

148
2ej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.

Facultad de Ciencias, Departamento de Biología.

" CARACTERIZACION DE LA SALIDA DE POTASIO ESTIMULADA POR UN
AUMENTO DE VOLUMEN CELULAR, PRODUCIDO POR CONDICIONES
HIPOSMOTICAS, EN ASTROCITOS DE CEREBELO DE RATA EN CULTIVO " .

T E S I S P R O F E S I O N A L

que para obtener el titulo de

B I O L O G O .

P R E S E N T A

Francisco Javier Rangel González.

Agosto 1993.

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.

INDICE

INTRODUCCION.....	1
I) Papel de los Astrocitos Dentro del Sistema Nervioso Central.....	1
II) Antecedentes Históricos.....	7
III) Tonicidad de una Solución.....	10
IV) Mecanismos de Transporte de agua a través de la Membrana Citoplasmática.....	11
V) Regulación del Volumen Celular en Condiciones Hiposmóticas.....	16
VI) Mecanismos de Regulación del Volumen Celular.....	18
VII) Posibles Señales que Activan los Mecanismos correctores del volumen celular.....	21
VIII) Participación de los Iones en el Proceso de Regulación del Volumen.....	23
XI) Participación de Compuestos Orgánicos en el Proceso de Regulación del Volumen Celular.....	25
X) Importancia Relativa de los Componentes Iónico y Orgánico en el Proceso de Regulación de Volumen.....	27
XI) Importancia de la Regulación del Volumen en Células Animales.....	28
OBJETIVO GENERAL.....	35
OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	36
METODOS EXPERIMENTALES.....	37
RESULTADOS.....	43
1) Cambios en el Volumen Celular.....	43
2) Efecto de la Hiposmolaridad en la salida de potasio..	43
3) Efecto de los fármacos que afectan al Cotransporte K^+/Cl^-	44
4) Efecto de los bloqueadores de Canales de K^+	45
5) Efecto de los Inhibidores de Canales de Cloro.....	45
6) Efecto del Calcio Extracelular.....	46
7) Efecto de la Temperatura.....	47
DISCUSION.....	60
CONCLUSIONES.....	67
BIBLIOGRAFIA.....	70

A MI PADRE POR SU AYUDA. A MIS HERMANOS: OLIMPIA Y JOSE LUIS POR ENSEÑARME A CUESTIONAR EL MUNDO. A EDITH POR CUBRIR CON SU ARTE MIS TRABAJOS Y A MIGUEL ANGEL POR ENSEÑARME A DIFRUTAR LA VIDA.

A MI TIA MATILDE RANGEL Y A MIS PADRINOS RUBEN E ISABEL VILLARREAL POR SU APOYO EN MOMENTOS DIFICILES.

AL PUEBLO CUBANO... POR QUE LA UTOPIA NUNCA TERMINE.

CON TODO MI RESPETO Y AMOR A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO... EL PROYECTO CULTURAL MAS IMPORTANTE DE LOS MEXICANOS.

A MIS AMIGOS ANTONIO ORENDAIN Y JUAN CARLOS JIMENEZ POR COMPARTIR UN CAMINO DE SUPERACION.

A MIS COMPANEROS DEL LABORATORIO. CON TODO MI AGRADECIMIENTO A LOS Drs. Julio Moran, Octavio Quesada, Jesús Manuel León Cázares, Herminia Pasantes-Morales Y MUY ESPECIALMENTE A Roberto Sánchez Olea; POR SU CONTINUA VOCACION HACIA LA BUSQUEDA DE CONOCIMIENTO.

CON AMOR PARA VERONICA...

A LA MEMORIA DE MI MADRE... A QUIEN TANTO EXTRAÑO.

LO CONOCIDO ES FINITO, LO DESCONOCIDO INFINITO; DESDE EL PUNTO DE VISTA INTELLECTUAL ESTAMOS EN UNA PEQUEÑA ISLA EN MEDIO DE UN OCEANO ILIMITABLE DE INEXPLICABILIDAD. NUESTRA TAREA EN CADA GENERACION ES RECUPERAR ALGO MAS DE TIERRA.

T.H. Huxley, 1887.

INTRODUCCION.

I). Papel de los Astrocitos Dentro del Sistema Nervioso Central.

En todo tejido de animal existe un conjunto de diversos tipos celulares, cada uno de los cuales cumple con una o varias funciones fundamentales para la coordinación total del funcionamiento del tejido. Un tejido es un grupo de células y sus productos extracelulares más o menos parecidos, que llevan a cabo una función específica o un conjunto de funciones relacionadas (Bancks, 1986). Además, por lo general, existe un tipo celular altamente especializado que tiene un papel fundamental en la función del tejido, por ejemplo: los eritrocitos en el transporte de oxígeno y los linfocitos en la protección contra invasores en el tejido sanguíneo, los osteoblastos en la producción de la matriz ósea del tejido óseo, los condroblastos en la producción de cartilago en el tejido cartilaginoso y las neuronas en la producción de impulsos electroquímicos en el tejido nervioso.

Cuando se aborda el funcionamiento del tejido nervioso solemos situarnos en una óptica neuronal. Las neuronas, células excitables, permiten el procesamiento de información mediante la transmisión de señales electroquímicas complejas, sin embargo más de la mitad del volumen cerebral está ocupado por células que no son neuronas. El tejido nervioso se caracteriza por la presencia de dos tipos celulares principales: 1) las neuronas y 2) las células gliales (oligodendrocitos, astrocitos, células endoteliales, células de Schwann y de Müller). No obstante del importante papel de las neuronas, las células gliales son considerablemente más numerosas. En efecto

las células gliales están en una proporción de 10:1, en comparación con las neuronas. Las neuronas y las células gliales interactúan estrechamente en un alto grado de interdependencia; en un principio se creía que la glia jugaba únicamente un papel en la estructuración del tejido, pero actualmente se reconoce su importantísima intervención en el desarrollo, diferenciación y fisiología del sistema nervioso.

En el sistema nervioso central existen dos tipos principales de células gliales, las cuales pueden ser distinguidas por sus diferencias de tamaño y por su diferente origen embriológico: la MACROGLIA que incluye a los astrocitos y a los oligodendrocitos, estas células gliales son grandes y tienen su origen de la placa neural. La MICROGLIA corresponde a células gliales pequeñas cuyo origen es el mesodermo.

La astroglia o astrocitos tienen un cuerpo celular pequeño, pero procesos extensos y altamente ramificados. Hay dos clases de astrocitos, que difieren en apariencia y localización: los astrocitos fibrosos y los protoplasmáticos. Los astrocitos fibrosos se encuentran en la materia blanca. Se clasifican como fibrosos debido a que tienen un gran número de filamentos gliales, los cuales son un tipo de filamento intermedio especial. Los filamentos intermedios (10 nm) se encuentran en varios tipos celulares, pero en astrocitos contienen una proteína que es única en la glia: la Proteína Ácida Fibrilar de la Glia o GFAP (de sus siglas inglesas). La GFAP se encuentra exclusivamente en los astrocitos; resulta, por tanto, un marcador inestimable para identificar estas células en muestras de tejidos y en cultivos

(Kimelberg y Norenberg, 1992). Los astrocitos fibrosos tienen procesos altamente ramificados que interaccionan con los axones de las neuronas en la materia blanca.

Los astrocitos protoplasmáticos son similares en apariencia sólo que ellos tienen pocos filamentos gliales, además de ser abundantes en la materia gris rodeando cuerpos neuronales, dendritas y sinápsis. La principal diferencia entre astrocitos fibrosos y protoplasmáticos radica en que uno contiene más citoplasma que otro (Banks, 1986).

Los astrocitos, así llamados por su forma de estrella, se conocen desde finales del siglo XIX. Durante mucho tiempo se les atribuyó una función meramente estructural, pasiva o de sostén de las neuronas. Sin embargo, en algo más de una década, esa opinión cambió radicalmente merced a los adelantos en los métodos de identificación y cultivo de tejidos, que permitieron conocer mejor sus funciones.

Los astrocitos cumplen múltiples funciones en la fisiología normal del cerebro: tienen un papel decisivo en el metabolismo del glutamato y del ácido gamma-aminobutírico (GABA), importantes neurotransmisores de tipo excitador e inhibitor, respectivamente.

Los astrocitos también presentan mecanismos de captura para neurotransmisores, removiendo estos del medio ambiente extracelular de la neurona una vez que son liberados, esto es particularmente cierto para el espacio sináptico en donde el neurotransmisor debe ser retirado para evitar su acción incontrolada (Kimelberg y Norenberg, 1992).

Si los neurotransmisores son cruciales para la función

cerebral, no menos decisiva resulta la composición iónica de la región que rodea a las neuronas; ahí los astrocitos desempeñan también un papel fundamental. Los iones sodio y potasio son los principales responsables de la generación del potencial de acción; los niveles de estos iones (sobre todo del potasio) deben estar regulados muy finamente en el espacio que rodea a las neuronas. Los astrocitos sirven de amortiguadores de potasio retirando el potasio sobrante del espacio extracelular procedente de la actividad neuronal.

Un punto de gran interés es el descubrimiento reciente de los receptores a neurotransmisores y segundos mensajeros en los astrocitos. Ha sido identificado el receptor beta adrenérgico para el neurotransmisor norepinefrina que desencadena la formación del segundo mensajero AMPc. Otros estudios muestran que los astrocitos tienen receptores para la mayoría de los neurotransmisores, aunque su función no ha sido aún determinada (Kimelberg y Norenberg, 1992).

Los astrocitos tienen un papel fundamental no solo en la fisiología del cerebro, por más de una década se ha investigado la función de estos en el desarrollo cerebral. Hace unos veinte años, se demostró que los astrocitos intervenían en forma decisiva en el desarrollo embriológico. Las células astrogliales tejen una red estructural que forma la malla tridimensional de soporte del tejido que permite la emigración de las neuronas, desde sus puntos de origen en el sistema nervioso en desarrollo, hasta sus destinos finales en el cerebro maduro.

Una función más que se le atribuye a los astrocitos es la

de inducir la formación de la barrera hematoencefálica. En la mayor parte del cuerpo, las células endoteliales que revisten las paredes de los vasos capilares están unidas laxamente; dejan así que las sustancias hidrosolubles más pequeñas que se encuentran disueltas en la sangre se difundan hacia los tejidos. No ocurre eso en el cerebro, cuyas células endoteliales capilares se hallan tan estrechamente unidas que virtualmente resultan impermeables a las sustancias hidrosolubles. La barrera, creada de esta manera, es fundamental para mantener en el cerebro un medio químicamente puro. Los capilares cerebrales están rodeados por los pies perivasculares de las fibras astrocíticas, a través de uniones estrechas entre la célula glial y la endotelial; además los astrocitos sintetizan a las enzimas características de la barrera hematoencefálica. Esto, además, trae como consecuencia que los astrocitos distribuyan las sustancias nutritivas a las neuronas.

En las lesiones cerebrales los astrocitos promueven que los axones neuronales sean restaurados. Estas células son capaces de liberar varios factores de crecimiento neuronal. Patologías cerebrales como la epilepsia, la enfermedad de parkinson y Huntington es posible que estén ubicadas en defectos celulares en los astrocitos (Kimelberg y Norenberg, 1992).

La falta de sistema linfático en el cerebro, junto con la presencia de la barrera hematoencefálica, que impide el paso de muchas células y anticuerpos, indujo a suponer que el cerebro era un órgano aislado de los efectos del sistema inmune. Trabajos recientes ha cambiado radicalmente ese punto de vista al mostrar cómo los astrocitos (al menos en cultivo) son células accesorias

que median las reacciones inmunes en el cerebro. Cuando realizan esta función los astrocitos actúan como células presentadoras de antígenos.

Un aspecto de enorme interés que se ha estado investigando recientemente son las propiedades electrofisiológicas de los astrocitos: los cuales son capaces de manifestar potenciales electroquímicos de despolarización.

Para terminar con esta amplia gama funcional de los astrocitos, sólo nos resta mencionar un aspecto importante para los fines de este trabajo. En los últimos años se han reportado varios mecanismos de transporte que se activan bajo condiciones anisomóticas, en donde destacan la capacidad de éstos para intercambiar sodio, potasio, bicarbonato, cloruro y protones. Así como intercambiar aminoácidos, en donde el intercambiador de taurina es muy frecuente (Kimelberg y Norenberg, 1992).

Hasta ahora se ha contemplado la función del cerebro desde una óptica de la actividad neuronal; asimismo, en las propiedades de las neuronas se suponía una categoría superior a la ocupada por los astrocitos. En la ecología de comunidades celulares no existen tipos celulares más importante que otro, todos son importantes para llevar a cabo sus funciones. Los trabajos de investigación más recientes desmienten esta pretensión y demuestran que las propiedades de ambos tipos celulares se complementan. Es de suponerse, no hay motivo para pensar lo contrario, que en un futuro cercano tendremos un panorama mucho más integrativo de las células gliales.

II) Antecedentes Históricos.

El descubrimiento del fenómeno osmótico y los primeros estudios al respecto están unidos a la historia de la creación de las ciencias del siglo XIX: la biología, la química y la fisicoquímica. Entre los avances que registró la biología en la primera mitad de este siglo se encuentra el descubrimiento de la ósmosis. En esa época los químicos pretendían dar una explicación al comportamiento de los gases a través de sus experimentos; los objetivos de estos estudios eran la comprensión del átomo. En ese entonces, el Inglés Thomas Graham (1805 - 1869), padre de la química de los coloides, junto con el francés Francois Raoult (1830 - 1901), fundador de la teoría de las soluciones, sentaron las bases de la fisicoquímica como disciplina científica. Los estudios de estos químicos coinciden con la corriente de estudio de los fisiólogos, quienes estaban preocupados por entender los procesos de transporte en las células. Las dos corrientes, tanto la del estudio de los gases y las soluciones, como la del estudio de la célula y sus intercambios, se entrecruzan y se influyen mutuamente para incidir en el concepto de ósmosis.

Los estudios realizados por el fisiólogo alemán Adolf Eugen Fick (1833 - 1916), en 1855 cuando tenía 26 años de edad, dieron la clave para la formalización matemática del fenómeno de la difusión; en sus trabajos, Fick reconocía a la difusión como un proceso de dinámica molecular en los sistemas biológicos. Hasta ese entonces Fick solamente hacía notar que la presencia de un flujo de difusión es debido a una diferencia de concentraciones. En 1860 James Clerk Maxwell (1831 - 1879) señaló que la difusión

se debe tanto al movimiento de translación de las moléculas como a la agitación masiva en un movimiento convectivo; así, el escocés, Maxwell introdujo el concepto de velocidad relativa, donde el flujo de difusión debe definirse.

El descubrimiento de la ósmosis es anterior al de la difusión. En 1748, el francés, Jean Antoine Nollet (1700 - 1770) obtuvo una membrana de vejiga animal, en la que colocó alcohol de un lado y agua del otro, observó que el agua fluía a través de la vejiga para mezclarse con el alcohol, pero de ninguna manera el alcohol fluía hacia el compartimiento del agua. Lo que Nollet descubrió fue la existencia de membranas semipermeables, ya que permitían el paso de uno de los componentes de una solución y evitaban la difusión de otros; notó que por lo general era el solvente el que podía fluir a través de la membrana y no el soluto. El descubrimiento de la ósmosis en membranas semipermeables fue realizado por el médico francés Henri Dutrochet (1776 - 1847), considerado como uno de los grandes fisiólogos del siglo XIX. Dutrochet descubrió el fenómeno de la ósmosis cuando observó que la difusión del solvente a través de una membrana semipermeable ocurría siempre de la solución de menor concentración de un soluto, que no puede pasar, hacia la solución de mayor concentración, además, el solvente que fluye es capaz de desarrollar una presión sobre la membrana a la que denominó presión osmótica. Con lo anterior Dutrochet daba la pauta para la concepción de una célula viva rodeada de una membrana semipermeable que absorbe agua de sus alrededores a través del flujo osmótico, al mismo tiempo que impide la difusión de ciertas

sustancias de la solución. No obstante la importancia de este descubrimiento, la cuantificación de la presión osmótica no fue realizado sino hasta 50 años más tarde, en 1877, por el botánico alemán Wilhelem Pfeffer (1845 - 1920) quien utilizó en sus experimentos membranas artificiales, no biológicas, preparadas en el laboratorio por medio del depósito de un electrolito de ferrocianuro de cobre sobre un dispositivo poroso. Con estas membranas se consiguieron medidas aceptables de la presión osmótica de soluciones de azúcar y algunas moléculas orgánicas, y se lograron presiones osmóticas de un poco más de 200 atmósferas.

En sus experimentos Pfeffer utilizó agua como solvente y sacarosa como soluto. Estos experimentos demostraron que la presión osmótica de una solución es directamente proporcional a su concentración. Ahora bien, Pfeffer desarrolló este experimento a temperatura constante y concluyó que si modificaba la temperatura, y utilizaba la misma solución sin cambiar la concentración, la variación de la presión osmótica también era directamente proporcional a la temperatura. Este comportamiento de la presión osmótica es idéntico al de un gas ideal. El holandés Jacobus Hendricus Van't Hoff (1852 - 1911) fue quien aventuró una interpretación comparativa de la presión osmótica con la presión ejercida por un gas. En la actualidad la presión osmótica no se interpreta como el choque de las moléculas disueltas en la solución contra un tabique poroso, sino que debe apreciarse como la presión necesaria para compensar un déficit energético que se produce por la disolución espontánea del soluto en el solvente. Esta explicación apareció cuando los trabajos de

Van't Hoff quedaron entendidos dentro del formulismo de la teoría termodinámica química postulada por el norteamericano Josiah W. Gibbs (1839 - 1903). De esta forma, el estudio de la ósmosis se escapa de las manos de los fisiólogos y cae en la de los fisicoquímicos; en realidad, en la actualidad, es un campo de estudio interdisciplinario (del Castillo, 1986).

III) Tonicidad de una Solución.

La molaridad y la osmolaridad de una solución se encuentra relacionada de la siguiente manera: una solución 1 M de un soluto no disociable es 1 osmolar (la solución contiene 6.023×10^{23}) partículas por litro; el llamado número de Avogadro, mientras que una solución 1 M de una sal disociable es n osmolar, donde n es el número de iones producidos por molécula (Segel, 1982). Las soluciones isosmóticas son aquellas que poseen una misma presión osmótica mientras que las que presentan una presión osmótica diferente son anisomóticas: hiposmóticas si la presión osmótica es menor o hiperosmóticas cuando la presión osmótica es mayor.

Cuando tenemos sistemas celulares donde se presenta un gradiente osmótico, entre el citoplasma y el medio extracelular, se observarán cambios en el volumen celular (Dick, 1970; House, 1974), se generará un movimiento de agua por el proceso osmótico, debido a que la membrana citoplasmática separa a estos dos compartimentos acuosos. Esto ocurrirá a pesar de que la membrana citoplasmática es un medio altamente hidrofóbico debido a la presencia de los lípidos que la conforman. En una solución hiposmótica se observará que el movimiento de agua ocurre del

líquido extracelular hacia el citoplasma, a consecuencia de esto se observa un aumento en el volumen celular. Por lo contrario, en una solución hiperosmótica el flujo de agua es en sentido inverso, el citoplasma se deshidrata y se observa por consiguiente la plasmólisis de la célula; estos eventos son regidos por principios puramente fisicoquímicos. No obstante, existen mecanismos moleculares a nivel de membrana citoplasmática que ayudan a la célula a recuperar, aproximadamente, su volumen celular inicial.

En este trabajo nos enfocaremos principalmente a describir los fenómenos relacionados con situaciones hiposmóticas, se mencionaran cuando sea necesario, aspectos generales de la regulación del volumen en situaciones de hiperosmolaridad.

IV) Mecanismos de Transporte de Agua a Través de la Membrana Citoplasmática.

Las membranas celulares son bicapas lipídicas formadas principalmente por fosfolípidos; estas biomoléculas tiene la característica de poseer una "cabeza" polar, la cual interacciona con el agua y dos o más "colas" hidrocarbonadas las cuales son altamente hidrofóbicas. A este tipo de molécula se le conoce con el nombre de anfipática, ya que presentan un carácter polar y apolar en su estructura. Por lo tanto es de esperarse que la membrana citoplasmática sea altamente impermeable a todas las sustancias polares, lo que impide el paso a proteínas, carbohidratos, aminoácidos, iones inorgánicos, como el sodio, potasio, cloro, magnesio, calcio, entre otros, etc. La bicapa lipídica, debido a su interior hidrofóbico, actúa como una

barrera altamente impermeable a la mayoría de las moléculas polares, que impide así que la mayor parte del contenido hidrosoluble de la célula salga de ella. Pero por esta misma razón, las células han tenido que desarrollar sistemas especiales para transportar las moléculas polares a través de sus membranas. Por ejemplo, las células tienen que ingerir los nutrientes esenciales y han de excretar los productos residuales del metabolismo. También han de regular las concentraciones iónicas intracelulares, lo que significa transportar iones determinados hacia el interior o exterior de la célula. El transporte de pequeñas moléculas a través de la bicapa lipídica, se consigue mediante proteínas transmembranales especializadas, cada una de las cuales es responsable de la transferencia de una molécula específica o de un grupo de moléculas afines. Las células también han desarrollado sistemas para transportar a través de sus membranas plasmáticas, macromoléculas polares tales como proteínas, carbohidratos, ácidos grasos, etc. Pero los mecanismos que intervienen en estos casos son muy diferentes de los utilizados para transferir moléculas pequeñas y competen al proceso de endocitosis (Alberts, et al, 1989).

Hace aproximadamente 40 años, Collander, al hacer investigaciones con el alga Nitella, encontró que las sustancias pueden pasar a través de la membrana en muy estrecha relación con su solubilidad en las grasas (Peña, 1986), como era de esperarse por la composición grasa o lipídica de la membrana. Sin embargo en el mismo experimento fue muy claro que el agua difiere del comportamiento general de otras moléculas polares. A pesar de

ser poco soluble en aceite, entra con gran velocidad a las células. Este comportamiento no tiene una explicación clara hasta ahora, pero es un hecho que tanto las membranas biológicas como los liposomas (membranas artificiales, compuesta exclusivamente de lípidos) son altamente permeables al agua. En los organismos animales, por ejemplo, no hay membrana alguna que el agua no pueda atravesar; inclusive hay algunas que además tiene mecanismos para aumentar esta permeabilidad, como el caso de la piel de rana o de algunas células del riñón en la cuales los movimientos del agua además se pueden regular por medio de hormonas (Peña, 1986).

Con el tiempo suficiente, esencialmente cualquier molécula difundirá a través de una bicapa lipídica libre de proteínas (como pueden ser los liposomas), a favor de su gradiente de concentración, sin embargo, la velocidad a la que una molécula difunde a través de una bicapa lipídica varía enormemente, lo que depende en gran parte del tamaño de la molécula y de su solubilidad relativa en aceite. Las moléculas pequeñas no polares se disuelven fácilmente en las bicapas lipídicas y por lo tanto difunden con rapidez a través de ellas. Las moléculas polares sin carga, también difunden rápidamente a través de una bicapa si su tamaño es lo suficientemente reducido. Por ejemplo, el bioxido de carbono (44 daltones), el etanol (46 daltones) y la urea (60 daltones) atraviesan rápidamente una bicapa; el glicerol (12 daltones) lo hace con menor rapidez; la glucosa (180 daltones) prácticamente no la atraviesa. Es importante señalar que el agua (18 daltones) difunde con gran rapidez a través de las bicapas

lipídicas, aunque las moléculas de agua son relativamente insolubles en aceite. Esta rápida velocidad de difusión resulta en parte del hecho que las moléculas de agua son pequeñas y carecen de cargas; además, se cree que la estructura bipolar de la molécula de agua le permite cruzar con una velocidad extraordinariamente elevada las regiones de la bicapa que contienen los grupos de cabezas lipídicas. Las bicapas lipídicas, en cambio, son altamente impermeables a todas las moléculas cargadas (iones), por muy pequeñas que sean: la carga y el alto grado de hidratación de tales sustancias les impide penetrar en la región hidrocarbonada de la bicapa. El coeficiente de permeabilidad es una medida que nos permite conocer que tan permeable o impermeable es una bicapa al paso de una sustancia. Por ejemplo: el agua tiene un valor aproximado de 10^{-2} , la urea y el glicerol de 10^{-5} , la glucosa y el triptofano de 10^{-7} y los iones cloro, potasio y sodio están en el intervalo de 10^{-10} A 10^{-12} (cm/seg) (Alberts, et al, 1989).

El agua es capaz de cruzar las membranas biológicas no obstante su alta hidrofobicidad; esto ocurre a través de diferentes vías, entre las que se incluyen la bicapa lipídica, posiblemente los canales iónicos y poros inespecíficos. En diversos tipos celulares se ha propuesto la existencia de canales por los cuales el agua puede ser movilizad a través de la membrana plasmática. Estos posibles canales no se han identificado y su existencia se ha propuesto con base en estudios cinéticos de los flujos de agua. Existen dos tipos de medidas para expresar la permeabilidad de la membrana al agua:

1) El coeficiente de permeabilidad osmótico o de filtración (Pf), que se obtiene del estudio de los movimientos de agua provocados por un gradiente osmótico.

2) El coeficiente de permeabilidad difusional (Pd), que se determina a partir de la velocidad de intercambio del agua tritizada en el estado de equilibrio (Macey y Braham, 1989). La relación Pf/Pd es un indicador importante de la vía de transporte del agua. Un coeficiente Pf/Pd igual a 1 sugiere que las moléculas de agua cruzan la membrana exclusivamente por un proceso de difusión simple a través de la bicapa lipídica, lo que indica la ausencia de mecanismos específicos de transporte de agua. En cambio si la relación Pf/Pd es mayor que la unidad, el agua es movilizadada por difusión simple a través de un poro acuoso.

Un segundo criterio para distinguir entre flujos de agua a través de la bicapa lipídica y canales o poros para el agua, es la sensibilidad de los movimientos de agua a fármacos específicos para alterar el funcionamiento protéico. El transporte de agua a través de canales o poros es inhibido por compuestos mercurados como el p-cloromercuribenzoato (PCMB) y el p-cloromercuribenceno sulfonato (PCMBS). En eritrocitos el Pf se inhibe 90% en presencia de PCMBS 5 mM; esta inhibición se revierte en presencia de agentes reductores de grupos sulfhidrilo, que incluyen el mercaptoetanol y la cisteína (Dix, et al, 1985). Estos resultados sugieren que los grupos tiol (-SH) de algunas proteínas son esenciales para el transporte de agua (Meyer y Verkman, 1987).

Un tercer criterio para evaluar la vía de transporte de agua

es determinar la energía de activación (E_a) de este transporte. En los flujos de agua a través de la bicapa lipídica la E_a es generalmente elevada (mayor a 10 Kcal/mol). En liposomas la E_a para el transporte de agua es de 12 a 15 Kcal/mol (Fettiplace y Haydon, 1980). En presencia de canales para el agua la energía de activación es baja (menor a 6 Kcal/mol). La E_a es de 4 a 5 Kcal/mol en eritrocitos (Macey, 1984) y en tubulos corticales estimulados con vasopresina (Herbert y Andreoli, 1972), lo que sugiere la presencia de vías específicas para la movilización del agua.

V) Regulación del Volumen Celular en Condiciones Hiposmóticas.

En condiciones isosmóticas el volumen celular permanece constante; la membrana citoplasmática no es capaz de resistir una diferencia de presión hidrostática entre el líquido del medio extracelular y el intracelular (Macknight y Leaf, 1977), por lo que la osmolaridad de los dos medios debe ser la misma. Este hecho no indica que la entrada y salida de solutos osmóticamente activos no se lleve a cabo, sino que se encuentra en equilibrio, con lo cual se evita la formación de un gradiente osmótico. Las células no se comportan como osmómetros perfectos, ya que al ser expuestas a medios anisosmóticos el volumen no varía, según la osmolaridad de la solución, de una manera directamente proporcional a la osmolaridad de la misma; es decir su volumen no puede calcularse al dividir los osmoles intracelulares en condiciones isosmóticas entre la osmolaridad del medio anisosmótico, de manera tal que pierden menos agua que la

esperada en medios hiperosmóticos y acumulan menos en soluciones hiposmóticas (Macknight, 1985). Esta conducta osmótica anómala se explica con base en la existencia de sistemas de transporte que movilizan solutos osmóticamente activos a través de la membrana plasmática y permiten que la osmolaridad intracelular se ajuste a la osmolaridad del medio externo (Eveloff y Warnock, 1987; Hoffmann, 1987; Larson y Spring, 1987; Siebens, 1985). Estos sistemas son capaces de ejecutar la recuperación del volumen original de la célula, una vez alterada la concentración de solutos osmóticamente activos en el medio extracelular. Estos sistemas de transporte, inicialmente reducen el movimiento de agua y posteriormente sacan o meten solutos para igualar la presión osmótica de ambos medios y así ajustan la osmolaridad del medio intracelular con respecto al exterior.

Cuando las células de los animales se exponen a soluciones hiposmóticas, se observa un incremento rápido en el volumen celular seguido de una fase de regulación lenta durante la cual las células alcanzan un volumen muy cercano al valor original; este proceso se ha descrito en distintos tipos celulares entre los que se incluyen células epiteliales (Kirk, et al, 1987a), células ascíticas de Ehrlich (Hoffmann y Simonsen, 1989), células renales (Roy y Sauvé, 1987), linfocitos (Grinstein, et al, 1982a), eritrocitos (Kregenow, 1981; Cala, 1983) y células nerviosas, como astrocitos en cultivo (Olson y Holtzman, 1982; Kimelberg y Frangakis, 1986). Constantemente aparecen nuevos reportes que señalan la presencia de estos procesos de regulación de volumen en otros tipos celulares, por lo que parece ser ésta

una característica muy general de las células de los animales. Aunque estos mecanismos de regulación de volumen se encuentran en la mayoría de las células de los animales, existen tipos celulares incapaces de llevarlo a cabo, como las células del túbulo renal distal de Amphiuma (salamandras) las cuales son incapaces de regular su volumen original una vez que éstas lo han incrementado en soluciones hiposmóticas (Guggino, 1985). Asimismo, únicamente una fracción muy pequeña de eritrocitos de humanos poseen los mecanismos que permiten una regulación eficaz del volumen (O'Neill, 1989).

La disminución del volumen celular, posterior a un incremento provocado por la exposición a un ambiente extracelular hiposmótico, es debido a la expulsión de solutos intracelulares osmóticamente activos seguida de la salida del agua impulsada osmóticamente. Estos solutos pertenecen a dos categorías distintas: 1) iones inorgánicos y 2) compuestos orgánicos. Entre los iones inorgánicos los solutos de mayor importancia son el cloro y el potasio, que se expulsan de las células y permiten la salida del agua (Spring y Ericson, 1982; Grinstein, et al, 1982b; Eveloff y Warnock, 1987). Entre los compuestos orgánicos, los aminoácidos no protéicos, como la taurina, parecen jugar un papel fundamental en este proceso, particularmente en células de animales marinos y eurihalinos (Pierce y Greenberg, 1972; Fugelli y Thoroed, 1986; Fincham, et al, 1987).

VI) Mecanismo de Regulación del Volumen Celular.

La membrana plasmática de las células de los seres vivos es

muy permeable al agua, por lo que siempre que exista una diferencia en la concentración de los solutos celulares con el exterior, es decir, un gradiente osmótico entre el exterior y el interior de la célula, se observarán movimientos netos de agua. En presencia de un gradiente de presión osmótica el agua se moviliza del compartimiento de menor al de mayor presión osmótica, y como consecuencia, el volumen celular aumenta en soluciones hiposmóticas (la célula se hincha) y disminuye en soluciones hiperosmóticas (la célula se plasmolisa).

La célula no se comporta como un osmómetro perfecto, esto se debe a que inicialmente se observa un aumento rápido en el volumen celular debido a la entrada de agua, seguido de una fase de regulación más lenta, durante la cual alcanza un valor muy cercano al volumen original. El proceso mediante el cual una célula expuesta a una solución hiposmótica recupera su volumen original se le conoce con el nombre de Disminución Regulatoria de Volumen o RVD (por sus siglas inglesas). En este proceso la célula regula su volumen mediante la expulsión al espacio extracelular de moléculas intracelulares osmóticamente activas, con lo cual se reduce la presión osmótica intracelular y por lo tanto el contenido de agua, lo que reduce el volumen celular a valores semejantes a los iniciales.

El proceso de regulación del volumen bajo condiciones hiperosmótica se le conoce con el nombre de Incremento Regulatorio de Volumen o RVI. Este proceso se logra a través de la incorporación de osmolitos del medio extracelular hacia el interior de la célula, lo que aumenta la presión osmótica. En

el proceso del incremento regulatorio de volumen, la célula aumentará su volumen para tratar de ajustarlo a los valores originales.

Los solutos osmóticamente activos son aquellos que se encuentran en forma libre, en solución, en el citoplasma. Estos solutos se denominan en conjunto osmolitos. Los solutos que son empleados por las células como osmolitos se pueden dividir en dos grupos: a) iones inorgánicos principalmente el sodio, el cloruro y el potasio (Grinstein et al, 1982a; Roy y Sauvé, 1987) y b) compuestos orgánicos pequeños como polialcoholes (Wirthensohn, 1989), aminoácidos libres (Smith y Pierce, 1987), metilaminas (Nakanishi, et al, 1988), urea (Dépêche y Schoffeniels, 1975) y azúcares (Bagnasco, et al, 1987; Balaban y Burg, 1987). La contribución relativa de cada uno de estos osmolitos puede variar en los distintos tipos de células, como se verá posteriormente.

En resumen, la capacidad de las células para ajustar su volumen modificado por cambios en la osmolaridad del medio, se debe al manejo de la concentración de compuestos intracelulares, osmóticamente activos, que se movilizan en la dirección necesaria para corregir los cambios en la presión osmótica impuestas por las condiciones externas.

La regulación del volumen celular es un proceso complejo que implica varios fenómenos básicos. Primeramente la célula debe ser capaz de detectar los cambios en su volumen. Enseguida la célula debe iniciar un proceso regulador que modifique el contenido intracelular de solutos en la dirección necesaria para corregir el cambio en el volumen. Finalmente debe "recordar" su volumen

inicial y detener los mecanismos que se activaron durante el proceso regulador.

VII) Posibles Señales que Activan los Mecanismos Correctores del Volumen Celular.

Los sensores del volumen celular no se han identificado con certeza pero podría ser uno de los canales descritos recientemente y que se activan por el simple estiramiento de la membrana plasmática (Christensen, 1987; Uhl, et al, 1988; Sigurson y Morris, 1989). Mediante una técnica electrofisiológica desarrollada en los últimos años, es posible medir la actividad de un solo canal en la membrana de una célula. Los resultados muestran que algunos de estos canales se activan muy claramente cuando se produce un estiramiento de la membrana ya sea aplicando una presión externa o bien al disminuir la osmolaridad del medio. Estos canales se han encontrado en varios de los tipos celulares que tienen la capacidad de regular su volumen. La activación de estos canales aumentaría la conductancia de la membrana a ciertas iones u otros factores del exterior al interior de la célula, los cuales a su vez, serían los disparadores de los procesos de regulación del volumen. En esta misma línea de razonamiento también sería factible que estos canales sean directamente los responsables de movilizar flujos iónicos correctores.

Hasta el momento no es muy claro si la salida de solutos en condiciones de hiposmolaridad se encuentra directa o indirectamente asociada con la distensión de la membrana plasmática producida por el aumento del volumen.

Es posible también, que el mecanismo celular de transducción

de señales extracelulares pueda detectar una modificación en el volumen celular, modificando la concentración intracelular de calcio o de los diversos componentes de los sistemas de segundos mensajeros.

Uno de los fenómenos primarios asociados con el incremento en el volumen producido por soluciones hiposmóticas es un aumento en los niveles intracelulares de calcio (Cala, et al, 1986; Pierce, et al, 1988; Suzuki, et al, 1990; Rothstein y Mack, 1990). El aumento en la concentración intracelular de calcio se produce como consecuencia de un incremento en la entrada del catión a la célula. Esta entrada de calcio puede ocurrir a través de canales de calcio activados por la distensión de la membrana producida por el medio hiposmótico (Christensen, 1987) o bien por canales de calcio activados por el fosfatidilinositol 1,3-bifosfato a través de un mecanismo que incluye la participación de una proteína G, sensible a la toxina pertusis (Suzuki, et al, 1990). En algunas preparaciones la regulación de volumen se inhibe en un medio libre de calcio (Amende y Pierce, 1980; Suzuki, et al, 1990), lo que sugiere que la salida de osmolitos está relacionada con un aumento en la concentración interna de calcio. El sitio de acción puede ser directamente los canales de potasio activados por calcio (Hazama y Okada, 1988) o bien mediante el sistema calcio-calmodulina (Pierce, et al, 1989).

Existe, por otra parte, cierta evidencia experimental de la participación de los sistemas transductores de señales extracelulares en el mecanismo de regulación del volumen. La exposición a soluciones hiposmótica induce un aumento en los

niveles intracelulares del AMP cíclico a través de una activación directa de la adenilato ciclasa (Watson, 1990). En condiciones isosmóticas el AMP cíclico es capaz de inducir la liberación de potasio (Mills y Skiest, 1985) y de taurina (Madelian, et al, 1985), sin embargo se desconoce si podría actuar como señal activadora de la salida de estos compuestos en soluciones hiposmóticas.

Al investigar las posibles señales que intervienen en la activación de los mecanismos correctores del volumen celular, no podemos dejar de pensar en la posible participación del citoesqueleto. Existen evidencias que señalan cambios en la organización de éste asociados con la regulación del volumen en condiciones de hiposmolaridad (Ziyadeh, et al, 1992). Sin embargo la desorganización de los microtúbulos del citoesqueleto no necesariamente se encuentra asociada con una pérdida de la capacidad de regulación del volumen.

VIII) Participación de los Iones en el Proceso de Regulación del Volumen.

Al someter a una célula a un medio hiposmótico observaremos después de un tiempo la disminución en el contenido de potasio y cloro intracelular, lo que implica que estos iones deben ser expulsados del interior celular.

Se han propuesto varios mecanismos de transporte activados como respuesta al cambio del volumen. En algunas células esta salida tiene lugar por la activación de un cotransporte electroneutro K^+/Cl^- . Este mecanismo ha sido reportado en eritrocitos de pato (Kregenow, 1981; McManus, et al, 1985; McManus y Schmidt,

1978), de ovejas (Dunham y Ellory, 1981; Ellory y Hall, 1988; Lauf, 1985a), de peces (Borgese, et al, 1987; Bourne y Cossins, 1984; Lauf, 1982) y en eritrocitos de humanos sometidos a altas presiones hidrostáticas (Ellory, et al, 1985; Hall y Ellory, 1986). En otros tipos celulares, la movilización de los iones se lleva a cabo por la activación simultánea de sistemas que intercambian aniones y cationes simultáneamente, que incluye al potasio y al cloro. Por lo general aquellos que funcionan en la regulación del volumen lo hacen por intercambio K^+ / H^+ y Cl^- / HCO^- . El resultado neto es la salida de cloro y potasio y la formación de bicarbonato que es degradado en el interior de la célula, por lo que no contribuye osmóticamente. Cala (1980, 1985a, 1985b), Kregenow (1981) y Siebens (1985), han reportado la presencia de este mecanismo regulador del volumen celular en eritrocitos de Amphiuma (salamandras).

El tercer mecanismo corrector del volumen celular, postulado, parece ser el más ampliamente utilizado en los diversos modelos estudiados. Este mecanismo consiste en la activación de vías de conductancia, constituidas por canales iónicos presentes en la membrana plasmática. Los canales para el cloro y el potasio que participan durante la RVD, han sido identificados por Cheung y colaboradores (1982), Grinstein y colaboradores (1982a, 1982b, 1984) y por Sarkadi y colaboradores (1984, 1985) en linfocitos de humanos, en la línea tumoral de Erlich (Hoffmann, 1978; 1985; Hoffmann, et al, 1986). Recientemente han sido reportados en plaquetas humanas (Livne, et al, 1987; Szász, et al, 1986). Ha sido reportado un canal de

cloro sensible a los cambios de volumen celular, en la membrana basolateral del epitelio de rana (Kristensen y Ussing, 1985), también se han reportado conductancias similares para el potasio en la membrana basolateral de epitelio de rana y en células epiteliales de la vejiga urinaria de sapo (Davis y Finn, 1982 y 1985), en células epiteliales de riñón de ratón y conejo (Eveloff y Warnock, 1987; Kirk, et al, 1987a y b; Roy y Sauvé, 1987; Simmons, 1984).

La presencia de proteínas de membrana en los tres diferentes procesos propuestos para la regulación del volumen celular, indica que su mecanismo de acción, es decir la cinética, determinará el curso temporal de la recuperación del volumen en soluciones hiposmóticas. Cuando participan los sistemas de cotransporte, el proceso es lento y tarda aproximadamente una hora; si se activan los sistemas de intercambio, el proceso regulador se completa en diez minutos aproximadamente, mientras que si se activan los canales de potasio y cloro, el volumen se recupera en un tiempo menor (Lauf, 1985a y b).

IX) Participación de Compuestos Orgánicos en el Proceso de Regulación del Volumen Celular.

Como se mencionó previamente, algunos pequeños compuestos orgánicos, también son utilizados por las células para controlar su volumen. Entre estas moléculas se encuentran la urea, los aminoácidos libres, compuestos cuaternarios de amonio (Fugelli y Thoroed, 1986), polialcoholes como el sorbitol (Siebens y Spring, 1989) y el mio-inositol (Nakanishi, et al, 1988) y metilaminas como la glicerofosforilcolina y la betaina

(Nakanishi, et al, 1988).

Entre los estudios realizados con polialcoholes como osmolitos, se ha visto que el sorbitol y el mio-inositol, incrementan su concentración en las células renales cultivadas en medios hiperosmóticos (Balaban y Burg, 1987; Bagnasco, et al, 1988; Nakanishi, et al, 1988). En otras líneas celulares se observa un aumento en el contenido de las metilaminas: glicerofosforilcolina y betaína, pero no de sorbitol (Nakanishi, et al, 1988).

Entre los aminoácidos libres, la taurina es un candidato ideal para desempeñar un papel como osmoelector muy importante en las células debido a que se encuentra presente en concentraciones muy elevadas en la mayoría de las células de los animales (Jacobsen y Smith, 1968), donde constituye hasta el 70% de la poza total de aminoácidos libres (Pasantes-Morales, et al, 1991; García, et al, 1991). Se encuentra, además, en concentraciones lo suficientemente altas (hasta 80 mM en retina, 28 mM en linfocitos, 60 mM en músculo esquelético y cardiaco) como para contribuir de manera importante a la presión osmótica total y es inerte desde el punto de vista metabólico, ya que no participa en la estructura de las proteínas ni en ninguna reacción del metabolismo primario de la célula (Jacobsen y Smith, 1968). Este aminoácido, por lo tanto, puede moverse y hacer variar la concentraciones intra y extracelular sin afectar otras funciones celulares. Trabajos recientes han demostrado que en varios tipos celulares el curso temporal de la liberación de taurina estimulada por condiciones hiposmóticas es paralelo al la

recuperación del volumen celular (Pasantes-Morales, et al, 1991; García, et al, 1991). La salida de taurina se incrementa con disminuciones crecientes en la osmolaridad del medio de incubación (Sánchez-Olea, et al, 1991; García, et al, 1991), lo que demuestra una relación muy estrecha entre la liberación del aminoácido y un aumento en el volumen celular. Asimismo se ha demostrado en células nerviosas en cultivo, sus niveles de aminoácidos libres y en particular los de taurina, aumentan notablemente al ser expuestas a condiciones hiperosmóticas (Sánchez-Olea, et al, 1992). En estudios *in vivo* se ha demostrado que una condición de hipernatremia (niveles elevados de sodio en el plasma, haciendolo mas hiperosmótico) aumenta el contenido interno de taurina en diversos tejidos, que incluyen el corazón, el cerebro además de en las plaquetas (Thurston, et al, 1981; Nieminen, et al, 1988). Como contraparte, la hiponatremia da como resultado una disminución importante en los niveles de taurina en los tejidos recién mencionados.

X) Importancia Relativa de los Componentes Iónico y Orgánico en el Proceso de Regulación de Volumen.

La contribución de los solutos orgánicos e inorgánicos en los procesos de regulación del volumen varía según las diferentes preparaciones estudiadas. Parece ser que los aminoácidos libres son los osmoefectores de mayor importancia en células de animales eurihalinos, mientras que los iones potasio y cloruro son los solutos osmoefectores más importantes en células de animales terrestres, tal vez con la excepción de las células nerviosas. En linfocitos y células renales se ha calculado que la salida de

aminoácidos constituye alrededor de un 30% del total de solutos expulsados del interior celular en condiciones hiposmóticas (Sánchez-Olea, et al, 1991), mientras que el restante 70% se encuentra constituido por los iones potasio y cloruro (Roy y Sauvé, 1987; Hoffmann, et al, 1988).

Las células del sistema nervioso central parecen ser una excepción en el sentido de que los iones no actúan preferentemente en el proceso de regulación del volumen (Sánchez-Olea, et al, 1992) sino en condiciones extremas de cambios en el volumen celular. Esto se explica fácilmente al considerar la importante función que desempeñan los iones inorgánicos en la comunicación intercelular y en el control de la excitabilidad nerviosa. Es posible, por lo tanto, que en estas células la contribución de los osmólitos orgánicos sea mucho más importante que en otras.

XI) Importancia de la Regulación del Volumen en Células de Animales.

Un gran número de individuos de diferentes especies, tanto de plantas como de animales, son capaces de vivir en aguas con distinta concentración de sales. Los salmones son tal vez uno de los mejor conocidos pero todas las especies de vertebrados e invertebrados que viven en lagunas salobres son otros tantos ejemplos de este interesante fenómeno biológico. Los elementos celulares de los líquidos circulatorios de estos animales (sangre, linfa, hemolinfa), ajustan su volumen a los cambios en salinidad de estos líquidos y en algunas especies también las células que forman los tejidos tienen esta capacidad de

adaptación. Durante mucho tiempo se pensó que la propiedad de regular el volumen celular estaba limitada a las especies que efectivamente requerían de este control para la supervivencia. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que un gran número de células de animales terrestres, que están siempre expuestas a fluidos de osmolaridad muy controlados, poseen también esta capacidad. La regulación de la osmolaridad de los líquidos corporales de estos animales se lleva a cabo a través de los distintos tipos de órganos renales, los cuales se encargan de mantener la isosmolaridad de estos líquidos. Cada vez existe mayor evidencia experimental que sugiere que los mecanismos de regulación del volumen pueden activarse aún en estas condiciones de osmolaridad controlada y parecen participar de manera paralela en funciones celulares básicas. Entre tales funciones se encuentran los procesos de transporte de sustancias a nivel de membrana plasmática: movilización de sustancias nutritivas como azúcares y aminoácidos, las funciones de secreción, etc. Así como los movimientos de orgánulos intracelulares, de manera particular el citoesqueleto y por supuesto las fases de crecimiento y división celular. En todas estas situaciones se crean gradientes osmóticos microscópicos que dan lugar a cambios locales y transitorios en el volumen de la célula. Es posible por esta razón que los procesos de regulación del volumen se encuentren presentes en prácticamente todos los tipos celulares, independientemente de las características del medio externo en el que se desenvuelve el animal del que forman parte.

En condiciones fisiológicas la mayoría de las células de un

organismo pluricelular no se encuentran expuestas a situaciones anisomóticas. La osmolaridad de los fluidos corporales de los mamíferos es aproximadamente de 285 mOsmolas/l y este valor se mantiene prácticamente constante, sólo muestra pequeñas fluctuaciones que no exceden a un 3% de este valor (Hoffmann y Simonsen, 1989). Sin embargo, en condiciones patológicas la osmolaridad del plasma puede oscilar entre 220 y 350 mOsmolas/l, lo que resultaría, en ausencia de mecanismos reguladores del volumen, en un incremento o disminución del volumen de las células sanguíneas de aproximadamente un 30% y un 20%, respectivamente (Macknight, 1983; Macknight y Leaf, 1985). Un ejemplo de esta situación es lo que ocurre en el cerebro, en donde un aumento en el volumen de las células gliales (células que acompañan a las neuronas y juegan un papel importante en la homeostasis cerebral) está asociado a numerosas neuropatologías, entre las que se encuentran las epilepsias, la isquemia (que se genera durante accidentes vasculares), en los traumatismos craneanos y la encefalopatía hepática. Dada la restricción que impone el reducido espacio de la caja craneal, el edema que resulta de esta alteración en el volumen celular es en muchos casos, una complicación aún más grave que la patología que le dió origen. Un mejor conocimiento de los mecanismos responsables de mantener el volumen celular en el cerebro, puede llevar a un manejo más racional de este tipo de secuelas e idealmente, al diseño de fármacos y procedimientos para prevenir estas alteraciones en el volumen celular.

Es importante mencionar que en condiciones fisiológicas

algunos tipos celulares como las células epiteliales del intestino y las células de la sangre de los capilares intestinales, posiblemente se encuentren en un medio hiposmótico después de una ingesta excesiva de agua (Hoffmann y Simonsen, 1989). Las células renales son otro ejemplo de células que in vivo pueden ser expuestas a soluciones anisomóticas.

Existen estudios que demuestran que en rebanadas de cerebro ciertos neurotransmisores, como por ejemplo la norepinefrina y la adenosina, son capaces de incrementar el contenido de agua celular, de manera dependiente de cloro extracelular. Este efecto se previene con antagonistas sinápticos específicos (Bourke, et al, 1983), lo que indica que este proceso está ocurriendo en las neuronas. El aumento en el volumen celular observado en neuronas en cultivo en presencia de aminoácidos excitadores como el ácido glutámico y el ácido aspártico, así como agonistas de los receptores a estos compuestos, también es prevenido en un medio sin cloro o sodio (Choi, 1987).

En general puede afirmarse que cualquier proceso que conduzca a una variación (decremento o incremento) en la concentración intracelular de solutos osmóticamente activos (iones inorgánicos o compuestos orgánicos), producirá un cambio en el contenido celular de agua. Se ha demostrado que la captura de aminoácidos o azúcares, acoplada con la entrada de sodio, produce una activación de los procesos reguladores de volumen en células epiteliales (Lau, et al, 1984; Schultz, et al, 1985) y en hepatocitos (Kristensen y Folke, 1984; Kristensen, 1986). Ciertos fenómenos del metabolismo celular, como la glucogenólisis en

hepatocitos y la lipólisis en adipocitos, también puede conducir a un aumento en los niveles intracelulares de osmolitos (Kristensen, 1986). Igualmente el metabolismo de las fibras musculares durante el ejercicio incrementa los solutos intracelulares libres y activa los mecanismos regulatorios del volumen celular (Saltin, et al, 1987). Existe evidencia, como ya se ha mencionado, que señalan que existen cambios en el volumen asociado con la actividad neuronal en la retina (Orkand, et al, 1984) y en rebanadas de corteza cerebral (Lipton, 1973). El aumento del volumen celular es producido por la entrada de iones a la célula durante la despolarización y se previene sustituyendo el cloro por un anión impermeable como el gluconato (Lipton, 1973). Todos los ejemplos mencionados en el párrafo anterior, nos demuestran como es posible la variación de volumen en condiciones isosmóticas, en donde se forman microambientes temporales, de manera tal que se pueden dar movimientos de agua.

En los organismos adaptados a vivir en condiciones hiperosmóticas, el incremento en los niveles intracelulares de los osmolitos orgánicos puede deberse tanto a la activación de los sistemas de transporte membranal como a un aumento en la síntesis o degradación de ellos. En tejidos de crustáceos, el aumento en los niveles de los aminoácidos se encuentra asociado con una disminución temporal en las concentraciones de estos compuestos en el plasma (Gilles, 1977). En eritrocitos el aumento intracelular de taurina observado en un medio hiperosmótico también es el resultado de una acumulación del aminoácido del medio externo (Fugelli y Reiersen, 1978). En

astrocitos es posible que una reducción en el volumen celular estimule la síntesis de un mayor número de transportadores de aminoácidos, como se ha sugerido para células renales en cultivo (Uchida, et al, 1991). En tejido muscular esquelético (Lehmann, 1989) la perfusión con soluciones hiperosmóticas disminuye la liberación basal de taurina y lo mismo ocurre con astrocitos (Sánchez-Olea, et al, 1992), por lo que es posible que el aumento en los niveles de aminoácidos endógenos observados en condiciones hiperosmóticas, sea el resultado de un aumento en la entrada y una disminución en la salida. En células renales el aumento en los niveles de sorbitol se encuentra asociado con una mayor actividad de la aldosa reductasa, enzima responsable de su síntesis a partir de glucosa; el incremento en la actividad de la enzima es debido a una síntesis de la aldosa reductasa, estimulada por condiciones de hiperosmolaridad (Bagnasco, et al, 1988). En bacterias adaptadas a condiciones hiperosmóticas la acumulación de la betaína es resultado tanto de un aumento en la captura como de un incremento en la síntesis de la misma.

En resumen, podemos enfatizar que la regulación de volumen es una propiedad fundamental para la adaptación de los organismos que viven en condiciones de osmolaridad cambiante, como los acuáticos (en particular los de lagunas salobres). No obstante que en condiciones fisiológicas la mayoría de las células de un organismo pluricelular no se encuentran expuestas a condiciones anisomóticas (excepto en animales eurihalinos y células renales de animales terrestres), recientemente se ha demostrado que un gran número de células de animales terrestres (y quizá de otros

tipos celulares) requieren este control para su supervivencia. El mecanismo de control de volumen celular no es sólo una herencia evolutiva de un pasado en medios acuáticos; es también un mecanismo necesario para la supervivencia de las células ante los cambios en el microambiente producto de la actividad celular normal. Sin duda alguna el mecanismo de regulación del volumen celular es una propiedad fundamental para la supervivencia de las células.

OBJETIVO GENERAL:

En el presente trabajo se pretende contribuir a dilucidar la importancia relativa del ión inorgánico potasio como osmoefector durante el proceso de regulación del volumen observado bajo el efecto de soluciones hiposmóticas.

El conocimiento de los mecanismos que están involucrados en la regulación de volumen, cuando sometemos a los astrocitos a condiciones anisomóticas in vitro; ayudará a entender los procesos que se activan en condiciones fisiológicas para compensar las situaciones en las que se forman gradientes osmóticos locales que dan lugar a cambios regionales y transitorios en el volumen de la célula. Así como al diseño de estrategias terapéuticas en contra de neuropatologías relacionadas con un aumento de el volumen celular en el cerebro.

Para cumplir con este objetivo se utilizó como modelo experimental a los astrocitos de cerebelo de rata en cultivo. Este tipo celular posee la capacidad de regular su volumen bajo condiciones hiposmóticas; se cuenta con una información amplia de su fisiología celular y es relativamente fácil cultivarlos bajo condiciones in vitro; motivos por los cuales lo hacen un modelo ideal dentro de las células del sistema nervioso.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

1 - Determinar la participación relativa de el potasio en astrocitos como un osmolito bajo condiciones hiposmóticas.

2 - Encontrar algunos parámetros que permitan indentificar los mecanismos de salida del potasio en condiciones hiposmóticas.

3 - Examinar una posible relación entre la liberación de potasio y cloro asociada con los procesos de regulación del volumen celular en los astrocitos.

4 - Analizar las características de los movimientos de potasio en respuesta a los incrementos en el volumen celular producidos por soluciones hiposmóticas; por lo que se estudiará:

a) El curso temporal.

b) La farmacología.

c) La dependencia iónica.

d) La sensibilidad a la temperatura.

5 - Determinar la importancia del calcio intracelular como posible señal que interviene en la salida de potasio sensible a cambios en el volumen celular en astrocitos del cerebello.

METODOS EXPERIMENTALES:

1. Cultivos de Astrocitos.

Los cultivos primarios de células astrogiales del cerebelo de la rata se realizaron según lo descrito por Morán y Patel (1989). Los cultivos primarios fueron enriquecidos con células cerebelares astrogiales. Las células, de 8 días de edad, fueron sembradas a una densidad de 225×10^3 células / cm^2 en cajas petri multipozos (35 mm de diámetro). El medio de cultivo contenía medio basal de Eagle suplementado con 10% de suero fetal de ternera, inactivado por calor (GIBCO), 2 mM de glutamina, 50 U/ml de penicilina y 50 microgramos / ml de estreptomycin. Las cajas petri fueron incubadas a 37 grados centígrados en aire saturado de vapor de agua con 5% de CO_2 . La composición de los cultivos celulares fue valorada inmunológicamente usando técnicas de fluorescencia. Las neuronas fueron marcadas específicamente con la toxina del tétanos; los astrocitos fueron identificados con un anticuerpo policlonal agonista para la proteína fibrilar ácida de la glia (GFAP; Sigma, St. Louis, MO), mientras los fibroblastos fueron marcados con el anticuerpo monoclonal agonista Thy-1. Del resultado de estas pruebas se estableció que los cultivos contenían en su mayor parte astrocitos (>95% positiva contra GFAP).

2.- Protocolos Experimentales.

En el presente trabajo se realizaron dos estrategias experimentales para cuantificar la liberación de potasio en

astrocitos bajo condiciones de hiposmolaridad. El primer enfoque experimental consistió en la medición directa, mediante un flamómetro, del potasio endógeno que quedaba en la célula después del choque hiposmótico. La segunda estrategia experimental fue radiométrica, por medio del rubidio Rb^{86} como trazador de los movimientos de potasio. Esta elección se basa en abundante evidencia experimental en la que se ha establecido que el Rb, al tener un diámetro atómico semejante al potasio, tiene un comportamiento muy similar a éste ión. Por otra parte el isótopo radioactivo de el potasio posee una vida media muy corta, además de presentar riesgos contra la salud.

3. Cuantificación de la salida de potasio con el flamómetro:

Después de dos semanas *in vitro*, se reemplazó el medio de cultivo celular por un medio con el amortiguador ácido salino N-2-hydroxiethylpiperazina-N'-2-etanosulfónico (HEPES) que contenía el medio experimental o control requerido según cada situación. El medio hiposmótico fue preparado reduciendo la concentración de NaCl. Algunos experimentos fueron realizados en un medio libre de cloro, en los que se reemplazó al KCl y al NaCl por sus respectivas sales de gluconato y nitrato. Las células estuvieron expuestas a la acción de los fármacos durante el periodo de incubación. Algunos fármacos requerían de un periodo de preincubación de 15 minutos esto se realizó con un medio isosmótico con potasio. Cuando las drogas fueron disueltas en disolventes distintos al agua, los controles se expusieron a la misma concentración del solvente usado.

Los experimentos se realizaron de la siguiente manera:

i) Sin preincubar.

- Se quita el medio de cultivo de la caja petri.
- Se lava dos veces con un medio isosmótico sin potasio y el tercer cambio es la condición experimental.
- Se incuba 15 minutos con la condición experimental.
- Se lava tres veces con un medio de lavado normal, dejando la caja petri seca.

ii) Preincubando.

- Se quita el medio de cultivo de la caja petri.
- Se pone medio isosmótico con potasio; se preincuba 15 minutos (con o sin fármaco).
- Se quita el medio isosmótico-potasio y se lava dos veces con un medio isosmótico sin potasio y el tercer cambio es la condición experimental.
- Se incuba 15 minutos.
- Se lava tres veces con un medio de lavado normal, la caja se queda seca.

iii) En general, para ambos protocolos.

Después del periodo de incubación o preincubación, según el caso:

- Se agregan 700 μ l de agua bidestilada, por caja, para lisar a la célula y se dejan transcurrir una hora.
- Se recolecta el producto de dos cajas petri bajo el mismo tratamiento experimental.
- Se lava nuevamente, las dos cajas, con 300 μ l de agua bidestilada para cerciorarse de que no se quede nada de potasio en la caja de petri (volumen final 1.7 ml por muestra).
- Se centrifuga, durante 15 minutos, a 10,000 rpm para precipitar los restos celulares.
- Se separa el botón del sobrenadante. El botón se utiliza para cuantificar la cantidad de proteína (mediante el método de Lowry) y el sobrenadante para medir la cantidad de potasio que se quedó en la célula después del choque osmótico.
- Los resultados son reportados en micromolas de potasio por miligramo de proteína.

4. Cuantificación de la salida de potasio por el método radiométrico.

Después de dos semanas in vitro, las células fueron incubadas en un medio que contenía Rb^{86} (2.0 $\mu\text{Ci/ml}$, actividad específica) por 60 minutos. Después de la incubación, el medio de

cultivo fue reemplazado por un medio HEPES. Los medios utilizados se prepararon conforme serán descritos. Una vez que se lavó, rápidamente, tres veces con el medio isos-HEPES, las células fueron perfundidas a una velocidad de 1 ml/min por 5 minutos, tiempo en el cual se determinó la liberación basal de Rubidio. En el tiempo indicado para cada experimento, el medio de perfusión fue reemplazado por el medio análogo de osmolaridad reducida. Las muestras fueron colectadas cada minuto durante 20 minutos. Al final del experimento la radioactividad que se liberó al medio y la que quedó remanente en las células fue medida en un contador de centelleo. Los resultados se expresan como porciento de la radioactividad total presente en las células. En un experimento típico, la radiactividad liberada por minuto en condiciones hiposmóticas fue aproximadamente de 600 cuentas por minuto (cpm) y de 1,400 después de la estimulación de un total de 35,000 cpm acumuladas por célula. Obviamente, el número varía de acuerdo al tiempo de almacenamiento ("stocks") del rubidio, cuya vida media es de 18.8 días.

La cuantificación del volumen celular fue determinada por un "chanalaizer" (modelo ZM 256). Las células fueron liberadas de la monocapa por tratamiento con medio con tripsina-EDTA (libre de calcio y magnesio), durante 10 minutos. Las células que se liberaron fueron centrifugadas y resuspendidas en un medio isosmótico. Al tiempo cero, una muestra de las células en suspensión fue diluida aproximadamente 100 veces con el medio experimental, y el volumen celular fue registrado en un contador de células acoplado con un analizador de canales (chanalaizer).

Los cambios en el volumen celular para la población celular fueron cuantificados con respecto a la calibración con microesferas de latex de 9.63 μm de diámetro.

5. Medios de incubación.

a). Isosmótico 100%.

Solución salina-HEPES. 135 mM de NaCl, 1 mM de CaCl_2 , 0.5 mM de MgSO_4 , 5 mM glucosa y 10 mM de HEPES. 290 mosM. pH 7.4

b). Hiposmótico 50%.

Solución salina-HEPES. 62.8 mM de NaCl, 1 mM de CaCl_2 , 0.5 mM de MgSO_4 , 5 mM de glucosa y 10 mM de HEPES. 145 mosM. pH 7.4

c). Medio con potasio.

Medio seleccionado más KCl 5 mM.

d). Medio de lavado.

Solución salina-HEPES. 139.5 mM de NaCl y 10 mM de HEPES. 290 mosM. pH 7.4

e). Medio isosmótico sin calcio.

Solución salina-HEPES. 136.5 mM de NaCl, MgSO_4 0.5 mM, glucosa 5 mM y 10 mM de HEPES. 290 mosM. pH 7.4

f). Medio hiposmótico sin calcio.

Solución salina-HEPES. 64.3 mM de NaCl, MgSO_4 0.5 mM, glucosa 5 mM y 10 mM de HEPES. 145 mosM. pH 7.4

g). Medio isosmótico sin calcio, más magnesio (20 mM).

Solución salina-HEPES. 106.5 mM de NaCl, MgSO₄ 0.5 mM, glucosa 5 mM, MgCl₂ 20 mM y 10 mM de HEPES. 290 mosM. pH 7.4

h). Medio hiposmótico sin calcio, más magnesio (20 mM).

Solución salina-HEPES. 34.3 mM de NaCl, MgSO₄ 0.5 mM, glucosa 5 mM, MgCl₂ 20 mM y 10 mM de HEPES. 145 mosM. pH 7.4

6. **Fármacos y concentraciones utilizadas.**

Inhibidores de canales de potasio (K⁺).

- Tetraetilamonio (TEA). 15 mM.
- 4-Aminopiridina (4-AP). 1 mM.
- Quinidina. 200 μM.

Inhibidores de canales de cloro (Cl⁻).

- 2,2' ácido disulfónico 4-4' disotiocyanostilbano (DIDS). 200 μM.
- Difenilamino-2-carboxilato (DPC). 1 mM.
- Antraceno-9-carboxilato (9-AC). 1 mM.
- Dipiridamol. (100 μM).

Inhibidores de el cotransporte electroneutro K⁺/Cl⁻.

- Bumetamida. 50 μM.
- Furosemida. 1 mM.

RESULTADOS:

1). Cambios en el Volumen Celular.

La reducción en la osmolaridad del medio de 290 mosM (condición isosmótica) a 145 o 200 mosM, provoca un aumento inmediato en el volumen celular de los astrocitos. Se observó el incrementos del 62 y 40% en soluciones de 145 o 200 mosM, respectivamente. En todos los casos el hinchamiento fué seguido por una reducción en el volumen de la célula, no obstante, nunca se alcanzó la recuperación total del volumen original (18-20% por encima del control). Inicialmente se observa una fase rápida de aumento de volumen celular, comprendida en el primer minuto, seguida de una fase más lenta, durante los subsecuentes 15 minutos aproximadamente, la cual corresponde a los mecanismos correctores del volumen celular (gráfica 1).

2). Efecto de la Hiposmolaridad en la Salida de Potasio.

La liberación basal de rubidio en condiciones, hiposmóticas fue aproximadamente de 1.4% / minuto. Una reducción en la osmolaridad del 15% (245 mosM) no afecta la salida de rubidio. Mientras que un decremento en la osmolaridad de 290 a 200 mosM (reducción del 30%) muestra un incremento no significativo en la liberación del Rb. Por su parte, al reducir la osmolaridad de 290 mosM (isosmótico) a 145 o 87 mosM (una disminución en 50% y 70% , respectivamente) se observó una salida rápida de Rb, marcadamente superior a la liberación basal observada bajo condiciones isosmóticas (gráfica 2). La salida de rubidio se

presentó en los primeros minutos después de la estimulación, y declinó lentamente hacia el final del experimento, esta observación concuerda con la fase rápida de aumento del volumen celular seguida de una fase lenta de recuperación de éste. Cuando se midió directamente el contenido de potasio que quedaba en la célula después de exponerla a las mismas reducciones de osmolaridad (gráfica 3), se observó un comportamiento similar: una reducción del 17.8% con una disminución del 15% (hiposmótico 85%) y del 45.1% con una reducción del 50%, ambas diferencias son significativas.

3). Efecto de los Fármacos que Afectan al Contranporte K^+/Cl^-

El cotransportador electroneutro $K^+ - Cl^-$ que se activa por hinchamiento en varios tipos celulares, es inhibido por furosemida y bumetamida. Este transportador es estrictamente dependiente a la presencia de Cl^- (o Br^-) y es inactivado cuando el nitrato o gluconato reemplaza al cloro en el medio (Hoffmann, y Simonsen, 1989; Lauf, 1985c). En eritrocitos este cotransportador $K^+ - Cl^-$ es activado por el reactivo sulfidrilo N- etilmaleimida (NEM) (Lauf, 1985c).

La salida de rubidio activada por un aumento en el volumen celular, se inhibición de manera dependiente de la concentración, en presencia de furosemida, que fue máxima en 2 mM. La bumetamida, por su parte, no causó ninguna inhibición a concentraciones de 50 a 250 μM (gráfica 4).

4). Efecto de los Bloqueadores de Canales de K^+ .

El efecto de los inhibidores de canales de potasio tetraetilamonio (TEA), bario, 4-Aminopiridina (4-AP) y quinidina, fue examinado. De todas estas drogas únicamente la quinidina exhibe una clara inhibición dependiente de la concentración, que reduce la liberación de Rb aproximadamente es un 60% con una concentración de 0.6 mM (graf. 5).

Por otra parte, al medir directamente el potasio pudimos constatar que la quinidina produce una inhibición del 35% en la liberación estimulada por una reducción en la osmolaridad (gráfica 6). Los controles muestran una disminución significativa del contenido de potasio del 35.7% al pasar a las células de un medio con 290 mosM a otro con 145 mosM. En presencia de quinidina 200 μ M, la disminución del potasio endógeno después del choque hiposmótico, es de 23.2%. La presencia de este fármaco inhibe además la liberación basal de potasio (diferencia significativa mostrada por t de student: $P < 0.0025$, $n = 27$ datos).

5). Efecto de los Inhibidores de Canales de Cloro.

El DIDS produce una inhibición muy marcada sobre la liberación de Rb, la cual fué dependiente de la concentración (gráfica 7). Se examinaron diferentes concentraciones de este fármaco, siendo la mayor de éstas (400 μ M) la que generó una mayor inhibición (85%) de la salida de Rb provocada por hiposmolaridad. A concentraciones menores, de 100 y 200 μ M, se observaron reducciones de la liberación de Rb del 66 y 75%, respectivamente. Aún en las concentraciones relativamente bajas

de 25 y 50 μM , el DIDS causó un efecto inhibitorio del 42 y del 51%, respectivamente.

Otros bloqueadores de canales de cloro como el 9-Antraceno (9-AC) y el DPC disminuyeron entre un 15 y un 20% la salida de Rb (gráfica 7). Ninguno de estos compuestos mostró efectos inhibitorios en la liberación de Rb en condiciones isosmóticas.

En la gráfica número 8 podemos observar que el DIDS (200 μM) tiene un efecto inhibitorio del 34.7% sobre la salida de potasio estimulada por la hiposmolaridad. La situación control muestra una disminución significativa en la concentración de potasio de 36.6%; mientras que la condición experimental muestra una reducción, también significativa, del 3.9%.

El dipiridamol (100 μM) tiene el mayor efecto inhibitorio, cuando se midió la liberación de potasio, como se muestra en la gráfica 9, del 61.6%. La condición control muestra una liberación significativa del 24.2%; por su parte la condición experimental únicamente del 9.3%.

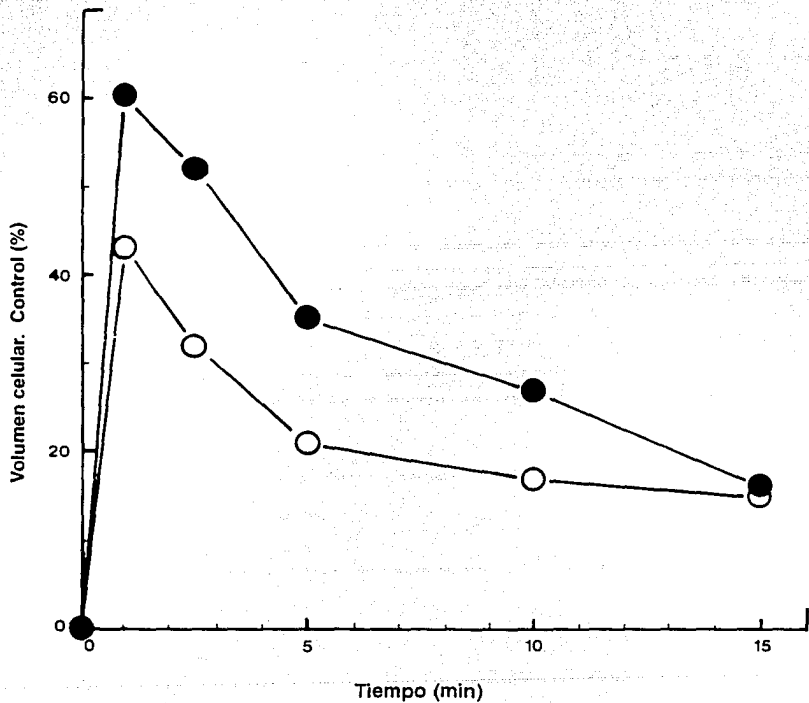
6). Efecto del Calcio Extracelular.

Cuando las células fueron incubadas en un medio libre de calcio que contenía ácido tetraacético etileno glicol (B-amino etil eter N,N,N',N' (EGTA, 0.5 mM), se observó un importante incremento en la liberación de Rb en condiciones isosmóticas (gráfica 10); sin embargo, por su parte, la rápida liberación provocada por la hiposmolaridad no experimentó ninguna modificación (gráfica 10).

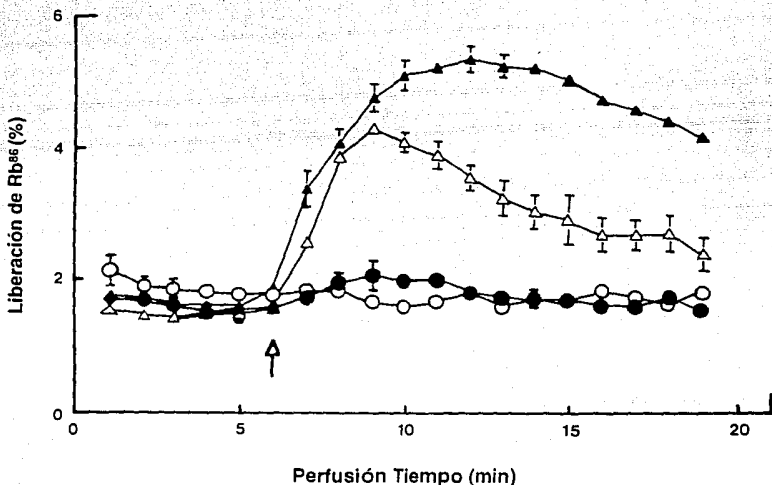
Es en este renglón en donde ambas estrategias experimentales parecen no tener concordancia. Cuando medimos directamente el potasio endógeno que queda en la célula después del choque hiposmótico, observamos una dependencia aparentemente clara del proceso al calcio: un medio sin calcio presenta una inhibición del 54% aproximadamente; un medio con la presencia del quelante de calcio EGTA (0.5 mM) presenta una inhibición del 60%, al igual que un medio con la presencia de magnesio ($MgCl_2$ 20 mM). Esta supuesta contradicción parece tener su respuesta al analizar la gráfica número 10, en donde se observa que un medio libre de calcio estimula marcadamente la liberación de Rb en condiciones isosmótica. Si tomamos esto en cuenta el problema se reduce a un efecto por la temporalidad de los eventos, al examinar el potasio remanente exclusivamente se observa qué pasa después de 15 minutos del choque osmótico y no lo que sucede en este intervalo. Lo que se observa es, por lo tanto, una disminución en la concentración intracelular de potasio provocada por la salida basal de potasio estimulada por la ausencia de calcio (gráfica 11).

7). Efecto de la Temperatura.

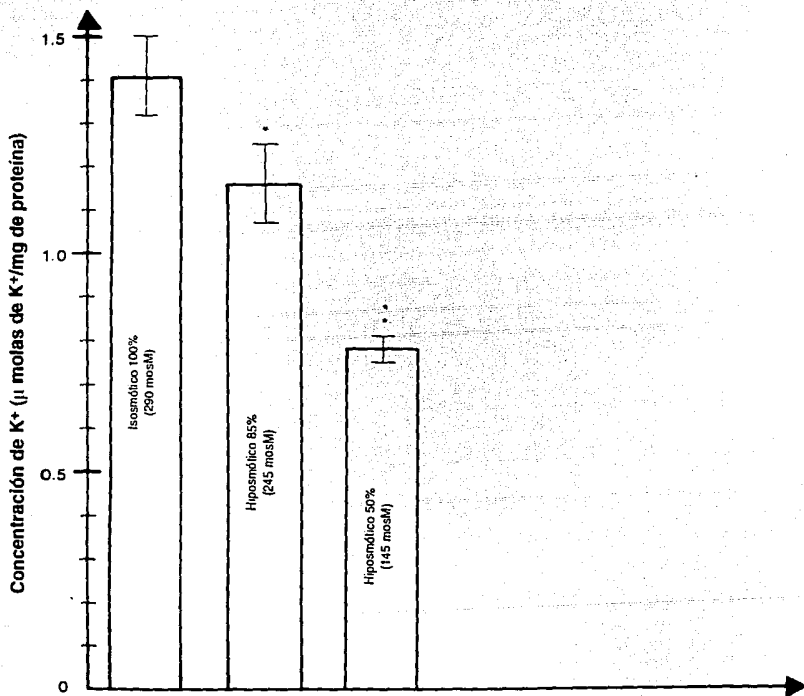
Una reducción en el medio de perfusión de 37 a 23 o a 15 grados centígrados no afecta la liberación de Rb sensible a la hiposmolaridad; no obstante una reducción de la temperatura a 4 grados centígrados inhibió totalmente esta liberación (gráfica 12).



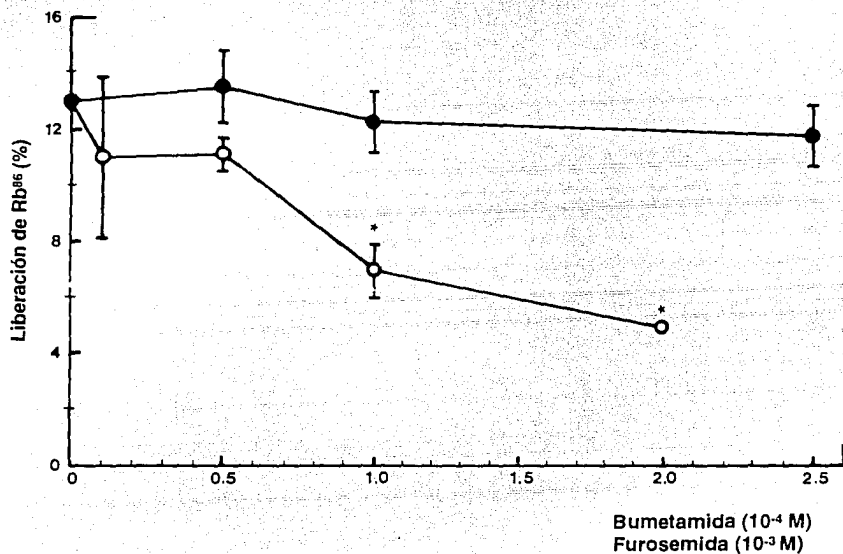
Gráfica 1. Disminución regulatoria del volumen celular con respecto al tiempo en astrocitos de cerebelo de rata en cultivo, en medios hiposmóticos: 145 mosM (●) y 200 mosM (○). La reducción en la osmolaridad se obtuvo disminuyendo la concentración de NaCl de 135 a 60 o 90 mM. Las medidas fueron obtenidas por un chanaizer (ver métodos). Los cambios en el volumen celular se expresan como porcentaje del incremento sobre la condición isosmótica (290 mosM).



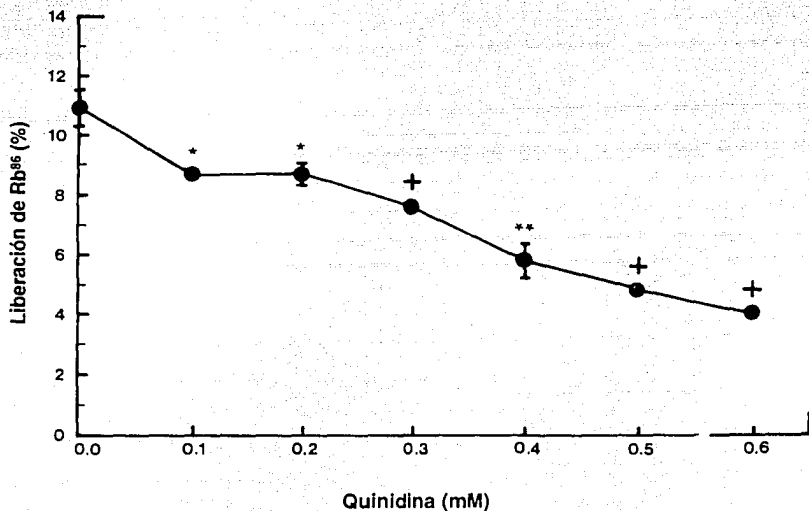
Gráfica 2. Curso temporal de la liberación de Rb⁸⁶ estimulada por hiposmolaridad. Las células fueron precargadas, lavadas y perfundidas con un medio isosmótico (290 mcsM). La flecha indica el tiempo en el cual la perfusión fue substituida por medios hiposmóticos de 87 (▲), 145 (△), 200 (●) y 242 mosM (○). Al final de la perfusión, la radioactividad restante en la célula fue colectada y medida. La medida de la liberación de Rb se expresa como el porcentaje de la radioactividad total acumulada en la célula en cada tiempo. Los resultados son promedios ± ES de 4 a 12 experimentos



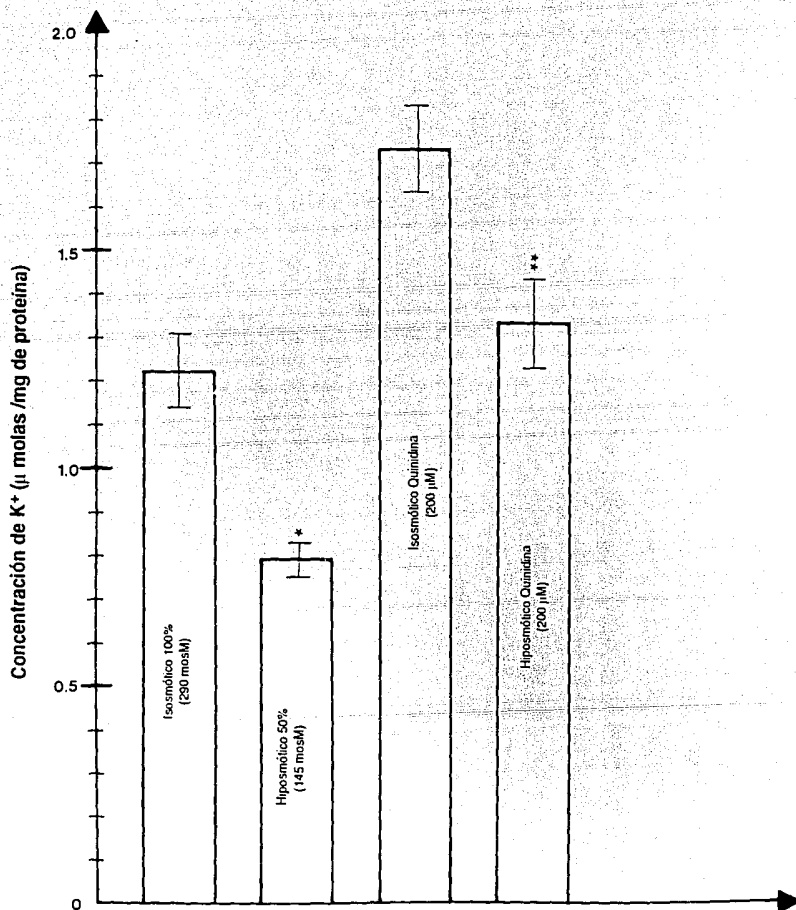
Gráfica 3. Curva contra osmolaridad. El medio de cultivo fué substituido por un medio isosmótico (290 mosM) sin K⁺. Se incubó 15 minutos con el medio experimental: isosmótico 290 mosM o hiposmótico 145 y 245 mosM. Al final de la incubación las células fueron lavadas y el contenido de potasio cuantificado con un flammómetro. Los resultados son promedios \pm ES de 15 a 17 experimentos. Existen diferencias significativas (prueba estadística t de Student) con respecto al control (medio isosmótico). *P < 0.025 y ** P < 0.001.



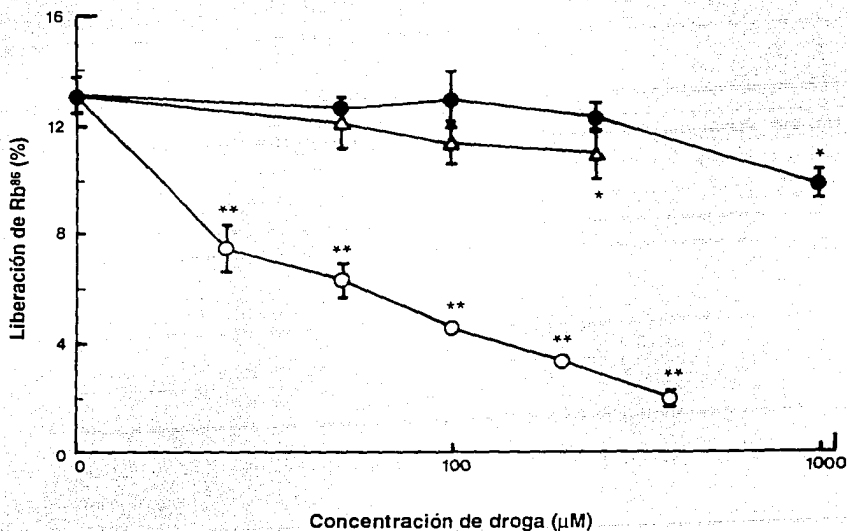
Gráfica 4. Efecto de la furosemida y bumetamida sobre la liberación de Rb⁸⁶ producida por condiciones hiposmóticas. Las células fueron cargadas y perfundidas como se describe en los métodos. La liberación se estimuló en un medio hiposmótico 50% (145 mosM). La bumetamida (●) y la furosemida (○) estuvieron presentes durante toda la perfusión. Los resultados se expresan como promedios ± ES de 4 a 10 experimentos. Muestran una diferencia significativa con respecto al control, * P < 0.001 (prueba estadística t de Student).



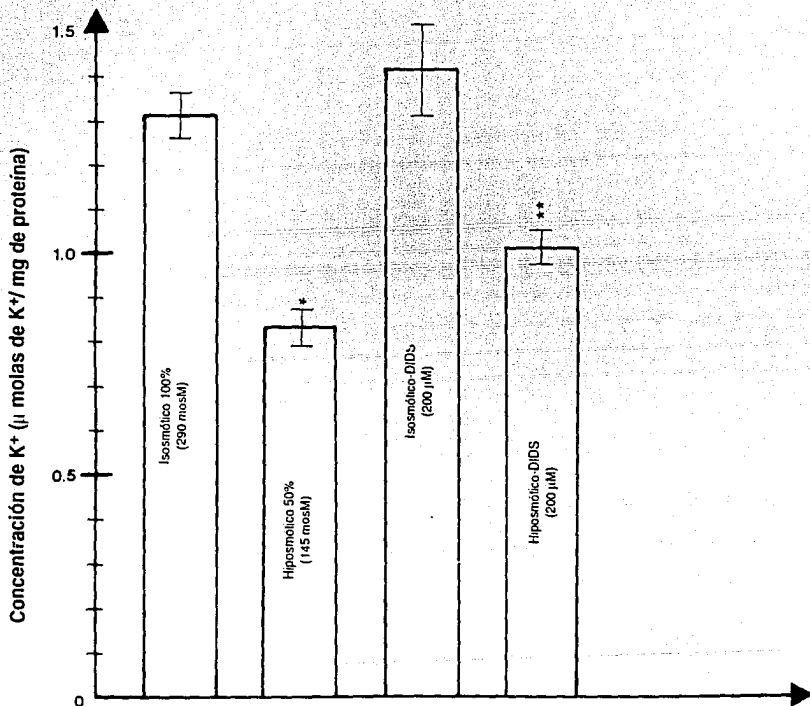
Gráfica 5. Efecto de la quinidina sobre la liberación de Rb⁸⁶ estimulada bajo condiciones hiposmóticas (145 mosM). Las células fueron cargadas, lavadas y perfundidas en un medio isosmótico o hiposmótico que contenía las concentraciones de quinidina indicadas. Los resultados se expresan como el promedio \pm ES de 2 a 10 experimentos. + n = 2. Existe una diferencia significativa con respecto al control, * P < 0.01; ** P < 0.001 (prueba estadística t de Sudent).



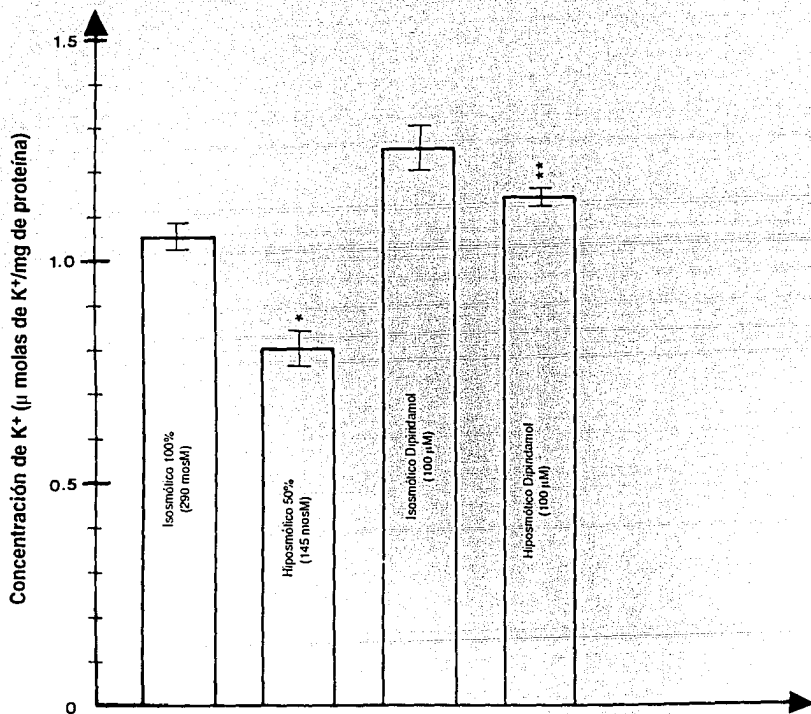
Gráfica 6. Efecto de la quinidina (200 μ M) sobre el contenido de potasio en astrocitos sometidos a un choque hiposmótico (145 mosM). Los resultados se expresan como el promedio \pm ES de 12 a 15 experimentos. Existe una diferencia significativa con respecto al control (medio isosmótico con y sin fármaco). * $P < 0.001$ y ** $P < 0.0025$ (prueba estadística t de Student).



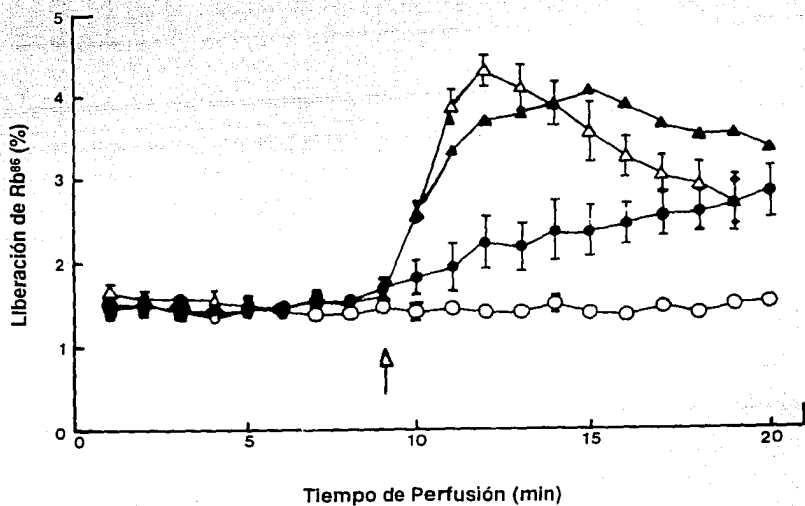
Gráfica 7. Efecto de inhibidores de canales de Cl^- en la liberación de Rb^{86} estimulado por hiposmolaridad (145 mosM). Las células fueron cargadas, lavadas y perfundidas con medio isosmótico e hiposmótico (145 mosM) conteniendo DIDS (o), DPC (Δ) o 9-AC (\bullet) en las concentraciones indicadas. Los astrocitos fueron expuestos durante 10 minutos a fármacos, durante todo el tiempo de perfusión. Los resultados se expresan como el promedio \pm ES de 8 a 16 experimentos. Diferencia significativa con respecto al control, * $P < 0.05$; ** $P < 0.001$ (prueba estadística t de Student).



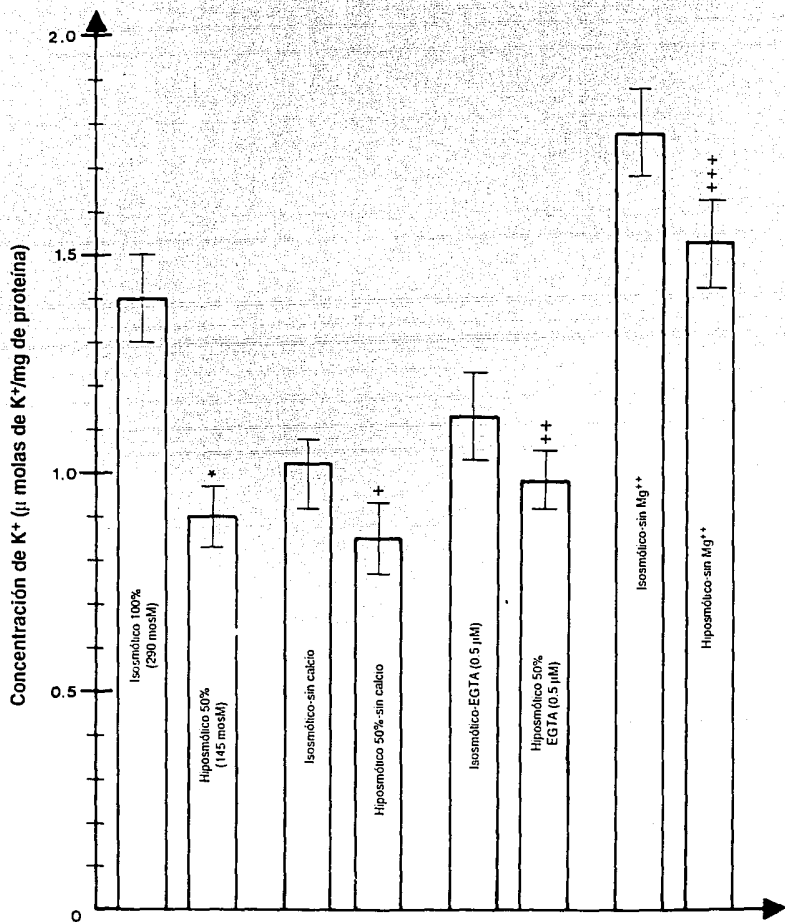
Grafica 8. Efecto del DIDS (200 μ M) sobre la concentración intracelular de potasio después del choque hiposmótico (145 mosM). Los resultados se expresan como promedio \pm ES de 24 a 28 experimentos. Existen diferencias significativas con respecto a los controles (isosmótico con o sin fármaco), * $P < 0,001$ y ** $P < 0,001$ (prueba estadística t de Student).



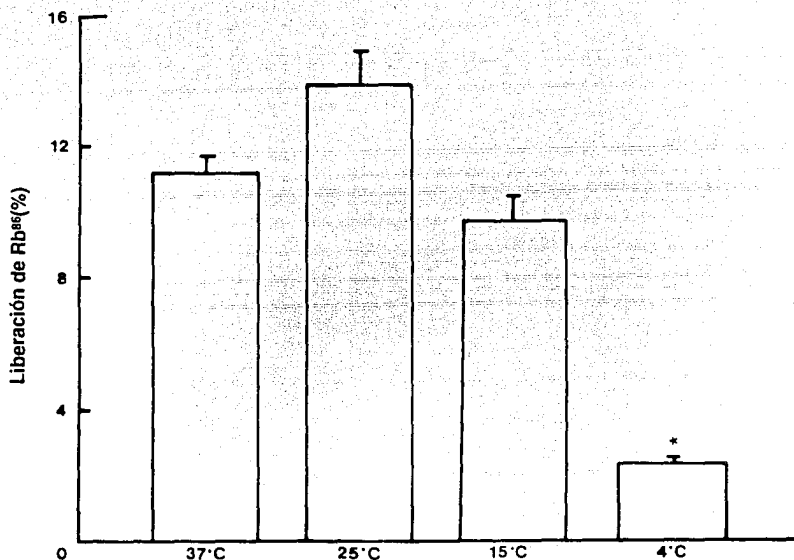
Gráfica 9. Efecto del Dipiridamol (100 μ M) sobre el contenido de potasio en astrocitos bajo condiciones hiposmóticas (145 mosM). Los resultados se expresan como promedios \pm ES de 7 a 8 experimentos. Existen diferencias significativas con respecto a los controles (isosmótico con o sin fármaco). * $P < 0.001$ y ** $P < 0.025$ (prueba estadística t de Student).



Gráfica 10. Efecto de la omisión de calcio y la adición de EGTA en la liberación de Rb⁸⁶ estimulada por un medio hipotónico (145 mosM). Las células fueron perfundidas con un medio isotónico (○) o hipotónico (△) que contenía CaCl₂ con un medio isotónico (●) o hipotónico (▲) sin CaCl₂ más 0.5 mM de EGTA. Los resultados se expresan ± ES de 6 a 8 experimentos (prueba estadística t de Student).



Gráfica 11. Efecto del calcio extracelular en la concentración de potasio intracelular después de un choque hiposmótico (145 mosM). Los resultados se expresan como promedios \pm ES de 10 a 12 experimentos. Existe diferencia significativa con respecto al control (isosmótico). * $P < 0.001$ $n = 12$. No existen diferencias significativas con respecto a su respectivo control (isosmótico sin calcio, isosmótico EGTA 0.5 μ M e isosmótico sin magnesio), + $n=10$; ++ $n=11$ y +++ $n=11$ (prueba estadística t de Student).



Gráfica 12. Efecto de la temperatura en la liberación de Rb⁶⁶ sensible a la osmolaridad (medio hiposmótico con 145 mosM). Los astrocitos fueron perfundidos como se ha descrito en los métodos a excepción de la variación en la temperatura del medio. Los resultados se expresan como promedios \pm ES de 6 a 12 experimentos. Únicamente se observó una diferencia significativa a 4 grados centígrados con respecto al control; * $P < 0.001$ (prueba estadística t de Student).

DISCUSION:

Los datos obtenidos a través de las estrategias experimentales empleadas en el presente trabajo son coherentes entre si, permitiendo cuantificar el proceso desde diferente ángulos. Si bien es cierto que los valores obtenidos no son exactamente los mismos, es muy claro que las tendencias generales si lo son.

Una gran variedad de tipos celulares movilizan cloro y potasio para ajustar los cambios de volumen ocurridos bajo condiciones anisomóticas (Hoffmann y Simonsen, 1989; Sarkadi, y Parker, 1991). Una pregunta que se trató de responder este trabajo fue conocer acerca de la participación del potasio en el mecanismo de regulación del volumen en astrocitos. En astrocitos el potasio parece no desempeñar un papel importante en este sentido, debido a su participación en mantener el potencial transmembranal en las células excitables, el cual demanda un estricto control de su concentración en ambos lados de la membrana. Al parecer la utilización de iones inorgánicos como osmolitos en las células del sistema nervioso sólo ocurre bajo condiciones extremas de anisomolaridad. Los resultados mostrados en este trabajo presentan un fuerte soporte a esta idea, ya que como se observa en la gráfica número 2, únicamente obtenemos una liberación de Rb significativa a valores extremos de hiposmolaridad (50 o 70%); por su parte, no se observó ninguna liberación de Rb en respuesta a reducciones en la osmolaridad del 15 o 30%. Kimelberg y colaboradores (1990) obtuvieron datos

experimentales acordes con los resultados aquí presentados. En contraste con lo antes mencionado, en un gran número de estirpes celulares, que incluyen a las células epiteliales, células ascíticas de Erlich y linfocitos (Grinstein, et al, 1984; Hoffman y Simonsen, 1989; Roy y Sauvé, 1987; Sarkadi y Parker, 1991), pequeños cambios en el volumen celular son suficientes para activar la salida de potasio. Estos hallazgos sugieren fuertemente que la liberación de potasio en astrocitos puede ser un mecanismo exclusivamente activado cuando ocurren grandes cambios en el volumen celular, ya que es fundamental regular estrictamente la concentración de este ión. Por el contrario, en células no excitables el potasio puede ser el principal osmolito participante en los mecanismos correctores del volumen celular.

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que la liberación de potasio provocada por un medio hiposmótico puede ser caracterizada de la siguiente manera: 1) el proceso es sensible a la quinidina (59% de inhibición); 2) se inhibe por bloqueadores de canales de cloro, 13-20% aproximadamente por el 9-AC, 35% por el DIDS, 51% por la furosemida y 62% por el dipiridamol; y 3) en experimentos paralelos realizados en el laboratorio se demostró que al substituir el NaCl y KCl por sus respectivas sales de gluconato se observó una pequeña recuperación del volumen celular (51% de inhibición), sin embargo en presencia de las sales de nitrato no hubo inhibición alguna, por lo cual parece ser que el cotransporte electro neutro K^+/Cl^- no participa para lograr la recuperación del volumen celular.

Además, la salida de Rb bajo condiciones isosmóticas no fue estimulada por el NEM, en contraste, la salida de Rb bajo condiciones hiposmótica fue marcadamente inhibida (resultados no mostrados). (Sánchez-Olea, R., et al, 1993). Con lo anterior se demostró que el mecanismo es dependiente de cloro (51% de inhibición en un medio con gluconato), pero el cloro puede ser reemplazado por nitrato.

Por otra parte los fármacos, bloqueadores de canales de potasio, tetraetilamonio (TEA) y 4-Aminopiridina (4-AP) no afectan la salida de Rb bajo condiciones hiposmóticas, mostrando los siguientes valores: 13.3 ± 1.25 ($n = 4$) y 16.6 ± 2.01 ($n = 4$), respectivamente, los cuales no son significativamente diferentes a la liberación de la condición control (14.9 ± 1.01 , $n = 12$). El TEA y la 4-AP tampoco afectan el proceso de regulación en condiciones hiposmóticas (resultados no mostrados). El bario (5 mM), aumenta marcadamente la liberación espontánea de Rb y no afecta la estimulada por una disminución en la osmolaridad (Sánchez-Olea, R., et al, 1993).

El análisis de estas propiedades es importantes para la elaboración de un modelo que nos permita dilucidar los posibles mecanismos que se activan por un aumento del volumen celular en los astrocitos. Como se revisó en la introducción, esencialmente existen tres mecanismos reportados involucrados en la liberación de potasio como respuesta a condiciones hiposmóticas, de los cuales dos son los que operan en células de vertebrados: 1) Un cotransporte electroneutro K^+/Cl^- , como el que ha sido observado en eritrocitos, algunos tipos de células

epiteliales y en células tubulares del riñón (Hoffman y Simonsen, 1989; Sarkadi y Parker, 1991) y 2) canales volumen-dependientes para K^+ y para Cl^- separados, pero interrelacionados, como se encuentran en linfocitos, células ascíticas de Erlich, varios tipos de células epiteliales, plaquetas, granulocitos, hepatocitos y líneas celulares del osteosarcoma (Grinstein, et al, 1984; Hazama y Okada, 1988; Hoffmann y Simonsen, 1989; Khademazad, et al, 1991; MacLeond y Hamilton, 1991; Sarkadi y Parker, 1991). Estas dos posibilidades deben ser discutidas.

La evidencia en contra de que el cotransporte electroneutro sea el responsable de la liberación del potasio inducida por hinchamiento celular, es la siguiente: 1) No obstante que el proceso parece ser dependiente de cloro, al sustituir este por nitrato no se presenta inhibición alguna. En todos los tipos celulares examinados el cotransportador es rigurosamente específico a la presencia del ión cloruro y es inhibido cuando otro anión, con excepción del Br^- lo reemplaza (Hoffman y Simonsen, 1989; Lauf, 1985c; Sarkadi y Parker, 1991). 2) Otro parámetro importante es la insensibilidad a la bumetamida. La concentración que se usó de este fármaco (250 μM), es mucho mayor que la reportada en la literatura para inhibir este cotransportador. La liberación de Rb , por parte de los astrocitos, no fue afectada. 3) La independencia del mecanismo a la temperatura sugiere que no se trata de un transportador ya que cambios de unos cuantos grados afectaría seriamente la liberación de Rb . 4) La insensibilidad al N-etilmaleimida (NEM), ya que este fármaco no estimuló la liberación de potasio. En

eritrocitos, el cotransportador K^+ / Cl^- activado durante el hinchamiento celular es también estimulado por la NEM en condiciones isosmóticas (Lauf, 1985c), mientras que en nuestro sistema no sólo no provocó una estimulación sino que causó una inhibición sobre la liberación de Rb (Sánchez-Olea, et al. 1993).

5) La sensibilidad al DIDS. En eritrocitos y en astrocitos éste cotransportador no es afectado por compuestos estilbeno sulfonados (Kimelberg y Frangakis, 1985; Lauf, 1985c). La única observación que sugiere la participación de este cotransporte electroneutro es la inhibición por furosemida; sin embargo, es conocido que la furosemida es una droga muy poco específica, ya que además de ser inhibidor de este cotransportador, también es bloqueador de intercambiadores aniónicos y de canales de cloro (Stoddard, et al. 1990).

Por otro lado, la evidencia que involucra la participación de un canal iónico para la liberación del potasio en astrocitos bajo condiciones hiposmóticas es la siguiente: 1) La insensibilidad del proceso a la temperatura. Los canales iónicos aunque protéicos son menos sensibles a la temperatura que los transportadores. 2) La inhibición causada por la quinidina, un bloqueador bien conocido de canales de potasio, es un parámetro muy importante en este sentido. 3) Otra evidencia es la proporcionada por el hecho de la posibilidad de reemplazar el ión cloruro por nitrato como el anión que acompañe al Rb en su liberación y 4) Kimelberg y Kettenmann (1990) han encontrado, recientemente, patrones electrofisiológicos (cambios en el potencial de membrana) en astrocitos en cultivo, cuando se

disminuye la osmolaridad del medio, que sugiere la activación de vías conductivas en la membrana plasmática.

La activación de vías de conductancia que movilicen al potasio para ajustar el volumen celular bajo condiciones hiposmóticas, ha sido mostrada en una gran variedad de estirpes celulares (Hoffmann y Simonsen, 1989; Sarkadi y Parker, 1991). Sin embargo, se han observado marcadas diferencias en la selectividad iónica y en las propiedades de el canal. En la literatura han sido descritos, hasta ahora, tres tipos distintos de canales de potasio asociados con los mecanismos de regulación del volumen celular (RVD y RVI), estos son: 1) Canales catiónicos, no selectivos, calcio-independientes (Sachs, 1991; Sackin, 1989). 2) Canales selectivos al potasio, calcio-dependientes (Christensen, 1987) y 3) canales selectivos para el potasio que se activan con el estiramiento de la membrana de la célula al aumentar su volumen, estos canales son también insensibles al calcio (Pasantes-Morales, et al, 1990). Al no conocerse aún la farmacología específica de cada uno de estos canales, no ha sido posible la identificación, en el presente trabajo, del tipo particular de canal que se activa como respuesta al aumento del volumen celular en los astrocitos; sin embargo el hecho de que el proceso sea, aparentemente, independiente de calcio excluye al canal dependiente de este ión.

La liberación de potasio activada por condiciones hiposmóticas fue inhibida por diversos compuestos bloqueadores de canales de cloro, lo cual sugiere una importante interdependencia entre los dos flujos iónicos. En la mayoría de los tipos

celulares, los flujos de K^+ y Cl^- asociados con el cambio de volumen, parecen ocurrir a través de vías de conductancia separadas (Hoffmann y Simonsen, 1989; Lindstrom, et al 1986; MacLeod y Hamilton 1991; Sarkadi y Parker, 1991). La evidencia disponible no es suficiente para identificar al canal de cloro que presumiblemente está relacionado con la regulación del volumen celular asociado a una conductancia de potasio. En células astrogliales se ha descrito un canal de cloro de gran conductancia, similar a los encontrados en las células musculares, junto con otros canales de pequeña conductancia activados por hiperpolarización (Nowak, et al, 1987). La mayoría de estos canales de cloro parecen ser no funcionales en condiciones de isosmolaridad y es posible que una de estas conductancias se active con el hinchamiento celular. Alternativamente, otra posibilidad para explicar el efecto de los bloqueadores de canales aniónicos sobre la salida de potasio puede ser, que el potasio sea transportado por un canal de cloro con una doble permeabilidad anion-catiónica. Este tipo de canales han sido descritos en neuronas, células musculares, células epiteliales y células glandulares (Franciolini y Petris, 1990). Estas líneas celulares muestran procesos de regulación de volumen; además son inhibidas por 9-AC, DPC y el ácido disulfónico-4-acetamida-4'-isothiocianato-stilbano (SITS), fármacos que también inhibieron parcialmente la liberación de potasio. Esta es una posibilidad abierta para ser explorada en astrocitos.

CONCLUSIONES.

1.- La liberación de potasio estimulada por condiciones hiposmóticas es un mecanismo que se activa en condiciones críticas, con reducciones en la osmolaridad mayores del 50%. Estos datos concuerdan con lo esperado, ya que en el cerebro el manejo del potasio es crítico para mantener el potencial electroquímico de las membranas, así como de sus propiedades de excitabilidad. No obstante es importante enfatizar que tal mecanismo ocurre en astrocitos y puede ser expuesto por condiciones experimentales. El esclarecimiento de su importancia relativa en el proceso de control del volumen celular es claro, al entender la multiplicidad de funciones que lleva a cabo esta línea celular dentro de la fisiología del cerebro, que puede traer como consecuencia microcambios osmótico localizados; así como en condiciones patológicas, es un punto abierto para su estudio.

Al parecer, por datos previos obtenidos en el laboratorio, en el tejido nervioso, las moléculas orgánicas son los osmolitos preferentemente utilizados durante los procesos de regulación del volumen celular; en donde la taurina ocupa un lugar preponderante, debido a que es el aminoácido libre con los niveles intracelulares más elevados y a que se moviliza con reducciones pequeñas en la osmolaridad.

2.- Estas observaciones son congruentes con el papel fisiológico de los astrocitos, ya que se ha propuesto que estas células son responsables de mantener valores reducidos en la

concentración extracelular de potasio.

3.- La evidencia experimental obtenida en el presente trabajo nos hace suponer que el mecanismo de salida de potasio bajo condiciones hiposmóticas, en astrocitos de cerebelo de rata en cultivo, no es a través de un cotransportador electroneutro K^+ / Cl^- , sino más bien mediante un canal.

4.- No se logró diferenciar entre los posibles tipos de canales reportados en la literatura, ya que no se conoce aun la farmacología específica para cada uno de éstos. Sin embargo, la independencia que el mecanismo muestra al calcio, elimina la posibilidad de que se trate de un canal de potasio dependiente de calcio. Es necesario, sin embargo, obtener más datos y realizar otros experimentos, para determinar con una mayor precisión la dependencia o independencia del mecanismo al calcio extracelular.

5.- El mecanismo de liberación del potasio es también sensible a los bloqueadores de canales de cloro, específicamente al DIDS y al dipiridamol. Lo que sugiere una interdependencia de los flujos de K^+ y Cl^- asociada con los cambios de volumen celular.

6.- No contamos con suficiente evidencia para conocer la naturaleza de esta interacción; no obstante, existen dos posibilidades: la primera es que se trate de canales separados físicamente pero interdependientes funcionalmente; la segunda es que exista un solo canal anión-catiónico. Esta última posibilidad es sumamente atractiva para futuras investigaciones.

7.- El DIDS, por su parte, inhibe la actividad del intercambiador aniónico por lo que podría considerarse, asimismo,

una posible interacción o acople entre esta proteína y la responsable de la movilización de potasio.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1. Alberts, B., et. al., 1989. Molecular Biology of the Cell. Garland Pub., Inc. NY, USA. p. 276-323.
2. Amende, L.M. y Pierce, S.K., 1980. Free amino acid mediated volume regulation of isolated Noctia ponderosa red blood cells: control by Ca^{2+} and ATP. J. Comp. Physiol. 138:291-298.
3. Bagnasco, S.M., et. al., 1987. Induction of aldose reductase and sorbitol in renal inner medullary cells by elevated extracellular NaCl. Proc. Natl. Acad. Sci. 84:1718-1720.
4. Bagnasco, S.M., et. al., 1988. Osmoregulation by slow changes in aldose reductase and rapid changes in sorbitol flux. Am. J. Physiol 254, C788-792.
5. Balaban, R.S. y Burg, B. 1987. Osmotically active solutes in the renal inner medulla. Kidney Int. 31:562-564.
6. Brancks, W.J., 1986. Histologia Veterinaria Alicada. Ed. manual moderno, México. pp. 3-5.
7. Borgese, F., et. al., 1987. Control of cell volume and ion transport by B-adrenergic catecholamines in erythrocytes of rainbow trout, Salmo gairdneri. J. Physiol. Lond. 382:123-144.
8. Bourne, P.K. y Cossins, A.R., 1984. Sodium and potassium transport in trout (Salmo gairdneri) erythrocytes. J. Physiol. Lond. 347:361-375.
9. Bourke, R.S., et. al., 1993. Swelling and ion uptake in cat cerebrocortical slices: Control by neurotransmitters and ion transport mechanisms. Neurochem. Res. 8:5-24.
10. Cala, P.M., 1980. Volume regulation by Amphiuma red blood cells. The membrane potential and its implications regarding the nature of the ion-flux pathways. J. Gen. Physiol. 76:683-708.
11. Cala, P.M., 1983. Cell volume regulation by Amphiuma red blood cells. The role of Ca^{2+} as a modulator of alkali metal/ H^{+} exchange. J. Gen. Physiol. 82:761-784.
12. Cala, P.M., 1985a. Volume regulation by Amphiuma red blood cells: Characteristics of volume-sensitive K/H and Na/H exchange. Mol. Pysiol. 8:199-214.
13. Cala, P.M., 1985b. Volume regulation by Amphiuma red blood cells: Strategies for identifying alkali metal/ H^{+} transport. Federation Proc. 44:2500-2507.

14. Cala, P.M., et. al., 1986. Volume regulation by Amphiuma red blood cells: Cytosolic free Ca^{2+} and alkali metal-H exchange. *Am. J. Physiol.* 250:C423-C429.
15. Cheung, R.K., et. al., 1982. Volume regulation by human lymphocytes: identification of differences between the two major lymphocytes subpopulations. *J. Clin. Invest.* 70:632-638.
16. Choi, D.W., 1987. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J. Neurosci.* 7:369-379.
17. Christensen, O., 1987. Mediation of cell volume regulation by Ca^{2+} influx through stretch-activated channels. *Nature* 330:66-68.
18. Davis, C.W. y Finn, A.L., 1982. Sodium transport inhibition by amiloride reduces basolateral membrane potassium conductance in tight epithelia. *Science Wash. DC.* 216:525-527.
19. Davis, C.W. y Finn, A.L., 1985. Cell volume regulation in frog urinary bladder. *Federation Proc.* 44:2520-2525.
20. Del Castillo, L.F., 1986. El Fenómeno mágico de la Osmosis. FCE: la ciencia desde México #16. 91pp.
21. Dépêche, J. y Schoffeniels, E. 1975. Changes in electrolytes, urea and free amino acids of Poecilia reticulata embryos following high salinity adaptation of the viviparous female. *Biochim. System. Ecol.* 3:111-118.
22. Dick, D.A., 1970. Water movements in cells. En: Bitar, E.E. (ed) "Membranes and Ion Transport". Bitar, E.E. (ed.). Wiley, vol.3.
23. Dix, J.A., et. al., 1985. Target analysis studies of red cell water and urea transport. *Biochim. Biophys. Acta* 321:243-252.
24. Dunham, P.B. y Ellory, J.C., 1981. Passive potassium transport in low potassium sheep red cells: dependence upon cell volume and chloride. *J. Physiol. Lond.* 318:511-530.
25. Ellory, J.C., et. al., 1985. Volume-sensitive passive potassium fluxes in red cells. En: Transport Processes, Iono and Osmoregulation Current Comparative Approaches, editado por Gilles and Gilles-Baillien. Springer-Verlang, pp. 401-410.
26. Ellory, J.C. y Hall, A.C., 1988. Human red cell volume regulation in hipotonic media. *Comp. Biochem. Physiol. A Comp. Physiol.* 90:533-537.
27. Eveloff, J.L. y Warnock, D.G., 1987. Activation of ion transport systems during cell volume regulation. *Am. J. Physiol.* 252 (renal Fluid Electrolyte Physiol. 21):F1-F10.

28. Fettiplace, R. y Haydon, D.A. 1980. Water permeability of lipid membranes. *Physiol. Rev.* 60:510-550.
29. Fincham, et. al., 1987. Volume-sensitive taurine transport in fish erythrocytes. *J. Membr. Biol.* 96:45-56.
30. Franciolini, F. y Petris, A. 1990. Chloride channels of biological membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1031:247-259.
31. Fugelli, K. y Reiersen, L.O. 1978. Volume regulation in flounder erythrocytes. The effect of osmolarity on taurine influx. En: Barker Jorgensen, C., Skadhauge, E. (eds). " Osmotic and Volume Regulation ". Munksgaard, pp. 418-428.
32. Fugelli, K. y Thorøed, S.M., 1986. Taurine transport associated with cell volume regulation in flounder erythrocytes under anisotonic conditions. *J. Physiol. Lond.* 374:245-261.
33. Garcia, J.J., et. al., 1991. Taurine release associated to volume regulation in rabbit lymphocytes. *J. Cell Biochem.* 45:207-212.
34. Gilles, R. 1977. Effects of osmotic stress on the proteins concentration and pattern of Eriocheir sinensis blood. *Cor.p. Biochem. Physiol.* 56A:109-114.
35. Grinstein, S., et. al., 1982a. Volume-induced increase of anion permeability in human lymphocytes. *J. Gen. Physiol.* 80:801-823.
36. Grinstein, S., et. al., 1982b. Increased anion permeability during volume regulation in human lymphocytes. *Physiol. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 299:509-518.
37. Grinstein, S., et. al., 1984. Response of lymphocytes to anisotonic media: volume-regulating behavior. *Am. J. Physiol.* 246(Cell Physiol. 15):C204-C215.
38. Guggino, W.B., 1985. Relationship between cell volume and transport in early distal tubule of the Amphiuma kidney. *J. Gen. Physiol.* 86:31-58.
39. Hall, A.C. y Ellory, J.C., 1986. Effects of high hydrostatic pressure on " passive " monovalent cation transport in human red cells. *J. Membr. Biol.* 94:1-17.
40. Hazama, A. y Okada, Y., 1988. Sensitivity of volume-regulatory K⁺ and Cl⁻ channels in cultured human epithelial cells. *J. Physiol. Lond.* 402:687-702.
41. Herbert, S.C. y Andreoli, T.E. 1972. Interactions of temperature and ADH on transport processes on cortical collecting tubules. *Am. J. Physiol.* 238:F470-F480.

42. Hoffmann, E.K., 1978. Regulation of cell volume by selective changes in the leak permeabilities of Ehrlich ascites tumor cells. En: Jorgensen, C.B., Skadhauge, E. (eds) "Osmotic and Volume Regulation". Munksgaard, pp. 397-417.
43. Hoffmann, E.K., 1985. Role of separate K⁺ and Cl⁻ channels and of Na⁺/Cl⁻ cotransport in volume regulation in Erlich cells. Federation Proc. 44:2513-2519.
44. Hoffmann, E.K., et. al., 1986. Separate, Ca²⁺-activated, K⁺ and Cl⁻ transport pathways in Ehrlich ascites tumor cells. J. Membr. Biol. 91:227-244.
45. Hoffmann, E.K., 1987. Volume regulation in cultured cells. Curr. Top. Transp. 30:125-180.
46. Hoffmann, E.K., et. al., 1988. Mechanisms in regulation in Erlich ascites tumor cells. Renal Physiol. Biochem. 3-5:221-247.
47. Hoffmann, E.K. y Simonsen, L.O., 1989. Membrane mechanisms in volume and pH regulation in vertebrate cells. Physiol. Rev. 69:315-382.
48. House, C., 1974. Water transport in cells and tissues. Physiol. Soc. Monographs. London: Arnold, No. 24.
49. Jacobsen, J.G. y Smith, L.H., 1968. Biochemistry and physiology of taurine and taurine derivatives. Physiol. Rev. 48:424-511.
50. Khademzad, M., et. al., 1991. Regulation of cell volume by the osteosarcoma cell line UMR-106-01. Am. J. Physiol. 261 (Cell Physiol. 30): C441-447.
51. Kimelberg, H.K. y Frangakis, M.V., 1985. Furosemide and bumetamide-sensitive ion transport and volume control in primary astrocyte cultures from rat brain. Brain Res. 361:125-134.
52. Kimelberg, H.K. y Frangakis, M.V., 1986. Volume regulation in primary astrocyte cultures. Adv. Biosci. 61:177-186.
53. 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.
54. Kimelberg, H.K., et. al., 1990. Swelling induced release of glutamate, aspartate and taurine from astrocyte cultures. J. Neurosci. 10:1583-1591.
55. Kimelberg, H.K. y Norenberg, M.D., 1992. Astrocytes. Sc. Amer. 260(4):44-55.

56. Kirk, et. al., 1987a. Regulatory volume decrease in perfused proximal nephron: evidence for a dumping of cell K^+ . *Am. J. Physiol.* 252 (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 21):F933-F942.

57. Kirk, et. al., 1987b. Cell volume regulation in rabbit proximal straight tubule perfused in vitro. *Am. J. Physiol.* 252 (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 21):F922-F932.

58. Kregnow, F.M., 1981. Osmoregulatory salt transporting mechanisms: control of cell volume in anisotonic media. *Annu. Rev. Physiol.* 43:493-505.

59. Kristensen, L.O. y Folke, M., 1984. Volume-regulatory K^+ efflux during concentrative uptake of alanine in isolated rat hepatocytes. *Biochem. J.* 221:265-268.

60. Kristensen, L.O., 1986. Association between transports of alanine and cations across cell membrane in rat hepatocytes. *Am. J. Physiol.* 251:G575-G584.

61. Kristensen, L.O. y Ussing, H.H., 1985. Epithelial organization. En: *The Kidney: Physiology and Pathophysiology*, editado por Seidlin, D.W. y Giebisch; New York: Raven, p. 173-188.

62. Larson, M. y Spring, K.R., 1987. Volume regulation in epithelia. En: *Cell volume Control: Fundamental and Comparative Aspects in Animal Cells*, editado por Gilles, R., Kleinzeller, A. y Bolia, L. Orlando, FL. Academic, 30:105-123. (Curr. Top. Membr. Transp.).

63. Lau, K.R., et. al., 1984. Cell swelling increases a barium-inhibitable potassium conductance in the basolateral membrane of Necturus small intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:3591-3594.

64. Lauf, P.K., 1982. Evidence for chloride dependent potassium and water transport induced by hyposmotic stress in erythrocytes of the marine teleost, Opsanus tau. *J. Comp. Physiol.* 146:9-16.

65. Lauf, P.K., 1985a. On the relationship between volume and thiol-stimulated K^+ Cl^- fluxes in red cells membranes. *Mol. Physiol.* 8:215-234.

66. Lauf, P.K., 1985b. Passive K^+ - Cl^- fluxes in low $-K^+$ sheep erythrocytes: modulation by A23187 and divalent cations. *Am. J. Physiol.* 249:C271-C278.

67. Lauf, P.K., 1985c. K^+ : Cl^- Cotransport: sulfhydryls, divalent cations and the mechanism of volume activation in a red cell. *J. Membr. Biol.* 88:1-13.

68. Lehmann, A., 1989. Effect of microdialysis-perfusion with anisosmotic media on extracellular amino acids in the rat hippocampus and skeletal muscle. *J. Neurochem.* 54:525-535.

69. Lindstrom, P., et. al., 1986. Potassium and chloride fluxes are involved in volume regulation in mouse pancreatic islet cells. *Acta Physiol. Scand.* 128:541-546.
70. Lipton, P., 1973. Effects of membrane depolarization on light scattering by cerebral cortical slices. *J. Physiol.* 231:365-383.
71. Livne, A., et. al., 1987. Volume-regulating behavior of human platelets. *J. Cell Physiol.* 131:354-363.
72. Macey, R.I., 1984. Transport of water and urea in red blood cells. *Am. J. Physiol.* 246:C195-C203.
73. Macey, R.I. y Brahm, J., 1989. Osmotic and diffusional water permeability in red cells: methods and interpretations. En: *Water Transport in Biological Membranes*. Vol. II. G. Benga (ed). CRC Press, Florida, pp. 25-39.
74. Macknight, A.D.C. y Leaf, A., 1977. Regulation of cellular volume. *Physiol. Rev.* 57:510-573.
75. Macknight, A.D.C., 1983. Volume regulation in mammalian kidney cells. *Mol. Physiol.* 4:17-31.
76. Macknight, A.D.C. y Leaf, A., 1985. Cellular responses to extracellular osmolality. En: *The Kidney Physiology and Pathophysiology*, editado por Seldin, D.W., Giebisch, G. New York: Raven, pp. 117-132.
77. Macknight, A.D.C., 1985. Cellular responses to extracellular osmolality. En: *The Kidney Physiology and Pathophysiology*. Editado por Seldin, D.W., Giebisch, G. New York: Raven, pp. 117-132.
78. 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 (Gastrointest. Liver Physiol. 23): G405-415.
79. Madelian, V., et. al., 1985. Beta-receptor-stimulated and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-mediated taurine release from LRM55 glial cells. *J. Neurosci.* 5:3154-3160.
80. McManus, T.J. y Schmidt, W.F., III. 1978. Ion and co-ion transport in avian red cells. En: *Membrane Transport Processes*. Editado por Hoffmann, E.K. Raven, vol. 1. pp. 79-106.
81. McManus, T.J., et. al., 1985. The duck red cell model of volume-sensitive chloride-dependent cation transport. *Ann. NY Acad. Sci.* 456:183-186.

82.Meyer, M.M. y Verkman, A.S., 1987. Evidence for water channels in proximal tubule cell membranes. J. Membr. Biol. 96:107-119.

83.Mills, J.W. y Skiest, D.J., 1985. Role of cyclic AMP and the cytoskeleton in volume control in MDCK cells. Mol. Physiol. 8:247-262.

84.Moran, J. y Patel, A.J., 1989. Stimulation of the N-methyl-D-aspartate receptor promotor the biochemical differentiation of cerebellar granule neurons and not astrocytes. Brain Res. 486: 15-25.

85.Nakanishi, T., et. al., 1988. Survey of osmolytes in renal cell lines. Am. J. Physiol. 255:C181-C191.

86.Nieminen, M.L., et. al., 1988. Taurine in the osmoregulation of the Battleboro rat. Life Sci. 42:2137-2143.

87.Nowark, L., et. al., 1987. Ionic channels in mouse astrocytes in culture. J. Neurosci. 7:101-109.

88.Olson J. y Holtzman D. 1982. Respiration and cell volume of primary cultured cerebral astrocytes in media of various osmolarities. Brain Res. 246: 273-279.

89.O'Neill, W.C., 1989. Cl-dependent K transport in a pure population of volume-regulating human erythrocytes. Am J. Physiol. 256:C858-C864.

90.Orkand, R.K., et. al., 1984. Light-induced changes in extracellular volume in the retina of the drone, Apis mellifera. Neurosci. Lett. 45:273-278.

91.Pasantes-Morales, H., et. al., 1990. Volume-sensitive release of taurine from cultured astrocytes: properties and mechanisms. Glia 3:427-432.

92.Pasantes-Morales, H., et. al., 1991. Hyposmolarity-sensitive release of taurine and free amino acids from human lymphocytes. Biochem. Pharmacol. 41:303-307.

93.Peña, A., 1986. Las Membranas de la Célula. FCE: la ciencia desde México. No.18. 161pp.

94.Pierce, S.K. y Greenberg, M.J., 1972. The nature of cellular volume regulation in marine bivalves. J. Exp. Biol. 57:681-692.

95.Pierce, S.K., et. al., 1988. A Ca²⁺ influx in response to hyposmotic stress may alter osmolyte permeability by a phenothiazine-sensitive mechanism. Cell Calcium 9:129-140.

96.Pierce, S.K., et. al., 1989. Evidence of calmodulin involvement in cell volume recovery following hypo-osmotic stress. Cell Calcium. 10: 159-169.

97. Rothstein, A. y Mack, E., 1990. Volume-activated K⁺ and Cl⁻ pathways of dissociated epithelial cells (MDCK): role of Ca⁺⁺. Am. J. Physiol. 258:827-834.
98. Roy, G. y Sauve, R., 1987. Effect of anisotonic media on volume, ion and amino-acid content and membrane potential of kidney cells (MDCK) in culture. J. Membr. Biol. 100:83-96.
99. Sackin, H., 1989. A stretch-activated K⁺ channel sensitive to cell volume. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1731-1735.
100. Sachs, F., 1991. Mechanical transduction by membrane ion channels: a mini review. Mol. Cell Biochem. 104:57-60.
101. Saltin, B., et. al., 1987. Redistribution of K⁺ in the human body during muscular exercise; its role to maintain whole body homeostasis. En: Man in Stressful environments thermal and Work Physiology; editado por: Shiraki, K. y Yousef, M.K. Springfield, pp. 247-267.
102. Sánchez-Olea, R., et. al., 1991. Osmolarity-sensitive release of free amino acids from cultured kidney cells (MDCK). J. Membr. Biol. 121:1-9.
103. Sánchez-Olea, R., et. al., 1992. Changes in taurine transport evoked by hyperosmolarity in cultured astrocytes. J. Neurosci. Res. 32:86-92.
104. Sánchez-Olea, R., et. al., 1993. Volume-activated Rb⁸⁶ in astrocytes in culture. Am. J. Physiol. 264: C836-C842.
105. Sarkadi, B., et. al., 1984. Ionic events during the volume response of human peripheral blood lymphocytes to hiposmotic media. I. Distinctions between volume-activated Cl⁻ and K⁺ conductance pathways. J. Gen. Physiol. 83:497-512.
106. Sarkadi, B., et. al., 1985. Cation and anion transport pathway in volume regulatory response of human lymphocytes to hiposmotic media. Am. J. Physiol. 248 (Cell Physiol.):C480-C487.
107. Sarkadi, B. y Parker, J.C., 1991. Activation of ion transport pathways by changes in cell volume. Biochim. Biophys. Acta 1071:407-427.
108. Schultz, S.G., et. al., 1985. Electrophysiological studies of sodium cotransport in epithelia: toward a cellular model. Ann. NY Acad. Sci. 456:127-135.
109. Segel, I.R., 1982. Cálculos de Bioquímica. 2a. ed. Acribia. España, pp. 564.

110. Siebens, A.W., 1985. Cellular volume control. En: The Kidney, Physiology and Pathophysiology. Editado por: Seldin, D.W., Giebisch, G. Raven Press, 1:91-115.
111. Siebens, A.W. y Spring, K. 1989. A novel sorbitol transport mechanism in cultured renal papillary epithelial cells. Am. J. Physiol. 257:F937-F946.
112. Sigurdson, W.J. y Morris, C.E. 1989. Stretch-activated ion channels in growth cones of snail neurons. J. Neurosci. 9:2801-2808.
113. Simmons, N.L., 1984. Epithelial cell volume regulation in hypotonic fluids: studies using a model tissue culture renal epithelial cell system. Q.J. Exp. Physiol. 69:83-95.
114. Smith, L.H. Jr. y Pierce, S.K., 1987. Cell volume regulation by molluscan erythrocytes during hyposmotic stress: Ca²⁺ effects on ionic and organic osmolyte effluxes. Biol. Bull. 172:407-418.
115. Spring, K.R. y Ericson, A.C. 1982. Epithelial cell volume modulation and regulation. J. Membr. Biol. 69:167-176.
116. Stoddard, J.S., et. al., 1990. Furosemide blocks basolateral membrane Cl⁻ permeability in gallbladder epithelium. Am. J. Physiol. 258 (Cell Physiol. 27):C1150-C1158.
117. Suzuki, M., et. al., 1990. [Ca²⁺] rise via G protein during regulatory volume decrease in rabbit proximal tubule cells. Am. J. Physiol. 258:F690-F696.
118. Szász, I.B., et. al., 1986. Volume regulation in human blood cells (Abstract). European Red Cell Club Meeting Viisegrad Hungary.
119. Thurston, J.H., et. al., 1981. Taurine: Possible role in osmotic regulation of the mammalian heart. Science 214:1373-1374.
120. Uhl, J., et. al., 1988. Ion channels activated by osmotic and mechanical stress in membranes of opossum kidney cells. J. Membr. Biol. 104:223-232.
121. Uchida, S., et. al., 1991. Taurine behaves as an osmolyte in Madin-Darby canine kidney cells. Protection by polarized, regulated transport of taurine. J. Clin. Invest. 88:656-662.
122. Watson, P.A., 1990. Direct stimulation of adenylate cyclase by mechanical forces in S49 mouse lymphoma cells during hyposmotic swelling. J. Biol. Chem. 265:6569-6575.
123. Wirthensohn, G.S., 1989. Regulation of organic osmolyte concentration in tubules from rat renal inner medulla. Am. J. Physiol. 256:F128-F135.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

124. Ziyadeh, F.N., et. al., 1992. Hypotonicity and cell volume regulation in shark rectal gland: role of organic osmolytes and F-actin. *Am. J. Physiol.* 262:F468-F479.