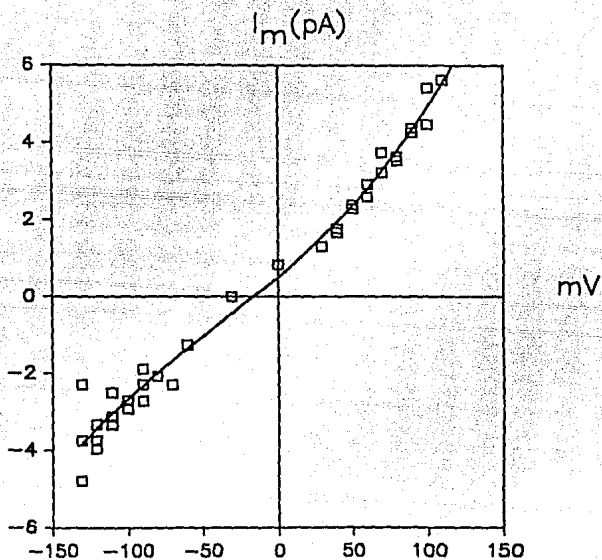
El ajuste de los datos experimentales a la ecuación de corriente del modelo (eq.4) se realizó con un método no lineal de mínimos cuadrados, los parámetros del ajuste son las energías libres de las constantes de velocidad. Una de las suposiciones es que el único ión permeable es el potasio. Las líneas continuas en las curvas I-V de las figuras 9, 10 y 12 son el resultado del ajuste de los datos al modelo, el valor de los parámetros del ajuste se muestra en los pies de figura correspondientes. El modelo puede explicar muy bien la rectificación entrante de las corrientes en concentraciones simétricas de potasio. Cuando se ajustan los datos de las curvas I-V con cloruro asimétrico (Figura 10), la conclusión de que el cloruro no es permeable se fortalece, pues los parámetros del ajuste son muy similares a los de la curva I-V con

Figura 11



Efecto de la sustitución de cationes en las corrientes activadas por estiramiento. Solución de la pipeta (mM): KCl 130, NaCl 5, CaCl₂ 2, HEPES 10. Solución del baño: KCl 5, NaCl 130, CaCl₂ 2, HEPES 10. Los símbolos son datos experimentales y la línea es el ajuste al modelo de permeación con $G_1=7.8$ kcal/mol, $G_2=7.7$ kcal/mol, $W=4.9$ kcal/mol y $\delta=0.25$. Cada símbolo representa un experimento diferente y la flecha indica el potencial de equilibrio del potasio.

Figura 12



Efecto de la sustitución de cationes sobre las corrientes activadas por estiramiento. Solución del baño: (mM): KCl 130, NaCl 50, CaCl₂ 2, HEPES 10. Solución de la pipeta: (mM): KCl 65, NaCl 65, CaCl₂ 2, HEPES 10. Los símbolos son los datos experimentales y la línea continua no tiene significado teórico. La flecha indica el potencial de equilibrio del potasio.

cloruro simétrico. El modelo de permeación puede dar cuenta también de los corrimientos del potencial de inversión, al cambiar la concentración de potasio intracelular (figura 12).

DISCUSION

Los astrocitos cerebelares de rata en cultivo primario expresan un canal que se activa al aplicar presión negativa (succión) a la membrana. Un canal de este tipo podría ser activado si al incrementarse la tensión de la membrana, ésta ejerciera tensión centrífugamente sobre los monómeros del canal y provocara su apertura; sin embargo, un mecanismo así implica que el diámetro del poro del canal se incrementa con la tensión, perdiendo selectividad y este es un hecho que contradice los experimentos, pues la amplitud de la corriente no cambia con cambios en la succión.

Considerando al canal como un elemento deformable, se pueden hacer cálculos que permitan encontrar restricciones teóricas a los efectos de la succión sobre el canal y dilucidar un posible mecanismo de activación.

Los estudios microscópicos de la geometría de un parche de membrana sellado a una micropipeta de "patch-clamp" (Neher y Sakmann, 1984), muestran que esta se puede aproximar por una hemiesfera. En una superficie esférica de diámetro d , la presión P ,

está relacionada con la tensión T , por la ley de Laplace, $T = P \cdot r$, de tal forma que el aplicar succión se traduce en un incremento lineal de la tensión tangencial a la membrana. Si la membrana no se comporta como un medio viscoso, un incremento en la tensión debe producir un incremento proporcional en el área $\Delta A/A$ tal que: $T = K_A (\Delta A/A)$ donde K_A es la constante de elasticidad de la membrana; se ha reportado que K_A tiene un valor entre 130-340 din/cm (Evans, E.A. y Hochmuth, R.M., 1973).

Suponiendo que el canal se comporta como un medio continuo, la energía de deformación está dada por:

$$E = (K_A/2) (\Delta A'/A')^2 A \quad (6)$$

$$E = (A'/2K_A) T^2.$$

Si se combina la ecuación de Laplace con esta última se obtiene:

$$E = (Pd) 2A' / 32KA \quad ; \quad A' = \pi r^2 \text{ es el área del canal.}$$

r es el radio del canal.

De acuerdo con la teoría de Eyring, cada una de las constantes de velocidad de el modelo cinético se comporta como una función exponencial de la energía del proceso de transición entre dos estados j e i tal que:

$$k_{i,j} = k_0 \exp(-\Delta E/KT) \quad , \text{ sustituyendo } E;$$

$$k_{i,j} = K_0 \exp(-\theta P^2) \quad (8)$$

$$\theta = d^2 A' / 32 K_A K T \quad (9)$$

Dado que las constantes de velocidad dependen exponencialmente del cuadrado de la presión (succión), la función que describe la probabilidad de apertura (Ecuación 1) también debe depender del

cuadrado de la presión.

Para un diámetro del parche de membrana de 2 μm , la ecuación (9) resulta en: $\theta = 1.73 \times 10^{-3} r^2 / K_A$; de la curva de probabilidad (figura **) se puede calcular una sensibilidad a la tensión de 4.36 cm^2/Hg , por lo que $r^2 / K_A = 2.5 \times 10^3$ si se usa una K_A de 40 din/cm el diámetro del canal es aproximadamente 700 \AA , lo cual lo haría mucho mayor que el canal del receptor nicotínico (50 \AA), uno de los canales iónicos más grandes conocidos (Kistler et al., 1982). Es difícil pensar que los astrocitos sinteticen una proteína de proporciones gigantescas -pesaría más de 20 MD. La mejor explicación a esta aparente contradicción, es que el canal utiliza la energía almacenada en la tensión de una área grande de membrana, y la enfoca directamente al mecanismo de compuerta, probablemente a través de una conexión estructural con el citoesqueleto (Sachs, 1991), y no es activado mediante una acción de jalado directo. La red de espectrina submembranal podría ser un buen candidato, ya que se ha demostrado que algunas proteínas de membrana que tienen coeficientes de difusión en la membrana anómalamente bajos, permanecen ancladas por este subsistema del citoesqueleto.

Esta conclusión se ve apoyada por el hecho de que las amplitudes de las corrientes no son función de la tensión (Tabla I), lo que ocurriría si el canal sufriera cambios importantes de área, es decir, la amplitud de la corriente sería una función del cuadrado de la intensidad de la succión, lo que no sucede.

Los resultados de los cálculos indican que el canal utiliza el estrés mecánico almacenado en una área grande de membrana a través

de estar unido al citoesqueleto. El hecho de que las corrientes que se reportan aquí se hayan registrado en parches de membrana separados del resto de la célula, sugiere que estos parches conservan algunos componentes del citoesqueleto que son funcionales. Sokabe et al.(1991), han reportado un resultado similar mediante el uso de microscopía de alta resolución.

En la primera descripción de los canales activados por estiramiento que realizaron Guharay y Sachs (1984), se realizó un análisis cinético detallado utilizando los criterios de máxima probabilidad (Maximum Likelihood, Colquhoun y Sighworth, 1983), encontrándose que la cinética podía ser descrita por un esquema markoviano lineal de tres estados cerrados y uno abierto; en algunas de las descripciones posteriores de canales mecanoactivados en otras preparaciones, se han reportado resultados similares, sin embargo nuestros datos demuestran que las constantes de tiempo abierto y cerrado son dos y en ambos casos son sensibles a la tensión, aunque las constantes de tiempo cerrado son las más afectadas, a diferencia de los resultados del grupo de Sachs, que ha mostrado que las distribuciones de tiempo cerrado se ajustan a tres exponenciales y las de tiempo abierto solo a una, y únicamente la constante rápida de tiempo cerrado es acertada por la tensión. Esta discrepancia se puede deber a una diferencia real en el mecanismo de compuerta de el canal de los astrocitos o a los diferentes métodos empleados para estimar los componentes exponenciales de las distribuciones de tiempo (Ver materiales y métodos). Es posible que ésta sea una diferencia real en los

mecanismos del canal; Yang y Sachs (1990) reportaron que un número importante de sus registros en ovocitos debían ser ajustados con dos exponenciales en el caso del tiempo abierto; Moody y Bosma (1989) han presentado en ovocitos de un tunicado, el mismo resultado que se reporta aquí para los astrocitos.

Los canales mecanosensibles de los astrocitos son claramente permeables a cationes e impermeables a aniones, lo que se demuestra en los experimentos de sustitución del cloruro por gluconato, y seleccionan fuertemente entre el Na^+ y el K^+ a favor del último, como muestra el cociente de permeabilidades Na/K menor a 1 calculado a partir del potencial de inversión de las curvas I-V. La conclusión anterior, se ve sustentada por los resultados del ajuste del modelo de permeación, aún en presencia de Cl^- asimétrico. El modelo hace suposiciones que tienen también implicaciones para la estructura probable del canal, pues sugiere que el filtro de selectividad es un solo sitio localizado a 1/4 de la longitud del canal desde el exterior, aun cuando la distancia eléctrica δ no corresponde exactamente a la distancia física, y que el canal tiene una estructura relativamente simple. Para un canal catiónico, este sitio debe ser un dipolo, posiblemente uno o varios residuos de aminoácidos polares o un grupo carboxilo o hidroxilo. A pH fisiológico, estos grupos tienen carga neta y, electrostáticamente, favorecerían el flujo de cationes sobre el de aniones.

La rectificación de la conductancia en potenciales negativos según el modelo, no se debe a un proceso de apertura y cierre

dependiente de voltaje que incremente la probabilidad de apertura del canal en potenciales negativos, sino a la localización asimétrica del sitio de unión dentro del poro del canal; ésta es una propiedad que presenta todo canal con sitios de unión con localización asimétrica. Adicionalmente, este resultado teórico concuerda con el hecho de que se puede activar el canal con la misma probabilidad a distintos potenciales con una succión constante, lo que indica que no existe dependencia de voltaje. Sin embargo las predicciones estructurales del mismo modelo aplicado al receptor de acetilcolina (Adams et al., 1981), no se han sostenido ante los datos proporcionados por el análisis estructural detallado de biología molecular, por lo tanto, no se deben tomar los resultados del modelaje, por lo menos los de tipo arquitectónico, por totalmente ciertos; además, el modelo que se aquí es el más sencillo y se tendrían que tener más datos sobre la permeación para saber si es el más adecuado para describirla.

La relevancia fisiológica de los canales mecanosensibles, en las células en que se encuentran presentes, no se conoce realmente. En el caso de los astrocitos, el hecho de que sean permeables a potasio, sugiere que pueden participar en la modulación del potencial de membrana, pues se ha reportado que éste está casi exclusivamente determinado por el potencial de equilibrio del potasio. Estos canales podrían ser un mecanismo que fijara el voltaje cuando se produjeran cambios en la tensión de la membrana, como durante el cambio de volumen en medios anisomóticos y podrían

proporcionar una vía para la extrusión de solutos que participan en la regulación del volumen. Sin embargo, Kimelberg et al. (1990a), han reportado una marcada depolarización durante el hinchamiento de los astrocitos en medio hiposmótico. Una corriente de potasio mecanosensible o de cualquier otro tipo, no puede ser responsable de esta depolarización, por lo que es probable que el eflujo de solutos reguladores del volumen no sea sólo de potasio sino también de cloro. En los astrocitos, merced a un mecanismo activo de acumulación, el potencial de equilibrio del cloro es más positivo que el potencial de membrana, por lo que una corriente saliente de cloro (I_{Cl}) más grande y acoplada a la corriente mecanosensible (I_{MS}), podría ser responsable tanto de la expulsión de solutos como de la depolarización del potencial de membrana mientras la célula permanece hinchada. Un funcionamiento sinérgico de eflujos de K^+ y Cl^- se ha descrito en células epiteliales de yeyuno (Macleod y Hamilton, 1991). El mecanismo por el cual las dos corrientes se encuentren acopladas permanece totalmente desconocido. Es probable que I_{MS} funcione como un elemento únicamente transductor y que I_{Cl} , junto con otros flujos, sea parte del mecanismo efector de la regulación del volumen.

La corriente mecanosensible (I_{MS}), podría tener una función más general en la biología de los astrocitos y de otros tipos celulares. Medina y Bregestovski (1988) han reportado hiperpolarizaciones cíclicas producidas por la activación también cíclica de estos canales en las primeras fases del desarrollo de

ovocitos de pez. Los astrocitos son elementos extremadamente importantes para la migración de las neuronas durante el desarrollo del sistema nervioso siendo el vehículo de las neuronas, se sabe que durante esta migración la membrana plasmática de los astrocitos se ve sometida a importantes cambios de tensión debidos al movimiento ameboide generado por la extensión de procesos. La activación de los canales responsables de I_{Ks} durante la migración podría entonces estar implicada en alguna forma de sensor, mediante la transducción de los cambios locales de tensión en cambios del voltaje transmembranal, que permitieran al astrocito monitorear su dirección y proporcionarle un mecanismo de retroalimentación para el control de las fuerzas generadas durante estos movimientos. Seguramente éste no sería el mecanismo exclusivo utilizado para controlar la migración, pero si proporcionaría información espacial muy precisa.

Un punto importante que debe ser resuelto para saber si estas funciones propuestas son plausibles o no, es determinar si los procesos fisiológicos antes citados (volumen y movimiento) son capaces de generar tensiones membranales que puedan activar a los canales mecanosensibles.

En el caso del volumen se puede considerar a la célula como una estructura esférica homogénea de radio r ; un cambio en el volumen y por consiguiente en el área en esta estructura están dados por:

$$\begin{aligned} \Delta A + \dot{\Delta} A &= 4\pi(r + \dot{\Delta} r)^2 \\ V + \dot{\Delta} V &= 4/3(r + \dot{\Delta} r)^3 \end{aligned} \quad (1)$$

$$\text{de donde: } 3(V+\Delta V)=(A+\Delta A)^{3/2} \quad \Delta V/V=1/3(1+\Delta A/A)^{3/2}-1 \quad (2)$$

$$\text{de la ley de Laplace:} \quad T=Pd/4=K_A(\Delta A/A) \quad (3)$$

$$\text{Sustituyendo (3) en (2):} \quad \Delta V/V=1/3(1+T/K_A)^{3/2}-1 \quad (4)$$

Para obtener una probabilidad de apertura del canal de 50% se requieren aproximadamente 5 cmHg = 6.65×10^6 dyn/cm², de acuerdo con la ley de Laplace, en un parche de membrana hemiesférico de 2 μ m de diámetro esto es una tensión de 3.32 din/cm. Para esta tensión y una K_A de 216 din/cm, la ecuación (4) predice un $\Delta V/V$ igual a 0.147; es decir, se requiere un cambio de volumen de solo 10% para activar al 50 % de los canales. Estos cambios en el volumen y aún mayores, se pueden encontrar fácilmente en condiciones fisiológicas y por lo tanto estas tensiones de la membrana se encuentran por debajo de los límites líticos o dañinos.

El cálculo anterior permite suponer razonablemente que los canales mecanosensibles, por lo menos en los astrocitos, podrían ser funcionales en caso de cambios pequeños en el volumen.

En el caso de las tensiones membranales generadas durante el movimiento de una célula, es más difícil realizar un cálculo pues la morfología de una célula en movimiento es muy complicada y no toda la tensión generada es compartida por la membrana y el citoesqueleto submembranal; no obstante, se han medido estas tensiones en neuronas en cultivo y se ha encontrado que se generan

tensiones suficientes para también activar canales mecanosensibles. Por lo menos en los conos de crecimiento neuronal, se sabe que la elongación del cono desencadena varios procesos fisiológicos, que podrían deberse a cambios en el potencial de membrana, por lo que un papel de los canales mecanosensibles en estos procesos no parece del todo imposible.

No obstante que la activación del canal por la tensión, es un hecho evidente y que es probable que se deba su asociación con el citoesqueleto, Horn y Morris (1991) encontraron que en los conos de crecimiento neuronal, aún cuando expresan canales activados por estiramiento, no se registran las corrientes macroscópicas que estos deberían generar; han propuesto que estos canales no son mecánicamente sensibles en condiciones fisiológicas y adquieren esta sensibilidad cuando se forma el sello de alta resistencia lo que deforma el citoesqueleto. De ser cierta esta hipótesis, se invalidaría la existencia de los canales mecanosensibles, pues no se han reportado hasta la fecha corrientes macroscópicas directamente mecanosensibles, aunque los datos de microscopía de alta resolución (Sokabe et al, 1991; Sokabe y Sachs, 1990) aportan evidencias en contra.

CONCLUSIONES

Un gran número de tipos celulares expresan un canal iónico que se caracteriza por depender de cambios en el estrés mecánico de la membrana plasmática para activarse. Se ha sugerido que este tipo de canales iónicos funcionen como mecanotransductores celulares en los fenómenos que involucran cambios en la forma de las células, como la división celular, la migración durante el desarrollo y la regulación del volumen celular.

En este trabajo se ha demostrado que los astrocitos cerebelares de rata en cultivo primario, expresan un tipo de canal iónico mecanosensible en la membrana plasmática. Este canal es permeable a potasio en forma altamente selectiva y presenta rectificación entrante, teniendo una conductancia en potenciales negativos comparable a la de otros canales activados por estiramiento. La sensibilidad al estrés mecánico es similar a la de otros canales de la misma clase presentes en otros tipos celulares, aunque se comporta con una cinética que difiere de la más común a estos canales.

Algunos autores han propuesto que estos canales puedan funcionar como efectores en la regulación del volumen celular mediante la salida de potasio, sin embargo, debido a la fuerte rectificación entrante, las corrientes salientes que estos canales pueden mediar quizás no sean de la magnitud suficiente para intervenir como efectores en la regulación de volumen. No obstante, los cálculos de la sensibilidad de estos canales a la tensión sugieren que son funcionales en condiciones fisiológicas.

REFERENCIAS

- Adams, D.J., Dwyer, T.M. y Hille, B. (1980) The permeability of endplate channels to monovalent and divalent metal cations. *J. Gen. Physiol.* 75:493-510.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J.D. (1987) *Biología Molecular de la Celula*. Ed. Omega. 1232 pp.
- Barres, B.A., Chun, L.Y. y Corey, D.P. (1988) Ion channel expression in white matter glia: I. type-2 astrocytes and oligodendrocytes. *Glia*. 1:10-30.
- Cala, P.M. (1990) Principles of cell volume regulation ion flux pathways and the roles of anions. En: *Chloride Channels and Carriers in Nerve, Muscle, and Glial Cells*. Plenum Press 67-83.
- Christensen, O. (1987) Mediation of cell volume regulation by Ca^{2+} influx through stretch-activated channels. *Nature.*, 330:66-68.
- Colquhoun, D. y Sigworth, F.J. (1983) Fitting and statistical analysis of single-channel records. In: *Single-Channel Recording*. Sakmann, B. y Neher, E. Eds. Plenum Press, New York
- Cooper, K.E., Tang, J.M., Rae, J.L. y Eisenberg, R.S. (1986) A cation channel in frog lens epithelium responsive to pressure and calcium. *J. Membrane Biol.*, 93:259-269.
- Corey, D.P. y Hudspeth, A.J. (1979) Ionic basis of the receptor potential in a vertebrate hair cell. *Nature*. 281(5733):675-

- Evans, E.A. y Hochmuth, R.M. (1973) Mechano-chemical properties of membranes. In: *Current Topics in Membranes and Transport.*, Bronner, F. y Klenszeller, A., Eds. Academic Press. NY. pp 1-64.
- Falke, L.C. y Mislner, S. (1989) Activity of ion channels during volume regulation by clonal NiE115 neuroblastoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 86:3919-3923.
- Guharay, F. y Sachs, F. (1984) Stretch-activated single ion currents in tissue cultured embryonic chick skeletal muscle. *J. Physiol. (Lond.)*, 352:685-701.
- Gustin, M.C., Zhou, X-L., Martinac, B. y Kung, C. (1988). A mechanosensitive ion channel in yeast plasma membrane. *Science*. 242:762-765.
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. y Sigworth, F.J. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.*, 391:85-100.
- Hille, B. (1992) *Ionic Channels of excitable membranes*. Sinauer Associates, Sunderland, MA, 607 pp.
- Kimelberg, H.K., Goderie, S.K., Higman, S., Pang, S. y Waniewski, R.A. (1990a) Swelling-induced release of glutamate, aspartate and taurine from astrocyte cultures. *J. Neurosci.*, 10(5):1583-1521.
- Kimelberg, H.K. y Kettenmann, H. (1990) Swelling-induced changes in electrophysiological properties of cultured astrocytes and oligodendrocytes. I. Effects on membrane potentials, input

- impedance and cell-cell coupling. *Brain Res.*, 529:255-261.
- Kistler, J., Stroud, R.M., Klymkowsky, W., Lalancette, P.A. y Fairclough, R.H. (1982) Structure and function of an acetylcholine receptor. *Biophys.J.* 37:371-383
- Kullberg, R. (1887) Stretch-activated ion channels in bacteria and animal cell membranes. *TINS*, 10(10):387-388.
- Law, R.O. y Burg, M.B. (1991) The role of organic osmolytes in the regulation of mammalian cell volume. *Adv. Comp. Environmental Physiol.*, 9:189-225.
- Lewis, C.A. and Stevens, C.F. (1979) Mechanism of ion permeation through channels in a postsynaptic membrane. In: *Membrane Transport Processes Vol.3*, C.F. Stevens and R.W. Tsien. Eds. Raven Press, New York, pp.133-151.
- Macknight A.D.C. Principles of cell volume regulation (1988) *Renal Physio. Biochem.*, 3-5:114-141.
- Macleod, R.J. y Hamilton, J.R. (1991) Separate K⁺ and Cl⁻ transport pathways are activated for regulatory volume decrease in jejunal villus cells. *Am. J. Physiol.*, 260: G405-G415.
- Medina, I.R. y Bregestovski, P.D. (1988) Stretch-activated ion channels modulate the resting membrane potential during early embryogenesis. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 235:95-102.
- Moczydlowski, E. (1986) Single-channel enzymology. In: *Ion Channel Reconstitution.*, Miller, Ch., Ed. Plenum Press. NY. pp 75-113.
- Moody, W.J y Bosma, M.M. (1989) A nonselective cation channel activated by membrane deformation in oocytes of the ascidian

- Boltenia villosa*. *J. Membrane Biol.* 107:179-188.
- Moran, J. y Pasantes-Morales, H. (1991) Taurine-deficient cultured cerebellar astrocytes and granule neurons obtained by treatment with GES. *J. Neurosci. Res.* 29.
- Morris, C.E. (1990) Mechanosensitive ion channels. *J. Membrane Biol.* 113:93-107.
- Morris, C.E. y Horn, R. (1990) Failure to elicit macroscopic mechanosensitive currents anticipated by single-channel studies. *Science.* 251:1246-1249.
- Neher, E. y Sakmann, B. (1983) Geometric parameters of membrane patches. In: *Single Channel Recording.*, Neher, E. y Sakmann, B. Eds. Plenum Press. NY
- Pasantes-Morales, H., Moran, J. y Schousboe, A. (1990) Volume-sensitive release of taurine from cultured astrocytes: Properties and mechanism. *Glia.*, 3:427-432.
- Patel, A.J. and Hunt, A. (1985) Observations on cell growth and regulation of glutamine synthetase by dexamethasone in primary cultures of forebrain and cerebellar astrocytes. *Dev. Brain Res.* 18:175-184.
- Puro, D. (1990) Stretch-activated ion channels in human glial Muller cells. *Glia*
- Roberts, W.M., Howard, J. y Hudspeth, A.J. (1988) Hair cells: transduction, tuning and transmission in the inner ear. *Ann. Rev Cell Biol.* 4:63-92.
- Sachs, F. (1991) Mechanical transduction by membrane ion channels: A mini review. *Mol. Cell. Biochem.* 104:57-60.

- Sachs, F. y Lecar, H. (1991) Stochastic models of mechanical transduction. *Biophys. J.* 59:1143-1145.
- Sakin, H. (1989) A stretch-activated K⁺-channel sensitive to cell volume. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 86:1731-1735.
- Sarkadi, B., Mack, E. and Rothstein, A. (1984) Ionic events during the volume response of human peripheral blood lymphocytes to hypotonic media. *J. Gen. Physiol.*, 83:497-512.
- Schousboe, A., Sánchez-Olea, R., Moran, J. and Pasantes-Morales, H. (1991) Hyposmolarity-induced taurine release in cerebellar granule cells is associated with diffusion and not with high-affinity transport. *J. Neurosci. Res.*, 30:661-665.
- Sigurdson, W.J. y Morris, C.E. (1989) Stretch-activated ion channels in growth cones of snail neurons. *J. Neurosci.*, 9(8):2801-2808.
- Sokabe, M. y Sachs, F. (1990) The structure and dynamics of patch-clamped membranes: A study using differential interference contrast light microscopy. *J. Cell Biol.* 111:599-606.
- Sokabe, M., Sachs, F. y Jing, Z. (1991) Cuantitative videomicroscopy of patch clamped membranes: stress, strain, capacitance and stretch channel activation. *Biophys. J.* 59:722-728.
- Uhl, J., Murer, H. y Kolb, H.-A. (1988) Ion channels activated by osmotic and mechanical stress in membranes of Opossum kidney cells. *J. Membrane Biol.*, 104:223-232.
- Woodhull, A.M. (1973) Ionic blockade of sodium channels in nerve. *J. Gen. Physiol.* 61:687-708.
- Yang, X-Ch. and Sachs, F. (1990) Characterization of stretch-

activated ion channels in *Xenopus* oocytes. *J. Physiol. (Lond.)*, 431:103-122.