

139
2ej.



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

Facultad de Ciencias

**“CARACTERIZACION DEL MECANISMO DE
TRANSPORTE DE AMINOACIDOS DURANTE LA
REGULACION DEL VOLUMEN CELULAR EN
CELULAS NERVIOSAS”**

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el Título de

B I O L O G A

p r e s e n t a

CLAUDIA PEÑA SEGURA

México, D. F.

Marzo de 1994

**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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

CIUDAD UNIVERSITARIA

FACULTAD DE CIENCIAS
División de Estudios
Profesionales

Exp. Núm. 55

M. EN C. JOAQUIN CIFUENTES BLANCO
Jefe de la División de Estudios Profesionales
Universidad Nacional Autónoma de México
P r e s e n t e

Por medio de la presente, nos permitimos informar a Usted, que habiendo revisado el trabajo de tesis que realiz ó la pasante _____

Claudia Peña Segura.

con el título: "Caracterización del mecanismo de transporte de aminoácidos durante la regulación del volumen celular en células nerviosas".

Consideramos que reúne los méritos necesarios para obtener el título de - - -
Biólogo.

Comunicamos lo anterior para los fines a que haya lugar.

A t e n t a m e n t e
México, D. F., a

- | | | | |
|-----|-------------|---------------|---------------------|
| 1.- | Dra. | Herminia | Pasantes-Morales. |
| | grado | Nombre (s) | Apellidos completos |
| 2.- | Dr. | Roberto | Sánchez Olea. |
| | grado | Nombre (s) | Apellidos completos |
| 3.- | Dr. | Julio | Morán Andrade. |
| | grado | Nombre (s) | Apellidos completos |
| 4.- | Sup. M.enC. | Laila | Gutiérrez Kobeh. |
| | grado | Nombre (s) | Apellidos completos |
| 5.- | Sup.M.IBB. | Gisele Olivia | Rosas Solares. |
| | grado | Nombre (s) | Apellidos completos |

J. P. ...
Roberto Sánchez Olea.
[Firma]
Laura Gutiérrez H.
[Firma]

NOTA: El interesado deberá ponerse de acuerdo con el jurado para fijar fecha (día y hora) del examen, para evitar problemas de asistencia. ES IMPOR-
TANTE LA PUNTUALIDAD.

**Esta tesis se realizó en el laboratorio 202-sur del
Departamento de Neurociencias del Instituto de
Fisiología Celular de la UNAM, bajo la Dirección de
la Doctora Herminia Pasantes-Morales.
Y con una beca nacional de la Dirección General de
Apoyo al Personal Académico de la UNAM.**

DEDICATORIAS

A mis queridos padres Gloria y Raul con todo mi amor. Por que gracias a su cariño, apoyo y comprension existo.

Con cariño para mis hermanos Raul, Omar y Rodolfo por estar a mi lado y por que son mi más preciado tesoro.

A mis abuelitos Lorenza y Zenón por ser como son.

A la memoria de mis abuelitos Gabino y Ricarda ya que son una parte muy importante de mi vida y por siempre vivirán en mi corazón.

A mi novio por las interminables horas de amor, apoyo y confianza que me brinda a cada instante de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a la Dra. Herminia Pasantes-Morales su guía continua a lo largo de esta importante etapa de mi formación académica.

A Roberto por el apoyo que me ha brindado para la elaboración de esta tesis y por las horas de trabajo compartidas.

A mis sinodales Laila, Julio y Gisele por la amable actitud de fungir como jurado y por la fructífera crítica que realizaron al borrador.

A mis compañeros de trabajo a quienes aprecio Miguel H, Alejandro, Silvestre, Claudia, Elizabeth, Edith, Marcela, Cesar y Diana.

A todas aquellas personas que contribuyeron de alguna manera en la elaboración de esta tesis.

INDICE.

INTRODUCCION	1
Mecanismos celulares de regulación del volumen	3
El proceso de regulación de volumen en condiciones anisomóticas	3
Moléculas con función como osmolitos	6
Regulación del volumen en el sistema nervioso	9
Mecanismos de movilización de los osmolitos	12
Mecanismos de liberación de los osmolitos orgánicos	14
OBJETIVO GENERAL	18
OBJETIVO ESPECIFICO	18
MATERIALES Y METODOS	19
Cultivos celulares	19
Liberación de osmolitos	20
RESULTADOS	23
Estudios en astrocitos	23
Regulación del volumen	23
Liberación de taurina sensible a volumen	24
Efecto de los inhibidores	26
Estudios en neuronas	35
Regulación del volumen	35
Liberación de taurina. Efecto del DIDS, Niflumico y Dipiridamol	37
DISCUSION	41
BIBLIOGRAFIA	47

INTRODUCCION.

Algunas especies animales tienen la capacidad de adaptarse a cambios en la osmolaridad de su medio (1-3). Existen numerosos ejemplos de este comportamiento en los vertebrados e invertebrados que viven en lagunas salobres. Los componentes celulares de los líquidos circulatorios de estos animales (sangre, linfa y hemolinfa) ajustan su volumen a los cambios de 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 esta propiedad de regulación de volumen estaba restringida a las especies expuestas en forma natural a fluctuaciones externas de osmolaridad y que por tanto requerían de este control para su supervivencia; sin embargo la evidencia experimental reunida en los últimos diez años ha mostrado que prácticamente todas las células de los tejidos de animales terrestres tienen también esta capacidad de regular su volumen (3-4), a pesar de que están siempre expuestas a fluidos de osmolaridad muy controlada a través de los distintos tipos de órganos renales, los cuales se encargan de manejar los flujos de agua y solutos en la dirección necesaria para mantener una condición de isosmolaridad en estos fluidos.

La capacidad de regular el volumen celular en los animales terrestres debe obedecer, entonces, a una necesidad intrínseca relacionada con funciones celulares básicas. Algunas de estas funciones se refieren al transporte de sustancias

nutritivas como azúcares y aminoácidos, las funciones de secreción, los movimientos de organelos celulares, de manera particular el citoesqueleto y por supuesto durante 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 celular, en el sistema nervioso estos cambios microscópicos en el volumen celular pueden estar dados por la generación de los gradientes iónicos que constituyen la base de la función neuronal. Igualmente las características del proceso de secreción de neurotransmisores tales como el transporte de las vesículas sinápticas desde el pericarion hasta la terminal presináptica, el llenado de estas mismas vesículas y finalmente su desplazamiento hasta los sitios activos de la sinapsis, son otros ejemplos de procesos celulares que pueden generar microcambios osmóticos que requieren ser controlados.

Este aspecto tiene también implicaciones interesantes desde el punto de vista patológico. 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) se observa asociado a numerosas neuropatologías, entre las que se encuentran las epilepsias, la isquemia (que se genera durante accidentes vasculares), en los traumatismos craneanos y en la encefalopatía hepática(5). Dada la restricción que impone la caja del cráneo a la expansión del tejido cerebral, el edema que resulta de esta alteración en el volumen celular es en muchos casos, una complicación aún mas grave que la propia patología que le dió origen. Es obvio, entonces, que un

mejor conocimiento de los mecanismos responsables del mantenimiento del 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.

Mecanismos celulares de regulación del volumen.

El conocimiento acerca de los mecanismos responsables de la regulación del volumen a nivel celular se han obtenido principalmente estudiando la respuesta celular ante condiciones anisomóticas, es decir aquellas en las que la osmolaridad del medio externo es mayor que la de la célula (condición hiperosmótica) o menor (condición hiposmótica). La condición en la que la osmolaridad de estos dos compartimientos es la misma se conoce como condición isosmótica.

El proceso de regulación de volumen en condiciones anisomóticas.

La membrana plasmática de las células tanto animales como vegetales es muy permeable al agua, por lo que cuando exista un gradiente 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 y disminuye en soluciones hiperosmóticas. Sin

embargo, la mayoría de las células animales se comporta en esta forma, es decir como osmómetros perfectos, únicamente al inicio de la exposición a soluciones anisomóticas, ya que posteriormente se activan una serie de procesos que permiten la recuperación del volumen inicial a pesar de que persistan dichas condiciones. La regulación del volumen celular que ocurre tanto en condiciones hiposmóticas como hiperosmóticas tiene lugar debido a un cambio, ya sea una disminución o aumento según se requiera, en el contenido de solutos intracelulares osmóticamente activos de tal manera que la presión osmótica interna tiende a alcanzar el mismo valor que la externa, disminuyendo así el gradiente osmótico.

La regulación del volumen celular es un proceso complejo que implica varios eventos básicos. Inicialmente la célula debe ser capaz de detectar los cambios en su volumen. Posteriormente la célula debe reaccionar ante los cambios que detecta en el volumen y se inicia un proceso regulador que modifica el contenido intracelular de solutos en la dirección necesaria para corregir el cambio en el volumen. Finalmente debe recuperar su volumen inicial y desactivar los mecanismos que se estimularon durante el proceso regulador.

La señal del cambio en el volumen celular.

Los sensores encargados de detectar cambios en el volumen celular no se han identificado con certeza, pero podrían ser un tipo de canales como los que se han

descrito recientemente y que se activan o desactivan por simple estiramiento de la membrana plasmática (6-8). Mediante las técnicas llamadas de "patch clamp" es posible medir la actividad de un solo canal en la membrana de una célula. Algunos canales pueden ser activados cuando se produce un estiramiento de la membrana ya sea aplicando una presión externa o cuando se disminuye la osmolaridad del medio. Estos canales se han encontrado en varios tipos celulares que cuentan con la capacidad de regular su volumen. Un cambio en la permeabilidad de estos canales al pasar de un estado preferentemente cerrado a uno abierto podría permitir el acceso de iones u otros factores del exterior al interior de la célula, los cuales a su vez, dispararían los procesos de regulación del volumen. Estos canales podrían ser además las propias vías de movilización de los flujos iónicos correctores.

Otro posible mecanismo celular, capaz de detectar una modificación en el volumen celular, es el cambio en la concentración de algún componente intracelular como el calcio, los iones hidrógeno o los elementos de diversos sistemas de segundos mensajeros. Una variación en la concentración intracelular de estos compuestos podría estar dada en forma pasiva, simplemente por una modificación en su concentración impuesta por la entrada o salida agua de la célula.

Como se mencionó en los párrafos anteriores la mayor parte de las células animales responden a los cambios en volumen del medio externo mediante mecanismos de adaptación que les permiten mantener su volumen relativamente constante a pesar de la persistencia de las condiciones anisomóticas. Este proceso

de adaptación implica mecanismos activos de movimiento de solutos intracelulares osmóticamente activos para movilizar el agua en la dirección necesaria para regular el volumen celular. Así en el caso de las condiciones hiposmóticas las células responden liberando los osmolitos hacia el medio externo y en el caso de condiciones hiperosmóticas el proceso es opuesto, es decir, las células acumulan activamente osmolitos del medio exterior.

En este trabajo se examinará únicamente el proceso de ajuste de volumen celular en condiciones hiposmóticas ya que a este proceso se refiere el trabajo de investigación que se llevó a cabo.

Moléculas que funcionan como osmolitos.

Los solutos osmóticamente activos son aquellos que se encuentran en forma libre en solución en el citoplasma. Los osmolitos generalmente empleados por la célula para la regulación del volumen se pueden dividir en: inorgánicos como los iones potasio, sodio y cloro y orgánicos como urea, aminoácidos, azúcares, polialcoholes y aminas. La contribución relativa de estos dos tipos de osmolitos orgánicos e inorgánicos puede ser distinta en los diferentes tipos de células (1, 9, 10). En general las células de los invertebrados y los vertebrados de especies acuáticas utilizan preferentemente los osmolitos orgánicos, mientras que en las células de los vertebrados terrestres los iones inorgánicos parecen tener un papel más importante (11-13). Una excepción en este sentido puede ser el sistema nervioso

en el cual los iones juegan un papel crítico en la función nerviosa y en la comunicación interneuronal. En estas condiciones resultaría perjudicial para la homeostasis del sistema el utilizar a los iones como osmolitos y es posible que en este tejido los osmolitos orgánicos tengan un papel preponderante.

La participación de compuestos orgánicos pequeños en el proceso de regulación del volumen celular se conoce desde hace mucho tiempo para el caso de las células de los invertebrados (12, 13). Se sabe desde hace tiempo que los mecanismos de adaptación a los cambios a la osmolaridad interna en animales como moluscos o crustáceos, involucran una participación importante de los aminoácidos libres. La urea y la creatinina participan en la adaptación tisular de vertebrados marinos. Recientemente se ha considerado la posibilidad de que estas moléculas participen también de manera importante en la regulación del volumen en células de animales terrestres (10). Esta posibilidad podía preverse sin embargo al examinar el contenido elevado de estos compuestos orgánicos en muchos tejidos animales. En el músculo, por ejemplo, tanto de tipo esquelético como cardíaco se encuentran concentraciones muy altas de aminoácidos libres así como algunas aminas y fosfoaminas (11,14). En los linfocitos la concentración de aminoácidos es también muy alta, de 50 a 60mM y en las células renales, el conjunto de osmolitos orgánicos que incluye tanto aminoácidos como aminas y polialcoholes es superior a 60mM.

Una característica muy interesante de estas moléculas orgánicas relacionadas con

la función de regulación osmótica es que, a diferencia de los iones inorgánicos poseen lo que se llama propiedades osmoprotectoras, es decir, que además de funcionar como osmolitos pueden acumularse en concentraciones muy altas en el compartimiento intracelular sin alterar significativamente la estructura y la función de las macromoléculas citosólicas (11).

En el caso del sistema nervioso, la característica de moléculas osmoprotectoras es importante también en el espacio extracelular, ya que algunos de los compuestos que pueden funcionar como osmolitos, tales como los aminoácidos glutamato, aspartato, glicina y el GABA son capaces de interactuar con receptores localizados en la cara externa de la membrana y a través de esta interacción, pueden modificar la permeabilidad de la membrana a los iones y en consecuencia, alterar el estado de excitabilidad del sistema nervioso.

En este sentido, una de las moléculas osmoprotectoras especialmente interesante es la taurina. La taurina es un aminoácido azufrado, presente en la escala filogenética desde los niveles más sencillos hasta los más complejos. A diferencia de la mayoría de los aminoácidos, la taurina no forma parte de la estructura de las proteínas y no participa en ninguna reacción metabólica en las células o los tejidos en los que se encuentra, con excepción de la conjugación con el ácido cólico para formar una de las sales biliares, el ácido taurocólico (15). No solo esto, si no que no existe siquiera una reacción metabólica que degrade a la propia taurina. En la mayor parte de las especies, excluidas las bacterias, el recambio metabólico de la taurina tiene su vía de salida simplemente a través de la excreción del

aminoácido por vía fecal o urinaria. Sin embargo, la importancia de contar con una poza de taurina intracelular, se pone de manifiesto por el hecho de que existen mecanismos eficientes para la biosíntesis del aminoácido en la mayor parte de las especies animales (15).

Las características que se acaban de describir para la taurina como son su presencia ubicua y su inercia metabólica, hacen de este compuesto un osmolito perfecto. En efecto los niveles de taurina en las células pueden modificarse, y de hecho se modifican, para regular el contenido de agua simplemente por la movilización entre los espacios extra e intracelular, de acuerdo a las necesidades específicas del momento, sin modificar en absoluto el metabolismo celular. No hay ninguna otra molécula de entre todas las que funcionan como osmolitos, de la que pueda decirse otro tanto (16).

Regulación del volumen en el sistema nervioso

Las primeras observaciones acerca de la existencia de mecanismos de regulación del volumen en el sistema nervioso fueron hechas por el grupo de Chan y Fishman (17). Estos autores observaron que al exponer a ratones a condiciones experimentales que cambian las concentraciones séricas de cloruro de sodio, produciendo ya sea hipernatremia o hiponatremia, los niveles de osmolitos en el cerebro cambiaban de acuerdo a las necesidades de movilización de agua en cada caso. En estos experimentos se observó que los niveles de aminoácidos disminuyen

en condiciones de hiponatremia y se acumulan en hipernatremia. Una observación similar ha sido reportada en el caso de la taurina ya que en ratones con hiponatremia, la concentración de este aminoácido disminuye notablemente en el cerebro de estos ratones (18, 19). Los osmolitos inorgánicos, potasio y cloro, también muestran cambios en sus niveles de acuerdo a las condiciones de osmolaridad externa (20).

La movilización de osmolitos orgánicos fué observada más adelante en experimentos de microdiálisis en los que varios grupos de investigadores (21-23) mostraron que en condiciones de hiposmolaridad se movilizan los aminoácidos libres, preferentemente la taurina, del interior de la célula al espacio extracelular. Desde 1985, Kimelberg y cols. (24) observaron que los astrocitos en cultivo poseen la capacidad de regular su volumen cuando son expuestos a condiciones hiposmóticas de la misma forma que lo hacen las células del epitelio renal, los linfocitos, los eritrocitos de los peces y los hepatocitos. El grupo de Pasantes-Morales y cols. (25), confirmó la presencia de este proceso regulador en los astrocitos y demostró recientemente la capacidad de las neuronas granulares del cerebelo para regular su volumen, en forma similar a como lo hacen las células gliales (26). Recientemente se ha iniciado el estudio de los mecanismos que permiten este proceso regulador tanto en astrocitos como en neuronas. Pasantes-Morales y cols (45). encontraron que los astrocitos liberan taurina y otros aminoácidos como respuesta al aumento en volumen y que esta movilización sigue un curso temporal idéntico al del proceso de regulación (27). En estas

preparaciones se observó que la taurina, al igual que ocurre en otras células, es un osmolito importante y su liberación es extremadamente sensible al cambio en el volumen celular inducido por modificaciones en la osmolaridad externa. Como se mencionó debido a la inercia metabólica de la taurina, este aminoácido podría considerarse como el osmolito ideal, ya que puede moverse libremente del compartimento intracelular al extracelular sin afectar en ninguna forma al metabolismo de la célula. Es posible que, la taurina sea el osmolito que más fácilmente se libera en respuesta a cambios pequeños en la osmolaridad. Cuando se compara la salida de la taurina con la de potasio, por ejemplo, en los astrocitos se advierte que la salida de taurina es detectable aún cuando la osmolaridad disminuye sólo 5% y su liberación aumenta proporcionalmente al decremento en la osmolaridad. Al reducir la osmolaridad al 50%, prácticamente toda la poza de taurina presente en las células es liberada para contrarrestar el aumento en el volumen celular (28). La respuesta en el caso del potasio es completamente distinta. La liberación de este osmolito se advierte solamente cuando la osmolaridad disminuye 50% y aún así, sólo el 30% de la poza total de potasio responde al estímulo de hiposmolaridad (28). Estas observaciones indican que en el caso de los astrocitos, la taurina es el osmolito de elección por encima de otros osmolitos orgánicos y del potasio (46). Su papel como osmorregulador en los astrocitos parece ser primordial.

A pesar de que la taurina puede interactuar con algunos receptores postsinápticos en el sistema nervioso, sólo lo hace cuando sus concentraciones en el espacio extracelular son altas. Por otra parte, el efecto de la taurina al interactuar con estos receptores sería el de disminuir la actividad neuronal. En estas condiciones la liberación de un compuesto como la taurina con el propósito de regular la osmolaridad celular, tendría también la propiedad de disminuir la actividad neuronal, que está incrementada en muchas de las patologías que conllevan un aumento en el volumen celular. Así, la taurina tendría entonces un doble efecto benéfico en el tejido nervioso, permitiendo la regulación del volumen celular, y contrarrestando la hiperexcitabilidad.

Mecanismos de movilización de los osmolitos.

Iones inorgánicos.

En el caso de los iones potasio y cloruro, para la regulación en condiciones hiposmóticas y de sodio y cloruro en condiciones hiperosmóticas, existe gran número de resultados experimentales que han permitido tener una idea bastante clara de los mecanismos involucrados en la movilización de estos iones en respuesta a los cambios en el volumen celular (29 Rev. en 1)

En el caso de la acumulación de iones que tiene lugar en condiciones hiperosmóticas parece bien establecida la participación de cotransportadores electroneutros que movilizan sodio y cloro en forma concertada (1).

En la salida de iones en respuesta a un aumento en el volumen celular parecen estar implicados dos mecanismos distintos. En algunos casos están involucrados cotransportadores electroneutros similares a los mencionados previamente pero que, como en este caso movilizan potasio y cloruro del interior de la célula al medio extracelular (30). En otros casos la salida de los iones tiene lugar a través de la activación de vías electrogénicas separadas para el potasio y el cloro. A pesar de que se trata de canales diferentes para los dos tipos de iones, las conductancias de ambos parecen ser interdependientes.

En general se ha observado que aquellas células en las que la regulación de volumen en respuesta a condiciones hiposmóticas es un proceso lento (horas) utilizan exclusivamente a los cotransportadores electroneutros como mecanismos de movilización intracelular de iones osmóticamente activos. En cambio las células en las cuales el proceso de regulación se lleva a cabo en unos pocos minutos utilizan preferentemente los mecanismos conductivos. La identificación de estos dos tipos de transporte de iones asociados a la regulación del volumen celular ha sido posible llevado a cabo mediante el empleo de herramientas farmacológicas que permiten distinguir entre uno u otro de estos mecanismos. En el caso de los cotransportadores electroneutros se sabe que son sensibles a drogas como la furosemida y la bumetanida por lo que cuando los mecanismos de regulación de volumen celular se inhiben significativamente en presencia de estos fármacos se considera que el mecanismo de regulación está mediado por la función de estos cotransportadores (1). En el caso de las vías electrogénicas se emplean fármacos

que inhiben a los canales iónicos tanto de potasio como de cloruro y dependiendo de su eficacia para modificar el proceso de regulación de volumen se puede evaluar la contribución de estos canales a los procesos de regulación. Los fármacos más comúnmente utilizados para este propósito son para el caso de canales de potasio inhibidores como la quinidina, el bario y el tetraetilamonio y para el caso del cloruro el 4,4'-diisothiocianostilben-2,2' disulfonato, el dipiridamol, el 9 antracén carboxilato y el DPC. Sin embargo, el análisis de las investigaciones en este sentido muestra que los canales de potasio y cloro activados por volumen no corresponden siempre con canales iónicos ya descritos, sino que posiblemente se trate de nuevos tipos de canales cuya caracterización está todavía por hacerse.

Mecanismos de liberación de los osmolitos orgánicos.

A diferencia de la amplia información que se tiene acerca de los mecanismos de movilización de los osmolitos inorgánicos en respuesta al aumento en el volumen celular, los mecanismos responsables de la liberación de los osmoefectores orgánicos apenas se conoce. En el caso de los aminoácidos, dado que existe un transportador que acumula estos compuestos al interior de la célula, una posibilidad sería que estos transportadores funcionaran en sentido opuesto, es decir, sacando al osmolito de la célula y que, a través de este mecanismo tuviera lugar el movimiento osmótico de los aminoácidos. Sin embargo, parece que esto no ocurre así ya que la salida de aminoácidos sensible al volumen es independiente

de sodio y de temperatura, mientras que se sabe que en estas condiciones, el transportador está considerablemente inhibido. En trabajos recientes de Sánchez-Olea y cols. y Schousboe y cols. fué posible demostrar que el movimiento de la taurina en respuesta a condiciones hiposmóticas está en función del gradiente de concentración. En condiciones similares a las fisiológicas, es decir cuando la concentración de taurina intracelular es mucho mayor que la extracelular (30:02) al exponer a las células a condiciones hiposmóticas, el movimiento de taurina tiene lugar en favor del gradiente de concentración, es decir, de dentro hacia afuera y los niveles de taurina endógena disminuyen en más de un 70%. Al ir aumentando la concentración extracelular de taurina a niveles cercanos a los endógenos, no se observa movimiento neto de taurina. Finalmente, cuando el gradiente se invierte, es decir, cuando las concentraciones extracelulares de taurina son mayores que las endógenas, al aumentar el volumen celular por las condiciones hiposmóticas, tiene lugar un movimiento de taurina de nuevo en favor del gradiente de concentración, en este caso de afuera hacia adentro y como resultado, aumentan las concentraciones de taurina endógena. Estos resultados muestran en forma inequívoca que el mecanismo de movilización de taurina en respuesta al incremento en el volumen celular causado por las condiciones hiposmóticas es un proceso difusional, controlado solamente por la dirección del gradiente de concentración. No se trata, pues, de un mecanismo de transporte activo que trabaje en contra del gradiente. Estos resultados indican que puede tratarse de un poro, canal o permeasa sensible al aumento en el volumen celular.

Otro tipo de información en relación con el mecanismo de movilización de taurina es la que se ha obtenido examinando el efecto de fármacos. En trabajos iniciales de Pasantes-Morales et al. y Domínguez et al. en la retina se observó que un estilbensulfonato, el DIDS, tiene un efecto inhibitor sobre la salida de taurina estimulada por altas concentraciones de potasio. Más adelante se pudo comprobar que en este tejido dicha liberación, es, en su mayor parte, consecuencia del aumento en el volumen celular causado por la entrada de potasio a las células y que puede prevenirse si se mantiene el producto potasio y cloro constante. Al evitar el aumento en el volumen celular en estas condiciones, también se previno la salida de taurina. Más adelante, se observó que la liberación de taurina en astrocitos expuestos a condiciones hiposmóticas también se inhibe por DIDS. Este fármaco se ha considerado por mucho tiempo como un inhibidor relativamente específico de intercambiadores aniónicos, por lo que pudiera considerarse la participación de estos intercambiadores en el proceso de movilización de taurina. Recientemente se ha demostrado sin embargo que en muchas preparaciones celulares, el DIDS también inhibe canales de cloro, que funcionan unidireccionalmente, sin que ocurra ningún tipo de intercambio. Por otra parte, también se ha detectado que el intercambiador aniónico puede funcionar en forma unidireccional como un canal de cloro. En estas condiciones, es posible que el efecto inhibitor del DIDS sobre el movimiento de taurina, esté vinculado con un canal de cloro que puede o no formar parte de una molécula más compleja que cumpla también las funciones de un traslocador aniónico.

El intercambiador aniónico del eritrocito, se conoce comúnmente como banda 3 está muy bien caracterizado, es una cadena polipeptídica que atraviesa la membrana celular y catalisa el intercambio de aniones a través de la misma, y está conformado como se muestra en la Fig. 1 por los siguientes elementos:

1. Un sitio de unión al cloro, situado en la región externa de la membrana de la célula
2. Un canal de cloro que cruza la bicapa lipídica
3. Un traslocador de cloro en la región interna de la membrana, que lleva a cabo el intercambio propiamente dicho del cloro por otro anión.

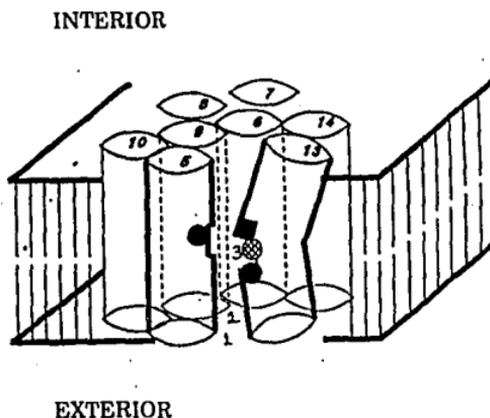


Fig. 1. Intercambiador aniónico del eritrocito.

OBJETIVO GENERAL.

Este trabajo se inserta dentro de un objetivo general que es el de contribuir a caracterizar el mecanismo de movilización de los osmolitos orgánicos durante el proceso de regulación del volumen en los astrocitos y las neuronas en cultivo.

OBJETIVO ESPECIFICO.

El objetivo específico de este trabajo es examinar la hipótesis de que existe un vínculo entre una molécula del tipo del intercambiador aniónico y el transporte de taurina que tiene lugar en respuesta a cambios en el volumen tanto en astrocitos como en neuronas en cultivo.

MATERIALES Y METODOS

Cultivos celulares.

Los experimentos se llevaron a cabo en cultivos primarios de astrocitos y neuronas de cerebelo de rata, siguiendo la técnica descrita por Morán y Patel (43). Para el cultivo tanto de astrocitos como de neuronas se utilizaron ratas Wistar de 8 días, El sembrado se efectuó a una densidad de 700 000 a 1 000 000 de células por mililitro de medio, tanto en cultivos sembrados en cajas de 35 mm como en multipozos. En este trabajo se utilizaron astrocitos de 2 a 4 semanas in vitro (D.I.V), es decir, siempre después de haber alcanzado la confluencia. A las 4 semanas las células todavía son viables y no han sufrido alteraciones de ninguna índole.

En el caso de los cultivos neuronales las cajas se trataron previamente con poli-L-lisina (5µg/ml) y las células se incubaron con citosina arabinosa (10µg) aproximadamente 20 horas después de haber sido sembradas para inhibir la proliferación de células no neuronales. Las neuronas se utilizaron de 3 a 6 días in vitro. El medio de cultivo contiene medio basal Eagle complementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor, glutamina 10mM y 50 U/ml de estreptomicina. Las cajas de cultivo una vez sembradas se incubaron a 37 °C en presencia de CO₂ al 5% saturado con vapor de agua. La composición celular de los cultivos se analizó inmunohistoquímicamente utilizando anticuerpos policlonales contra marcadores específicos de neuronas, astrocitos y fibroblastos como la

enolasa específica de neuronas, la proteína fibrilar ácida (astrocitos) y la Thy-1 (fibroblastos). De acuerdo a estas determinaciones se obtuvieron cultivos astrogiales y neuronales compuestos en un 95-97% de astrocitos y neuronas respectivamente.

LIBERACION DE OSMOLITOS.

Sistema de perfusión.

Para estudiar la liberación de ^3H -taurina las células se perfundieron de acuerdo a la técnica descrita por Drejer et al (43). Los astrocitos y las neuronas se incubaron con $1\mu\text{Ci}$ de ^3H taurina durante 60 minutos en el medio de cultivo y al terminar la incubación, el medio de cultivo se sustituyó por medio Krebs-HEPES isosmótico (300 mOsm) con la siguiente composición: NaCl 135mM, KCl 5mM, CaCl_2 1mM, MgSO_4 1.17mM, HEPES 10mM y Glucosa 5mM. El pH de la solución (7.4) se mantuvo sin variación en las diferentes soluciones y condiciones experimentales, excepto cuando el fármaco requiere de condiciones especiales como se indica posteriormente, después de lavar dos veces los cultivos celulares con 1 ml de medio Krebs normal isosmótico las células fueron perfundidas a una velocidad de 1 ml por minuto utilizando un sistema en el que dos bombas peristálticas actúan sincrónicamente; una de las bombas deposita 1 ml de medio mientras que la segunda retira el medio de las células a la misma velocidad. Para lograr una perfusión homogénea en cada población de células se dispuso sobre éstas un delgado filtro de seda el cual permite la adecuada distribución del medio

sobre la monocapa. Las células se perfundieron con medio Krebs-HEPES isosmótico durante 5 minutos; una vez obtenida una liberación basal, el medio se cambió por un medio hiposmótico reduciendo la osmolaridad un 50% en cada uno de los experimentos, durante 15 minutos. Al final de cada experimento se midió la radiactividad en las muestras colectadas y la del tejido en un contador de centelleo para muestras líquidas. Los resultados se expresaron como porcentaje del total liberado en cada fracción respecto a la radiactividad acumulada por las células durante el tiempo de incubación con la taurina radiactiva, es decir la radiactividad liberada más la remanente en las células al final del experimento.

Sistema de perfusión estática.

Otro sistema que se utilizó fué el de las perfusiones estáticas, en el cual se usaron cajas de 24 pozos. Para estos experimentos se incubaron las células con ^3H taurina radiactiva $1\mu\text{Ci/ml}$ durante 1 hora y se lavaron 2 veces con medio Krebs normal isosmótico, las células se incubaron durante 20 minutos con medio isosmótico más las drogas correspondientes. Para el caso del fenilgloxal y la ciclohexanediona, las condiciones experimentales fueron diferentes, puesto que durante la incubación con los fármacos se realizó a un pH de 8.0; además durante la incubación el medio contenía: ácido bórico 80mM, después de la incubación se lavaron 2 veces con medio Krebs normal isosmótico para tener las condiciones iniciales de pH. Posteriormente se dió la estimulación con medio hiposmótico 50% durante 5 minutos y se inició la colecta. Las células se lisaron de los pozos con 200μ de

NaOH 0.4 N y 300 μ l de agua, finalmente se midió la radiactividad contenida tanto en el medio como en las células mismas con un contador líquido de centelleo y los resultados se expresaron como porcentaje del total de la radiactividad liberada en los 5 minutos de liberación, más la radiactividad remanente en las células utilizadas para cada experimento.

FARMACOS UTILIZADOS.

Los fármacos que se utilizaron para realizar éste trabajo fueron los siguientes:

- 4,4'-diisothiocianostilben-2,2' disulfonato.
- Fenilglioxal.
- Fosfato de piridoxal.
- 1,2-Ciclohexanediona.
- Dipiridamol.
- Dinitrofluorobenceno.
- Acido niflumico.

RESULTADOS.

ESTUDIOS EN ASTROCITOS.

Regulación del volumen.

El volumen de los astrocitos en condiciones isosmóticas es de 1.2 pico litros por célula o expresado de otra forma, 4.5 μ l por miligramo de protefna. Al exponer a las células a un medio con osmolaridad reducida al 50% el volumen celular aumenta notablemente alcanzando valores de aproximadamente 60% sobre el volumen en condiciones isosmóticas. El máximo volumen se alcanza aproximadamente 1 minuto después del estímulo hiposmótico y a partir de ese momento se inicia un proceso activo de regulación durante el cual el volumen celular comienza a disminuir a pesar de que persistan las condiciones hiposmóticas. La regulación no es completa, al menos durante el tiempo en el que se siguieron estas determinaciones que fue de 15 min, pero en este tiempo el volumen celular está solamente 13% por arriba del volumen en condiciones isosmóticas.

El proceso regulador se observa también cuando las células son expuestas a medios con menor osmolaridad (30%) y en estas condiciones, el aumento en el volumen no es mucho mayor que en el descrito en el párrafo anterior, pero la regulación no es tan eficiente, ya que la célula alcanza a recuperar un volumen que es de 19% sobre el volumen inicial en el medio isosmótico. En cambio, cuando

el estímulo hiposmótico es menos intenso, al bajar la osmolaridad sólo un 30%, el aumento en volumen celular es mucho menos pronunciado y la regulación es prácticamente total.

Liberación de taurina sensible al volumen.

El efecto del estímulo hiposmótico sobre la salida de taurina de los astrocitos se muestra en la Fig. 2. Como se describió en la sección de Métodos, las células en el medio de cultivo se incubaron en presencia de taurina ^3H , que se usó como marcador de las pozas endógenas de taurina. Al terminar este período de marcado y después un lavado de 10 min, se midió la salida de taurina, primero en condiciones isosmóticas e inmediatamente después se dió el estímulo hiposmótico. La liberación se siguió a intervalos de un minuto, durante 15 min. En el experimento que se ilustra en esta figura la estimulación se llevó a cabo en un medio hiposmótico al 50%.

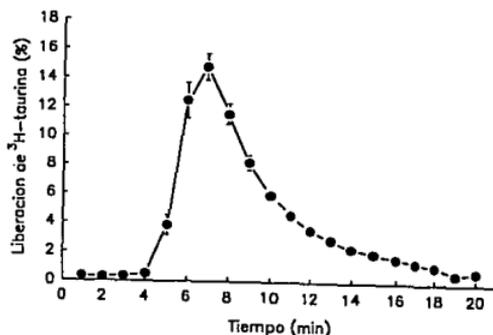


Fig 2. Liberación de ^3H -Taurina estimulada por medio hiposmótico 50% en astrocitos de cerebelo de rata.

La activación de la salida de taurina es prácticamente inmediata y se alcanza el pico de liberación aproximadamente 1 min después de la estimulación. A partir de este momento, se inicia el decremento en el proceso de liberación de taurina y aproximadamente 15 min después, la tasa de liberación es cercana a la basal, aunque en algunas ocasiones no se llega a alcanzar el nivel de salida previo a la estimulación. En el caso de reducir la osmolaridad del medio 50%, la cantidad total de taurina liberada durante estos 15 min es aproximadamente el 60% del total de taurina presente en la célula, si se toma como medida la radioactividad residual al terminar la perfusión.

En trabajos recientes de Pasantes-Morales et al (45). Se ha observado que la taurina es el aminoácido más sensible al cambio en la osmolaridad ya que han realizado trabajos sobre la salida de otros aminoácidos como el D-aspartato, que es un análogo no metabolizable del glutamato, la alanina y la glicina.

Los experimentos descritos en la Fig. 2 se llevaron a cabo en un sistema de superfusión. Sin embargo, es también factible seguir el proceso de liberación de taurina activada por el volumen en un sistema estático, como se describe en la sección de Métodos. En esas condiciones, se mide la salida de taurina radioactiva que tiene lugar en un período de 10 min en medio isosmótico o en medios con distintas condiciones de osmolaridad y en presencia o ausencia de los inhibidores. La mayor parte de los experimentos que se describen a continuación se llevaron a cabo utilizando el sistema estático.

Efecto de los inhibidores del intercambiador aniónico sobre la salida de taurina sensible al volumen.

Como se describió en la introducción, el intercambiador aniónico en los eritrocitos se ha estudiado casi exhaustivamente. Sin embargo, se trata de una molécula muy compleja, con numerosos sitios de interacción con los sustratos de la reacción y en consecuencia, sujeta a una amplia gama de sitios de modulación susceptibles al efecto de los inhibidores. Los inhibidores estudiados en este trabajo se pueden catalogar de acuerdo a los sitios de la molécula con los cuales interactúan, en tres diferentes grupos:

1) Los inhibidores del sitio de unión del cloro.

-DIDS.

-Fosfato de piridoxal.

-Fenilglioxal.

2) Los inhibidores del canal de cloro.

-Dipiridamol.

-Ciclohexanediona.

3) Los compuestos que interfieren con la traslocación.

-Acido niflámico.

-Dinitrofluorobenceno.

El primer paso en el complejo mecanismo del intercambio aniónico es la interacción del anión que va a ser intercambiado, con un sitio específico en la membrana. Existen compuestos que son capaces de bloquear esta interacción del anión con la molécula intercambiadora. Los inhibidores de este tipo que se estudiaron en el presente trabajo son el diestilbensulfonato DIDS, el fenilgloxal y el fosfato de piridoxal. Los dos primeros compuestos mostraron un efecto inhibitor potente sobre la salida de taurina en respuesta al estímulo hiposmótico. El fenilgloxal puede considerarse como un reactivo relativamente inespecífico, ya que su acción consiste en bloquear los residuos de arginina, por lo cual puede interactuar con numerosas proteínas. Normalmente se emplea a concentraciones altas en el orden de mM y tal como se observa en la Fig. 3 tiene una acción inhibitora sobre la salida de taurina que es dependiente de la concentración.

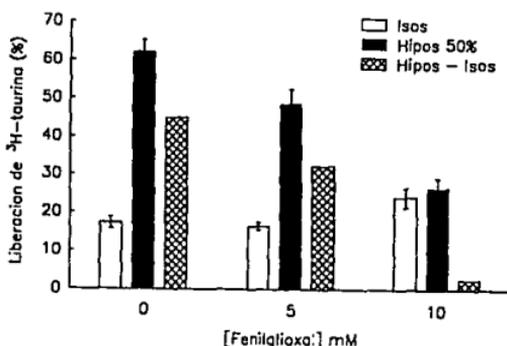


Fig. 3. Efecto del fenilgloxal en la liberación de ^3H -Taurina, estimulada por medio hiposmótico 50% en astrocitos de cerebelo de rata.

En esta figura se observa la salida de taurina en condiciones isosmóticas (barras blancas), la liberación estimulada por el choque hiposmótico (barras negras) y también la salida neta, es decir, la diferencia entre la salida estimulada y la basal (barras cuadrículadas). Como se observa en esta figura, a una concentración de fenilglioxal de 10 mM se alcanza una inhibición prácticamente completa de la salida neta de taurina (estimulada menos basal). A esta concentración se observó también un aumento en la salida basal.

En la figura 4 se muestra el efecto del DIDS con cloro representado por los círculos blancos, examinado en concentraciones crecientes de 50 a 200 μM . Lo que se muestra en esta gráfica es la inhibición por la droga (expresada como porcentaje) de la liberación neta de taurina, es decir, la liberación estimulada por hiposmolaridad menos la liberación en ausencia de la droga tomada como 100% en condiciones isosmóticas. Puede observarse que el DIDS ejerció un efecto inhibitorio dependiente de la concentración. La máxima inhibición que fué de 61% se observó a la concentración de 200 μM . Se observó una inhibición significativa del 45% a concentraciones de 50 μM .

De acuerdo a lo descrito para el intercambiador aniónico en eritrocitos, el DIDS actúa bloqueando el sitio de unión del anión, en este caso el cloro. En ausencia de cloro debería esperarse un mayor acceso del DIDS al sitio de interacción con la molécula y si la salida de taurina estimulada por hiposmolaridad se inhibe por el DIDS, debería también esperarse, que en presencia de mayor concentración

efectiva del inhibidor, el proceso de salida de taurina se viera aún más afectado en estas condiciones. En la figura 4, la línea con puntos negros representa el efecto en la inhibición de taurina en un medio sin cloro lo que se observa, es que en ausencia de cloro, la inhibición causada por el DIDS es mayor en todas las concentraciones usadas, cuando se compara con el efecto observado a las mismas concentraciones pero en presencia de cloro.

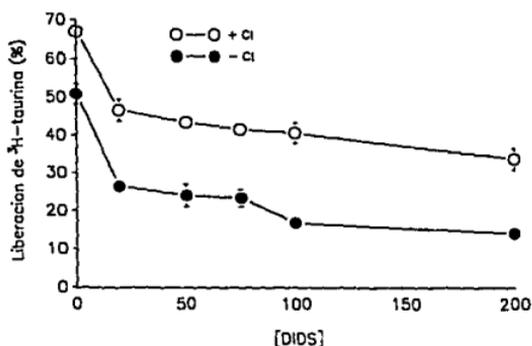


Fig. 4. Efecto del DIDS sobre la liberación ^3H -taurina estimulada por medio hiposmótico 50% en un medio con cloro (círculos negros) y en un medio sin cloro (círculos blancos).

El fosfato de piridoxal es un bloqueador de los grupos e-amino de la lisina. Uno de estos grupos se ha visto que es importante para el funcionamiento del intercambiador y por tanto, se examinó su efecto sobre la salida de taurina. Sin embargo, este compuesto no causó ninguna inhibición sobre la liberación de

taurina. Debe mencionarse, sin embargo, que existieron algunos problemas de tipo metodológico con el empleo de este compuesto, ya que su presencia ocasiona un apagamiento muy pronunciado de la radioactividad, tan importante que queda fuera de los factores de corrección que tienen integrados los contadores de centelleo. A pesar de que se construyeron curvas de corrección, se considera que los resultados no son totalmente confiables.

Inhibidores del canal aniónico. Una vez que el anión se ha unido a la membrana, va a cruzar parte de la bicapa lipídica a través de un canal con propiedades de selectividad para los aniones. Los inhibidores del canal de cloro que fueron estudiados en este trabajo son la ciclohexanediona y el dipiridamol. La primera es una sustancia con acción relativamente inespecífica, ya que actúa bloqueando a los residuos de arginina de las proteínas. Como en el caso del fenilglicoxal, la ciclohexanediona tiene que ser usada en concentraciones muy elevadas y además, su acción requiere una condición de pH alto, cercano a 8.0 y la presencia de borato 80 mM. Sin embargo, ya que la reacción de la ciclohexanediona con los residuos de arginina lleva a formar una unión covalente, fue posible hacer reaccionar primero al compuesto inhibidor en las condiciones óptimas para su acción y luego restaurar las condiciones normales de pH y ausencia de borato en las que se llevó a cabo la estimulación con el medio hiposmótico que activa la salida de la taurina. Por supuesto, en todos los casos se

llevaron a cabo determinaciones paralelas en condiciones control, que nos permiten asegurar que el tratamiento con el borato y el pH alcalino no afectaron ni la viabilidad celular, ni el proceso de liberación de taurina en si mismo. La Fig. 5 muestra el efecto inhibitor muy claro de la ciclohexanediona sobre la liberación de taurina.

La inhibición fué dependiente de la concentración y afectó únicamente al componente de liberación estimulada sin modificar la salida basal.

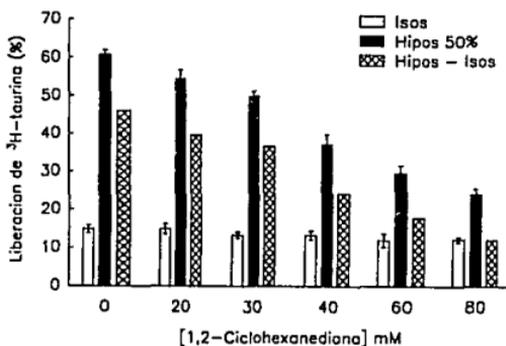


Fig. 5. Efecto de la ciclohexanediona sobre la liberación de ^3H -taurina estimulada por medio hiposmotico 50% en astrocitos de cerebelo de rata. En las barras cuadriculadas se observa la salida neta de taurina.

El dipiridamol mostró un efecto inhibitor muy potente sobre la salida de taurina sensible al volumen. La acción de este compuesto se puede detectar en concentraciones μM olares. Como se describió para otros inhibidores, la Fig. 6 muestra que el dipiridamol tuvo un efecto inhibitor máximo sobre la salida neta de taurina de más del 60% a una concentración de 150 μM . A una concentración más baja, de 100 μM , se observó una inhibición significativa del 35%. Este compuesto no puede ser usado a concentraciones más altas ya que en esas condiciones afecta la viabilidad de los astrocitos.

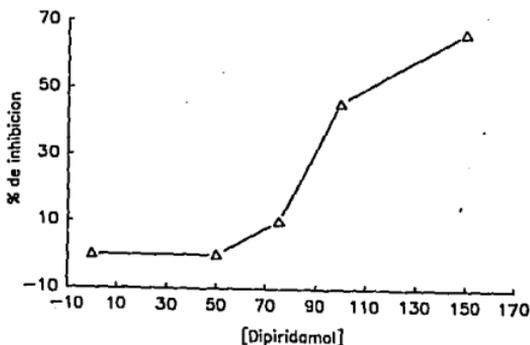


Fig. 6. Porcentaje de inhibición del dipiridamol sobre la salida de ^3H -taurina estimulada por un medio hiposmótico 50% en astrocitos de cerebelo de rata.

Inhibidores del sitio de traslocación.

Se investigó el efecto de dos inhibidores del sitio de traslocación: el dinitrofluorobenceno y el ácido niflúmico. El primero de ellos, como algunos otros de los estudiados en el presente trabajo, es un inhibidor relativamente inespecífico, ya que actúa bloqueando residuos de lisinas. Este compuesto tiene un efecto muy potente, ya que a concentraciones de $250 \mu\text{M}$ inhibe por completo la salida neta de taurina y a concentraciones de $50 \mu\text{M}$ se observa ya una inhibición significativa (Fig. 7).

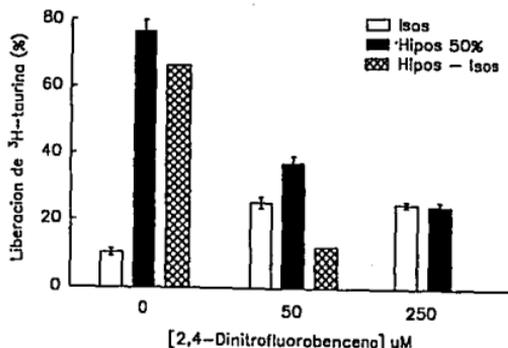


Fig. 7. Efecto del 2,4-Dinitrofluorobenceno en la liberación de ^3H -taurina estimulada por medio hiposmótico 50% en astrocitos de cerebelo de rata.

El ácido niflúmico es el inhibidor más conocido del intercambiador aniónico en eritrocitos. En concordancia con los resultados anteriores, este compuesto también mostró un efecto inhibitor importante sobre la salida de taurina estimulada por hiposmolaridad. La Fig. 8 muestra que el ácido niflúmico ejerció su máximo efecto inhibitor a una concentración de 600 μM disminuyendo la salida neta de taurina en un 83%. El efecto del ácido niflúmico fue dependiente de la concentración ya que a 50 μM se observa ya una inhibición significativa del 21%, la cual se va haciendo mas notable a concentraciones crecientes hasta alcanzar el máximo mencionado de 83% a una concentración de 600 μM (Fig. 8).

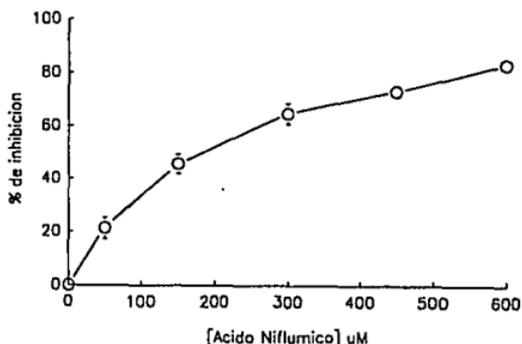


Fig. 8. Efecto inhibitor del ácido niflúmico sobre la liberación de ^3H -taurina estimulada por un medio hiposmótico 50% en astrocitos de cerebelo de rata.

ESTUDIOS EN NEURONAS.

Regulación del volumen.

Las neuronas granulares del cerebelo en cultivo constituyen un modelo interesante para estudiar muchas de las propiedades funcionales de las neuronas. Se pueden tener cultivos prácticamente puros de estas células en los que pueden seguirse las manifestaciones de la diferenciación celular en un tiempo corto.

Las células granulares también presentan el fenómeno de regulación del volumen en respuesta a exposición a condiciones hiposmóticas. Las neuronas en estas condiciones muestran una respuesta similar a la de los astrocitos, es decir, primero incrementan su volumen, aproximadamente un 70% sobre el valor del volumen celular en condiciones isosmóticas y luego se inicia el proceso regulador, durante el cual el volumen disminuye en forma activa, a pesar de que persisten las condiciones hiposmóticas. El estudio de la regulación del volumen en las neuronas se hizo en células inmaduras, de 1-3 días después de sembradas en el cultivo, ya que el proceso de formación de neuritas tiene lugar en los días subsiguientes y en estas condiciones, los fragmentos de las propias neuritas constituyen una población muy heterogénea de partículas, las cuales dificultan la medida del volumen con el procedimiento empleado.

Empleando células jóvenes, por el contrario, se pueden obtener excelentes preparaciones para la medida del volumen celular.

La regulación del volumen en las neuronas no es tan eficiente como en los astrocitos, ya que después de la exposición a un medio con la osmolaridad reducida un 50%, las células sólo recuperan un volumen que está aproximadamente 30% arriba del volumen original.

Como en el caso de los astrocitos, las neuronas deben regular su volumen mediante la movilización de osmolitos orgánicos y tal vez también de los iones inorgánicos K y Cl. En el caso de los aminoácidos se ha reportado previamente que la taurina puede tener un papel importante en el mecanismo regulador, ya que es el aminoácido que se libera en mayor cantidad y con mayor prontitud en respuesta al estímulo hiposmótico. Otros aminoácidos que también participan en el proceso son los ácidos aspártico y glutámico, la glutamina y la alanina.

Como en el caso de los astrocitos se ha demostrado que la liberación de taurina asociada al incremento en el volumen celular tiene lugar a través de un proceso difusional, que no involucra al transportador que permite la acumulación de la taurina en las células.

Liberación de Taurina. Efecto del DIDS, niflumico y dipiridamol.

En la Fig. 9 se muestra un experimento representativo de la liberación de taurina de las células granulares, inicialmente en condiciones isomóticas y en respuesta a la exposición de medios hiposmóticos 50%, 70% y 85%. Los experimentos para medir la salida de taurina de las células granulares se pueden llevar a cabo también en el sistema estático que ya describimos para los astrocitos.

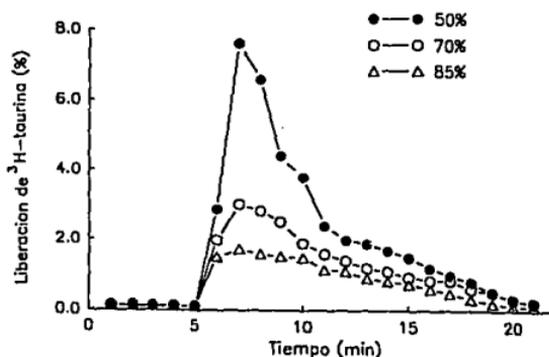


Fig. 9. Liberación de ^3H -taurina estimulada por medio hiposmótico 50%, 70% y 85% en células granulares de cerebelo de rata.

Los inhibidores que fueron estudiados en el caso de las neuronas son el DIDS, el dipiridamol y el ácido niflúmico.

La Fig. 13 muestra que el efecto inhibitor del DIDS sobre la liberación de taurina fué dependiente de la concentración, observándose una inhibición del 21% a una concentración del inhibidor de 20 μ M. La inhibición fue creciente al incrementarse las concentraciones hasta alcanzar un máximo de 59% de inhibición a la concentración de 200 μ M.

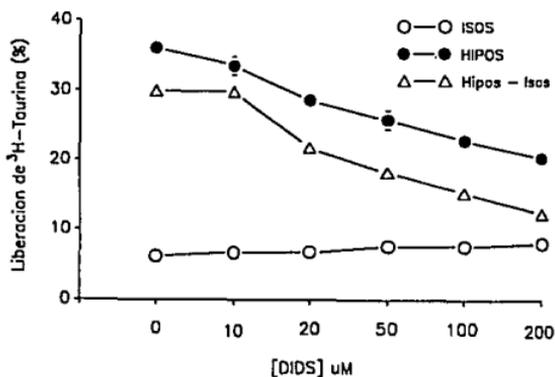


Fig. 10. Efecto del DIDS sobre la liberación de 3 H-taurina estimulada por medio hiposmótico 50% en células granulares de cerebelo de rata.

El dipiridamol mostró un efecto inhibitor semejante en potencia al del DIDS, ya que a una concentración de 150 μM , se observó una inhibición del 48%. Como se mencionó previamente, esta es la máxima concentración que puede ser utilizada sin causar daño celular. El dipiridamol a una concentración de 75 μM , inhibió la liberación de taurina un 26% (Fig. 11).

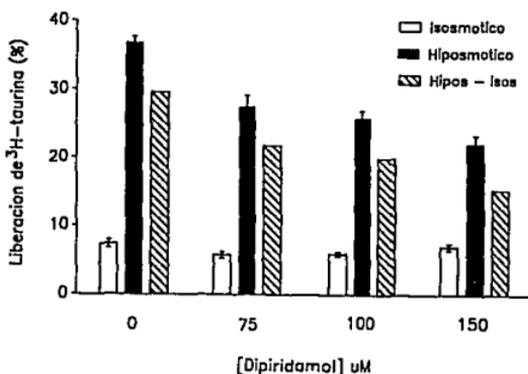


Fig. 11. Efecto del dipiridamol en la liberación de ^3H -taurina estimulada por medio hiposmótico 50% en células granulares de cerebello de rata.

El ácido niflúmico fué el inhibidor más potente, observándose una disminución de casi 75% en la liberación de taurina en presencia de ácido niflúmico 600 μM . Como en los casos anteriores, la inhibición del ácido niflúmico fue dependiente de la concentración observándose una reducción significativa, del 35% en presencia del compuesto a una concentración de 150 μM . Al disminuir la concentración a 50 μM , la inhibición fue ya de solamente el 8% (fig. 12).

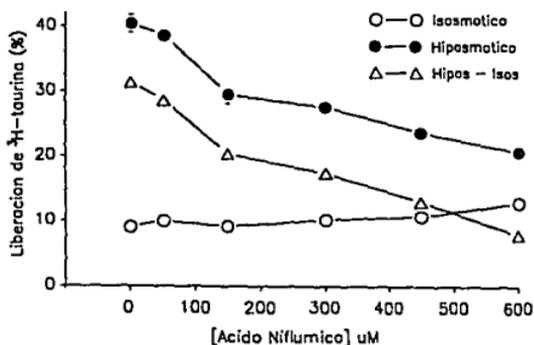


Fig. 12. Efecto del ácido niflúmico en la liberación de ^3H -taurina estimulada por medio hiposmótico 50% en células granulares de cerebelo de rata.

DISCUSION.

Los astrocitos y las neuronas responden a un estímulo hiposmótico con una liberación importante y rápida de las pozas intracelulares de taurina.

El mecanismo de activación del proceso de liberación de taurina podría ser, por una parte, el aumento en el volumen celular y por otra, la dilución de algún componente intracelular aún no identificado, que pudiera actuar a su vez como activador de los flujos de salida del aminoácido. El proceso de inactivación tampoco se conoce. Sin embargo, se puede concluir que no se debe a que la poza de taurina se agote, ya que al hacer el mismo tipo de experimentos pero aplicando como estímulo una solución con 30% de hiposmolaridad, la salida de taurina es menor que en el caso de las soluciones hiposmóticas al 50% y la poza de taurina que queda en la célula es muy grande, lo cual no impide que de todas formas tenga lugar el proceso de inactivación de la salida del aminoácido.

En relación con la caracterización del mecanismo de liberación de taurina, los resultados de este trabajo muestran que todos aquellos compuestos que inhiben al intercambiador aniónico en la membrana de los eritrocitos tienen un efecto inhibitorio muy importante en la salida de taurina sensible a osmolaridad, lo cual sugiere una vinculación de este proceso con una molécula similar en las células nerviosas.

Además del eritrocito, otros tejidos y células muestran también actividad de intercambio aniónico y en muchos casos se ha detectado por métodos inmunocitoquímicos la presencia de una molécula responsable de esta reacción, con características similares a las del eritrocito, aunque el intercambiador aniónico en tejidos no eritroides es menor, con un peso molecular de alrededor de 60 k daltones, en comparación con los 130 k daltones de la molécula en los eritrocitos. Recientemente se ha descrito la presencia de un intercambiador aniónico en el cerebro de rata, que también muestra propiedades similares al que se encuentra en células no eritroides, es decir, es una molécula más pequeña de cerca de 60 k daltones.

La distribución celular del intercambiador aniónico en el cerebro, muestra su presencia tanto en neuronas como en células gliales. Estas observaciones sugieren que el intercambiador aniónico puede estar presente también en las neuronas y astrocitos en cultivo, aunque no se dispone en este momento de la evidencia precisa en este sentido.

Existen al menos dos posibilidades para explicar la participación del intercambiador aniónico en el proceso de liberación de osmolitos. Una posibilidad es que participe en forma directa en el proceso de movilización de los osmolitos, es decir, que el intercambiador sea propiamente la vía de permeabilidad de los osmolitos de tipo aniónico y los aminoácidos, incluyendo la taurina. Se ha descrito que bajo ciertas condiciones, el canal de cloro del intercambiador puede funcionar como un canal unidireccional de cloro. Por otra parte, recientemente se ha

demostrado que los aminoácidos neutros, en particular la taurina, pueden permear a través de canales de cloro. Asimismo, en apoyo a esta posibilidad, está el hecho de que el intercambiador aniónico es permeable a moléculas como el para-amino benzensulfonato, que es una molécula con características de zwitterion, muy similar a la taurina y aún mayor que el aminoácido.

El efecto inhibitor de algunos de los compuestos investigados en este trabajo, en particular el DIDS y el dipiridamol, explicaría entonces a nivel de una simple inhibición del canal de cloro. Se sabe que estos dos compuestos muestran un efecto inhibitor sobre canales de cloro en muy diversas preparaciones celulares. Se han descrito distintas clases de canales de cloro, clasificados por su dependencia a distintos activadores: a) Activados por AMP cíclico, b) activados por calcio y c) sensibles al potencial de membrana (47). Sin embargo, se han realizado investigaciones con el fin de examinar si el canal de cloro sensible a volumen, corresponde con alguno de estos canales de cloro y los resultados señalan que se trata de un canal distinto que no corresponde a ninguno de los mencionados previamente.

El caso del niflúmico no se ajusta de manera simple a esta hipótesis, ya que hasta la fecha no se ha descrito que tenga una acción como inhibitor del cloro. Sin embargo, tampoco hay evidencia en contra en este sentido, por lo cual sería necesario examinar el efecto de este compuesto directamente sobre la actividad de canales de cloro.

En este sentido puede también plantearse que el movimiento de taurina ocurre a través de un mecanismo distinto por completo al que transporta cloro, pero que es igualmente sensible a los inhibidores del canal de cloro del intercambiador. Así mismo puede considerarse que el mecanismo de transporte de taurina es el mismo que el que moviliza cloro y que es inhibido por DIDS.

Finalmente, es posible que la movilización de taurina ocurra a través de un mecanismo distinto al del cloro, pero que sea dependiente de éste, es decir, se plantea la posibilidad de que los inhibidores como el DIDS y el dipiridamol inhiban específica y primariamente al transportador de cloro y como consecuencia de la dependencia del movimiento de taurina por el del cloro, su transporte se vería indirectamente afectado por el DIDS.

En particular, en este trabajo se plantea la hipótesis de que el intercambiador aniónico pueda transmitir una señal desde el citoesqueleto hasta los canales a través de los cuales se movilizan los osmolitos. La relación entre el intercambiador aniónico y el citoesqueleto se conoce bien. Esta vinculación tiene lugar a través de las llamadas proteínas del esqueleto de la membrana. De éstas la más abundante es la llamada espectrina la cual generalmente está adherida a una proteína integral de la membrana. La más común de estas proteínas es la anquirina. La espectrina establece un puente de comunicación entre proteínas de la membrana y componentes del citoesqueleto, generalmente los filamentos de actina; estos componentes del esqueleto de la membrana se han estudiado muy bien en

eritrocitos, pero se han encontrado también en otras células como son las células del epitelio renal MDCK. en los microtubos en cultivo, en las plaquetas y en los nódulos de Ranvier. Las proteínas del esqueleto de membrana en muchos casos conectan el citoesqueleto con componentes funcionales de la membrana como el intercambiador aniónico en el caso del eritrocito, los receptores a la acetilcolina en el caso del músculo, la ATPasa sodio-potasio en las células MDCK y canales de sodio dependientes de voltaje en los axones.

En relación con los resultados del presente trabajo es posible que estas proteínas del esqueleto de la membrana representen la conexión entre un sensor intracelular o una señal citosólica intracelular que podría ser incluso la propia distensión de los filamentos de actina del citoesqueleto y los canales o mecanismos de transporte de la taurina en la membrana.

Las observaciones de este trabajo acerca de la inhibición de la salida de taurina por fármacos que interactúan con el intercambiador aniónico podrían ser interpretadas entonces como un efecto sobre una región de interfase entre el canal propiamente dicho y las proteínas del esqueleto de membrana.

En las células nerviosas, particularmente en las neuronas, se han encontrado proteínas similares a las del esqueleto de membrana del eritrocito. La proteína conocida como fodrina es el equivalente a la espectrina del eritrocito. Una proteína de anclaje, la anquirina similar en propiedades y función a la del eritrocito, se ha

encontrado también en las neuronas. En los astrocitos estos componentes del esqueleto de membrana se conocen menos bien que en las neuronas, pero los estudios preliminares señalan que los componentes parecen ser semejantes en los dos tipos de células nerviosas. Los resultados de este trabajo pueden representar el fundamento para un estudio detallado sobre la participación directa de estos componentes membranales en activación de los flujos de osmolitos.

CONCLUSIONES.

-Todos aquellos compuestos que inhiben al intercambiador aniónico en la membrana del eritrocito, tienen un efecto inhibitor muy importante en la salida de taurina sensible a osmolaridad. Por lo tanto, existe la posibilidad de que participe directa o indirectamente en la liberación de osmolitos.

-También es posible que la vía de movilización de los osmolitos sea un canal de cloro sensible a volumen, puesto que el DIDS, el dipiridamol y el ácido niflúmico, además de inhibir al intercambiador aniónico, bloquean canales de cloro sensibles a volumen.

-Como el fenilgloxal y la ciclohexanediona bloquean residuos de argininas seguramente se trata de una protefna.

-Es posible que la vía de movilización de osmolitos sea generalizada, por que los inhibidores tienen un efecto similar, tanto en astrocitos como en neuronas.

BIBLIOGRAFIA.

1. Hoffmann, E. K. 1989. Mechanism in volume and pH regulation in vertebrate cells. *Amer. J. Physiol.* 69:315-383.
2. Vancey, P. H; Clark, M. E; Hand, S.C; Bowlus, R. D; Somero. 1982. Living with water stress: evolution of osmoyte systems. *Science.* 217: 1214-1222.
3. Gilles, R. 1988. Comparative aspects of cell osmoregulation and volume control. *Renal Physiol. Biochem.* 3-5:277-288.
4. Hoffmann, E. K. and Simonsen, L. O. 1989. Membrane mechanisms in volume and pH regulation in vertebrate cells. *Physiol. Rev.* 69:315-382.
5. Kimelberg, K. H; Goderie, S. K; Higman, S; Pang, S; Cole, R; Parsons, D.F. 1990. Volume changes of astrocytes *in vitro* as a model for pathological astrocytic swelling. In: Levi, G. (ed) Differentiation and functions of glial cells. *Neurology and Neurobiology.* 55:335-348.
6. Christensen, O. 1987. Mediation of cell volume regulation by Ca^{++} influx through stretch-activated channels. *Nature Lond.* 330:66-68.

7. Islas, L; Pasantes-Morales, H. 1993. Characterization of stretch-activated ion channels in cultured astrocyts. *Glia*. 8:87-96.
8. Ubl, J; Murer, H; and Kolb, H. 1988. Ion channels activated by osmotic and mechanical stress in membranes of Opossum Kidney cells. *J. Membrane Biol.* 104: 223-232.
9. Thurson, J. H; Hahuart, R.E; Dirgo, J.A. 1980. Taurine: a role in osmotic regulation of mammalian brain and and possible clinical significance. *Life Sci.* 26: 1561-1568.
10. Law, R, and Burg, M. B. 1991. The role of organic osmolytes in the regulation of mammalian cell volume. *Adv. Comp. Environ. Physiol.* 9:189-225.
11. Morán, A. J, Pierce, S. K. 1984. The mechanism of crustaceam salinity tolerance: cell volume regulation by K^+ and glycine fluxes. *Mar. Biol.* 81:4146.
12. Pierce, S. K. 1982. Invertebrate cell volume control mechanisms: a coordinated use of intracellular aminoacid and inorganic ions as osmotic solute. *Biol Bull.* 163: 405-419.

13. Prior, D. J; Pierce, S. K. 1981. Adaptation and tolerance of vertebrate nervous systems to osmotic stress. *J. Exp. Zool.* 215:237-245.
14. Welty, J. D; Mc Broom, M. J; Appelt, A. W; Peterson , M. B; Read, W. O. 1976. Effect of taurine on heart and brain electrocyte in balances. In: Huxtable, R; Barbeau, A. (ed) *Taurine*. Raven, New York. 155-163.
15. Jacobsen, J. G. and Smith, L. H. 1968. Biochemistry and Physiology of taurine and taurine derivates. *Physiol Rev.* 48:424-511.
16. Pasantes-Morales, and Martín del Río, R. 1990. Taurine and mechanisms of cell volume regulation. In *taurine functional Neurochemistry, physiology, and Cardiology.* (ed) Pasantes-Morales, H; and Martín del Río, R. Wiley - Liss, New York. 317-328.
17. Chan, P. H. and Fishman R. A. 1990. Elevation of rat brain amino acids, ammonia and indigenic osmoles induced by hiperosmolarity. *Brain Res.* 161: 293-301.
18. Thurson, J. H; Hauhart, R. E. Dirco, J.A. 1980. Taurine : A role in osmotic regulation of mammalian brain and possible clinical significance. *Life. Sci.* 26: 1561-1568.

19. Verbalis, J. G. and Gullans, S. R. 1991. Hyponatremia causes large sustained reductions in brain content of multiple organic osmolytes in rats. *Brain Res.* 567:274-282.
20. Cerr, H; De Pasquale, M; Patlak, C; Pullen, R. 1987. Regulation of brain water and electrolytes during acute hyperosmolarity in rats. *Am. J. Physiol.* 253:f522-f529.
21. Solís, J; Herrans, A; Herreras, O; Lerma, O. and Martin del Rio 1988. Does taurine act as an osmoregulatory substance in rat brain? *Neurosci. Lett.* 91: 53-58.
22. Law, R.O. and Burg, M. B. The role of organic osmolytes in the regulation of mammalian cell volume. In *Advances in Comparative and Environmental Physiology.* (ed) Gilles, R. et al. Springer Verlag. 9:189-225.
23. Wade, J; Olson, J; Samson, F; Nelson, S; Paedernik, A. 1988. Possible role of taurine in osmoregulation within the brain. *J. Neurochem.* 45:335-344.
24. Kimelberg, H. K; Frangakis. 1985. Furosemide and bumetanide sensitive ion transport and volume control in primary astrocytes culture from rat brain. *Brain Res.* 361:125-134.

25. Pasantes-Morales, H. and Schousboe, A. 1988. Volume regulation astrocytes: A role for taurine as an osmoeffector. *J. Neurosci. Res.* 20:505-509.
27. Lehman, A; Hansson, E. 1987. Aminoacid content in astroglial primary cultures from different brain regions runin cultivation. *Neurochem Res.* 12: 797-800.
28. Schousboe, A and Pasantes-Morales. 1989. Potassium-stimulated Release of ³H-taurine from cultured GABA energic and Glutamatergic Neurons. *J. Neurosci.* 53:1309-1315.
29. Lauf, P. K. 1989. On the relationship between volume and thiol stimulated k⁺ Cl⁻ fluxes in red cell membranes. *Mol Physiol.* 8:215-234.
30. Cala, C. P. 1990. Principles of cell volume regulation ion flux pathways and the roles of anions. In chlorides channels and charriers in Nerve, Muscle and Glial cells. (Ed) Alvarez, F. J; Leefmans and John, M. Russel. Plenum Press. 67-83.

31. Schousboe, A; Sánchez-Olea, R; Morán, A. J. and Pasantes-Morales, H. 1991. Hypomolarity induced taurine release in cerebellar granule cells is associated with diffusion and not with high affinity transport. *J. Neurosci. Res.* 30:661-665.
32. Sánchez-Olea, R; Morán, A. J. and Pasantes-Morales, H. 1991. Hypomolarity activated fluxes of taurine in astrocytes are mediated by diffusion. *Neurosci. Lett.* 130: 233-236.
33. Pasantes-Morales, H; Klethy, J; Ledig, M. and Mandel, P. 1972. Free amino acids of chicken and rat retina. *Brain Res.* 41:494-497.
34. Dominguez, L; Montenegro, J. and Pasantes-Morales, H. 1989. A volume dependent, chloride sensitive component of taurine release stimulated by potassium from retina. *J. Neurosci. Res.* 22:356-361.
35. Francilini, F. and Petris, A. 1990. Chloride channels of biological membranes. *Biochem. Biophys. Acta.* 1031: 247-259.
36. Nowak, L; Ascher, P. and Berwald-Netter, Y. 1987. Ionic channels in mouse astrocytes in culture. *J. Neurosci.* 7(1):101-109.

37. Falke, J. J. and Chan, S. I. Molecular mechanisms of band 3 inhibitors. 1986.
1. Transport site inhibitors. *Biochemistry*. 25: 7888-7894.
38. Falke, J. J. and Chan, S. I. 1986. Molecular mechanisms of band 3 inhibitors.
2. Channels blockers. *Biochemistry*. 25:7895-7898.
39. Falke, J. J. and Chan, S. I. 1986. Molecular mechanisms of band 3 inhibitors.
3. Translocations inhibitors. *Biochemistry*. 25: 7899-7906.
40. Pumplim, W. D. 1993. The membrane skeleton. *Cell Biol*. 3:113-117.
41. Kay, M. M. B; Huges, J; Zagon, I. and Lin, F. Brain membrane protein band
3 performs the same functions as erythrocyte band 3. *Proc. Natl. Acad. Sci*.
88: 2778-2782.
42. Banderali, U. and Roy, G. 1992. Anion channels for amino acids in MDCK
cells. *Am. J. Physiol*. 32:C1200-1207.
43. Morán, J y Patel, A, J. Stimulation of the N-methyl-D-aspartate receptor
promotes the biochemical differentiation of cerebellar granule neurons and
not astrocytes. *Brain. Res*. 486:15-25, 1989.

44. Drejer, J; Honore, T y Shousboe, A. 1987. Excitatory amino acid induced release of GABA from cultured mouse cerebral cortex interneurons. *J. Neurosci.* 7:2910-2923.
45. Pasantes-Morales, H; Alavez, S; Sanchez-Olea, R; Moran, J. 1993. Contribution of organic and Inorganic Osmolytes to Volume Regulation in Rat Brain Cells in Culture. *Neurochemical Research.* 18:445-452.
46. Sachin, H. 1989. A stretch-activated K^+ channel sensitive to cell volume. *Proc Natl. Acad. Sci.* 86:1731-1735.
47. Chan, H, Ch; Goldstein, J; Nelson, D. 1992. Alternative pathway for chloride conductance activation in normal and cystic airway epithelial cells. *Am. J. Physiol.* 262:C1273-1283.