

00346 2ej. 4



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

"La contribución de los flujos de  $K^+$  en la eficiencia de la regulación del volumen en astrocitos."

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS (BIOLOGIA CELULAR)

P R E S E N T A

Biol. Edith González Guevara.

DIRECTORA DE TESIS: Dra. Herminia Pasantes

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

1998 210874



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **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.

Recordar las cosas que se han ido es,  
en definitiva, una manera de retener algo de ellas  
y eso, quizá, rescata un poco la alegría pasada,  
cuando la felicidad era plena, total. Sin embargo,  
ese recuerdo de la felicidad que se fue encierra en sí,  
la misma, indestructible, tristeza.

Pablo Neruda.

A mis padres,  
con cariño y gratitud.

Este trabajo se llevó a cabo bajo la dirección de la Dra. Herminia Pasantes-Morales, a quien agradezco el interés que demostró durante el desarrollo de esta tesis y por la formación académica y profesional que me brindó durante mi estancia en su laboratorio.

## Indice

Resumen.....	I
Introducción.....	1
Mecanismos de control del volumen celular.....	2
Decremento regulador del volumen.....	5
Sensores y señales que participan en el DRV.....	7
Canales de $\text{Cl}^-$ y canales de $\text{K}^+$ que pueden estar participando en el DRV	
Canales de $\text{Cl}^-$ .....	8
Canales de $\text{K}^+$ involucrados en el DRV.....	10
Antecedentes directos y objetivos del trabajo.....	13
Materiales y métodos	
Soluciones y reactivos.....	16
Cultivos celulares.....	17
Regulación del volumen.....	18
Liberación de $\text{Rb}^{86}$ .....	19
Contenido intracelular de calcio en astrocitos en cultivo.....	20
Resultados y discusión	
Regulación de volumen en astrocitos.....	21
Efecto de la sustitución del NaCl en el medio por osmolitos orgánicos.....	24
Posibles mecanismos responsables de los efectos de remoción del NaCl.....	44
Referencias.....	50

## RESUMEN

La regulación del volumen celular en los astrocitos expuestos a condiciones hiposmóticas tiene lugar por la movilización de osmolitos intracelulares principalmente los iones  $K^+$  y  $Cl^-$  y moléculas orgánicas como aminoácidos, azúcares y aminos. El antecedente directo de este trabajo fue un estudio en el que se observó que la eficiencia en la regulación del volumen se acelera por el mio-inositol y el manitol. Para conocer las características y los mecanismos a través de los cuales los polialcoholes pueden ejercer esta acción, en este trabajo se investigó el efecto de reemplazar el NaCl por diversas soluciones de electrolitos y no electrolitos. Los resultados de este estudio mostraron que mientras que la recuperación del volumen celular a los 3 min en soluciones con NaCl, es de 31%, en las soluciones en las cuales el NaCl es sustituido por polialcoholes y azúcares es como sigue: mio-inositol 82%, sorbitol 55%, manitol 37%, galactosa 86%, lactosa 90%, sacarosa 87% y rafinosa 94%. Una aceleración de esta magnitud no ocurre al sustituir el NaCl por cloruros de litio, colina y N-metil-D-glucosamina, ya que en estos casos la recuperación del volumen es del 40%, 43% y 44% respectivamente. La variedad de compuestos que fueron eficientes para acelerar el volumen sugiere que sus acciones se deban más bien a la eliminación del NaCl que a un efecto particular de alguno de ellos.

En este trabajo se demostró que el efecto de los osmolitos orgánicos se debe a una aceleración en la salida del  $K^+$  activada por hinchamiento, que es la que determina la velocidad del proceso regulador del volumen. El mecanismo a través del cual los osmolitos orgánicos afectan los flujos de  $K^+$  activados por volumen puede deberse a una o varias de las siguientes acciones: 1. Un efecto de la remoción del sodio sobre las cargas de superficie de la membrana celular, que podría afectar la eficiencia del canal de  $K^+$  activado por el hinchamiento 2. Un efecto de la disminución de la fuerza iónica 3. Un aumento en la fuerza impulsora de los flujos de  $Cl^-$  debida a la modificación del gradiente de este ión, el cual podría consecuentemente movilizar en forma pasiva al  $K^+$  4. Un aumento en la concentración citosólica del  $Ca^{2+}$  que activara a los canales de  $K^+$  5. Un efecto modulador (inhibidor) del  $Na^+$  sobre los flujos de  $K^+$ , que sería removido cuando el NaCl se reemplaza por otros osmolitos. Los resultados del presente trabajo sugieren que los 3 últimos mecanismos parecen contribuir al incremento de los flujos de  $K^+$  y consecuentemente al proceso de la regulación del volumen en los astrocitos en cultivo.

## Abstract

Cultured cerebellar astrocytes exposed to 50% hyposmotic solutions, first swell and then activate volume regulatory decrease (RVD) by extrusion of  $K^+$ ,  $Cl^-$  and organic osmolytes. Cell volume recovery is 30% and 70% after 3 and 15 min, respectively. Replacing NaCl in the hyposmotic medium by sugars and polyalcohols markedly accelerated RVD which was completed (100%) after 3-5 min. An 95% increase of  $K^+$  efflux (measured as  $^{86}Rb$ ) and a faster onset of the release was also observed which is likely responsible for RVD acceleration. These effects appear due to NaCl removal rather than to specific actions of the organic molecules. Possible mechanisms for these actions here examined were: 1. an effect of  $Na^+$  removal on the surface charge screening, 2. an effect of decreased ion strength, 3. an increase in the  $Cl^-$  exit driving force, passively carrying  $K^+$ , 4. a cytosolic  $Ca^{2+}$  increase affecting  $K^+$  fluxes and 5. the modulation by  $Na^+$  of the  $K^+$  fluxes. Results showed that the last three mechanisms may contribute to increase  $K^+$  efflux and consequently accelerate RVD.



## Introducción

El mantenimiento del volumen celular constante es necesario para preservar la concentración de moléculas que funcionan como señales en la fisiología celular y en la comunicación intercelular. El control del volumen se requiere en situaciones no sólo en respuesta aguda a una emergencia sino como una parte de la fisiología normal. Es evidente que existen numerosas situaciones que generan microgradientes osmóticos, locales y transitorios, que deben ajustarse. Este es el caso, por ejemplo, de los procesos de acumulación de nutrimentos y la eliminación de metabolitos de desecho, o durante los procesos de secreción, en los que hay cambios importantes en el volumen de las vesículas y cisternas asociadas a la función secretora, o en las vesículas del retículo endoplásmico, en particular, esto sucede en tejidos como el músculo en los que el movimiento de calcio para la contracción genera cambios muy importantes, transitorios pero continuos, en el volumen del retículo sarcoplásmico (Wong et al, 1986). Durante el movimiento celular, tanto en los organismos unicelulares como en el interior de las células en los multicelulares, la redistribución de los componentes citoplásmicos asociada a esta función, conlleva a cambios locales en la concentración de solutos. En el tejido nervioso existen también situaciones constantes asociadas a la función particular de los elementos neuronales y gliales, tales como los gradientes iónicos generados durante la función neuronal, o la liberación y recaptura de los neurotransmisores y neuromoduladores en los que se originan gradientes de concentración

de solutos osmóticamente activos. Se ha considerado también la posibilidad de que el volumen celular sea un elemento del sistema de señales que determinan la proliferación celular, lo que tiene sentido si se considera que precisamente el volumen es una constante característica de la célula adulta.

#### *Mecanismos de Control del Volumen Celular*

Los mecanismos responsables de la regulación del volumen en las células animales se han estudiado sobre todo en respuesta a los cambios de volumen que ocurren cuando las células se exponen a medios anisomóticos (Macknight et al, 1988; Macknight et al, 1994; Hallows et al, 1994). En un principio se consideró que esta característica de adaptación al cambiar la osmolaridad del medio externo era exclusiva solo de las células de aquellas especies que están naturalmente expuestas a fluctuaciones osmóticas en el medio ambiente. Sin embargo, hay cada vez más evidencia de que la capacidad de reaccionar ante cambios de volumen provocados por medios anisomóticos es una propiedad general de las células animales, sin importar el que durante toda su vida se encuentren rodeadas de medios de osmolaridad estrictamente regulada, como es el caso de los animales terrestres, en los que los órganos renales se encargan de mantener la osmolaridad de los medios extracelulares dentro de límites esencialmente constantes.

La membrana de las células animales es, en general permeable al agua, por lo que siempre que exista una diferencia en la concentración de solutos entre el interior de la célula y el medio

extracelular, se generará un flujo de agua en la dirección necesaria para corregir el gradiente osmótico. Las células de las especies animales que están naturalmente expuestas a cambios en la osmolaridad del medio externo tienen la capacidad de corregir los cambios en el volumen que suceden como consecuencia de esta situación. Así, cuando disminuye la osmolaridad del medio externo, las células inicialmente incrementan su volumen pero inmediatamente después de este cambio se desencadena un proceso activo de regulación, durante el cual se movilizan solutos osmóticamente activos del interior de las células hacia el exterior, seguidos de los flujos de agua dirigidos osmóticamente, corrigiendo en esa forma el cambio en el volumen causado por la influencia del medio externo. A este proceso regulador se le conoce como decremento regulador del volumen (DRV) (Hoffman y Simonsen, 1989). En el caso opuesto, es decir, cuando la concentración de solutos en el medio externo es mayor que el contenido intracelular, el volumen decrece como consecuencia de la pérdida de agua asociada con el mantenimiento del equilibrio osmótico. En esta situación, la célula responde incrementando el transporte de solutos extracelulares, igualmente seguidos de flujos de agua, con lo que se tiende a restaurar el volumen celular. A este proceso se le llama incremento regulador del volumen (IRV).

Este ajuste en el volumen se obtiene mediante la movilización de moléculas osmóticamente sensibles, que se movilizan en la dirección necesaria para equilibrar el interior de la célula con el medio extracelular, de acuerdo al nuevo gradiente osmótico impuesto.

Estos solutos, llamados genéricamente osmolitos, son los iones  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$  y un cierto número de moléculas orgánicas, principalmente aminoácidos, polialcoholes, aminos orgánicas y azúcares (Chamberlin y Strange, 1989; Hoffman y Simonsen, 1989; Yancey, 1994). Las moléculas que participan y los mecanismos de movilización de los osmolitos difieren si se trata de un ajuste en el volumen de las células expuestas a medios hiperosmóticos o a medios hiposmóticos. El curso temporal del ajuste en el volumen también es distinto. En el IRV, que ocurre cuando las células se exponen a un medio hiperosmótico, inicialmente el volumen celular disminuye por la salida del agua necesaria para alcanzar el nuevo equilibrio osmótico. El mecanismo de recuperación del volumen celular original requiere por lo tanto, la entrada de solutos osmóticamente activos, que determinen un nuevo gradiente osmótico. El agua que se desplaza junto con estos osmolitos tiende a restablecer el volumen original de la célula. Los iones que participan en el IRV son los que se encuentran en mayor concentración en el medio externo a la célula, es decir, el  $\text{Na}^+$  y el  $\text{Cl}^-$  (Cala, 1983). En cuanto a los osmolitos orgánicos, se ha demostrado la participación de los aminoácidos que circulan en el plasma, aún a concentraciones pequeñas, entre los cuales los más importantes son la taurina, la glicina, la alanina la glutamina y el ácido glutámico (Chan et al, 1979). El inositol y el sorbitol, del grupo de los polialcoholes, también contribuyen al ajuste del volumen durante el IRV (Tratchmann et al , 1991; Strange et al , 1991). En general, los osmolitos involucrados en el IRV se movilizan a través de transportadores dependientes de

energía. En el caso de los iones, se ha descrito la participación de cotransportadores electroneutros,  $K^+/Na^+/Cl^-$  y para los aminoácidos y los polialcoholes a los transportadores que utilizan la energía del gradiente de sodio (Hoffman et al, 1983; Parker et al, 1990; Sarkadi y Parker, 1991). Los cotransportadores de los iones se inhiben en forma específica por compuestos como la bumetanida y la furosemida. En particular, la primera es una herramienta farmacológica eficaz para estudiar la contribución de estos transportadores a los mecanismos de regulación del volumen. En el caso de los osmolitos que se mueven en favor de un gradiente de sodio, es posible estimar su contribución examinando el efecto de bloqueadores de la energía metabólica, así como en condiciones en las que se invierte el gradiente de sodio, eliminando en esta forma la fuerza electromotriz que permite la entrada de los osmolitos (Know et al, 1995). Todos estos transportadores aunque son eficientes, tienen, en general, poca capacidad, por lo que el restablecimiento del volumen celular en estas condiciones es un proceso que requiere varias horas.

La mayor parte de las células animales presentan los mecanismos de IRV y también en general, el proceso se lleva a cabo a través de los mismos mecanismos.

*Decremento regulador del volumen (DRV)*. El presente trabajo se refiere a este mecanismo de ajuste del volumen, por lo que sus características serán examinadas con más detalle.

Cuando las células animales se exponen a un medio hiposmótico,

inicialmente se comportan como un osmómetro perfecto, siguiendo la relación de Van't Hoff, incrementando su volumen en proporción con el decremento en la osmolaridad del medio, pero inmediatamente inician mecanismos activos de recuperación del volumen. Estos mecanismos implican la expulsión de solutos intracelulares junto con agua osmótica. Los solutos que participan en forma más importante en este proceso son los iones  $K^+$  y  $Cl^-$  (Eveloff et al, 1987; Sakardi et al, 1991; Hoffman y Simonsen, 1989), que son los que se encuentran en concentraciones altas en el medio intracelular, así como solutos orgánicos entre los cuales los aminoácidos juegan un papel preponderante (Law et al, 1991; Pasantes-Morales et al, 1993); pero también participan polialcoholes, metilaminas, urea y azúcares (González et al, 1995; Pasantes-Morales et al, 1994a; Pasantes-Morales et al, 1994b) . La capacidad de regular el volumen en estas condiciones se ha encontrado en la mayoría de las células animales, con muy pocas excepciones. Los mecanismos de expulsión de  $K^+$  y  $Cl^-$  que se activan por el incremento en el volumen celular pueden ser distintos en los diversos tipos celulares. En general los más frecuentemente observados son, por una parte los cotransportadores electroneutros  $K^+/Cl^-$  o la activación acoplada de los intercambiadores  $K^+/H^+$  y  $H^+/HCO_3$  aunque el mecanismo más generalizado para este propósito es la activación de vías electrogénicas constituidas por canales iónicos presentes en la membrana celular. El mecanismo utilizado por las células para expulsar los iones  $Cl^-$  y  $K^+$ , determina el curso temporal de la regulación del volumen. Cuando se encuentra

involucrado el sistema de cotransporte  $K^+/Cl^-$  el proceso es muy lento ya que se requiere de 1 a 2 horas para recuperar el volumen celular. Cuando la regulación está mediada por los intercambiadores, la regulación del volumen es más rápida, de 15 a 30 minutos, mientras que cuando el mecanismo conlleva la activación de canales separados de  $K^+$  y  $Cl^-$  la regulación de volumen tarda generalmente menos de 15 minutos.

En cuanto a los osmolitos orgánicos, se ha demostrado que, al menos para el caso de los aminoácidos, su expulsión tiene lugar a través de vías difusionales, por lo que la dirección de su movimiento depende del gradiente de concentración. Se ha postulado, con base principalmente en estudios farmacológicos y electrofisiológicos, que los aminoácidos podrían movilizarse en respuesta a el incremento del volumen celular a través de un canal que moviliza los aniones (Pasantes-Morales, 1996). Uno de estos canales aniónicos en particular, el fosfolema tiene la característica de que presenta una mayor conductancia por la taurina que por el  $Cl^-$  (Moorman et al, 1995).

#### *Sensores y señales que participan en el DRV.*

Los mecanismos moleculares responsables de la activación de la expulsión de los osmolitos por medio de la cual tiene lugar el DRV no están bien identificados. Se piensa que el proceso requiere el reconocimiento del cambio en volumen por un sensor, que pudiera o no ser el mismo sistema que activa las vías de expulsión de los osmolitos. Entre los candidatos considerados a actuar como señales

de transducción entre cambio en volumen celular y la salida de los osmolitos están: el citoesqueleto, un cambio en los niveles citosólicos de calcio, un cambio en la fuerza iónica y la participación de los sistemas de segundos mensajeros. Mientras que las vías de transporte de los osmolitos no difieren mucho en los distintos tipos celulares la participación de los segundos mensajeros parece presentar mayor variabilidad ya que se pueden encontrar células en las cuales el citoesqueleto y/o el calcio parecen tener un papel clave en el DRV mientras que en otras el fenómeno parece ser totalmente independiente de estas señales (Mills et al, 1994; Foskett et al, 1985; Sánchez-Olea et al, 1995). Los nucleótidos cíclicos como segundos mensajeros parecen participar de manera no relevante en la activación de las vías responsables del DRV, se ha descrito que la presencia de ATP, es necesaria para la activación de los canales aniónicos a través de los cuales se moviliza tanto el  $\text{Cl}^-$  como posiblemente los aminoácidos que funcionan como osmolitos.

*Canales de  $\text{Cl}^-$  y canales de  $\text{K}^+$  que pueden estar participando en el DRV.*

*Canales de  $\text{Cl}^-$ .*

La especie molecular responsable de la conductancia a aniones, y posiblemente a aminoácidos, no se ha identificado hasta la fecha en ningún tipo de célula, a pesar de que, como se mencionó, prácticamente todas las células animales tienen la capacidad de regular su volumen y, en la mayor parte de ellas, este proceso



conlleva la activación de un canal aniónico. No se sabe tampoco si es un solo tipo de canal el que tiene a su cargo la movilización de aniones y osmolitos orgánicos en un tipo celular o si las distintas células presentan diferentes tipos de canales. Es posible también que en un solo tipo celular coexistan varios canales con esta función (Pasantes-Morales et al, 1996).

Existen varias moléculas que transportan  $\text{Cl}^-$  y que pueden representar la vía de movilización del  $\text{Cl}^-$  y los osmolitos orgánicos en las células nerviosas. Entre ellas están las siguientes:

1) canales de  $\text{Cl}^-$ . Hasta el momento se han clonado 6 tipos distintos de canales de  $\text{Cl}^-$  de los cuales, al menos tres se activan por hiposmolaridad.

2) Fosfoleman. Es un canal de  $\text{Cl}^-$  pequeño, que tiene el interés de que su permeabilidad para la taurina es muy alta, más de 60 veces mayor que la de  $\text{Cl}^-$ .

3) Un intercambiador aniónico del tipo de la banda 3 de los eritrocitos. La sensibilidad del proceso de regulación de volumen y de los flujos de  $\text{Cl}^-$  y taurina al DIDS y al ácido niflúmico hace pensar que un intercambiador aniónico actuando como canal de  $\text{Cl}^-$  unidireccional podría estar involucrado en el DRV.

4) Porina. Las porinas son canales grandes, muy inespecíficos a través de los cuales pueden permear tanto iones como moléculas orgánicas. Se ha detectado la presencia de una porina en los astrocitos, que podría funcionar como canal para el transporte de osmolitos.

### *Canales de K<sup>+</sup> involucrados en el DRV.*

En la mayor parte de las células examinadas, la movilización del K<sup>+</sup> asociada a la regulación del volumen subsecuente al hinchamiento tiene lugar a través de una vía electrogénica. Sin embargo, hasta la fecha no se ha identificado la especie molecular involucrada ni se ha hecho un estudio cuidadoso acerca de cuales son las características de las conductancias activadas por el hinchamiento que pudieran corresponder con las propiedades de canales de K<sup>+</sup> ya caracterizados (Sánchez-Olea et al, 1993; Sánchez-Olea et al, 1995; Bender et al, 1994; Vitarella et al, 1994). Los canales de K<sup>+</sup> se han agrupado en las siguientes categorías generales: 1. Canales dependientes de voltaje, que incluyen los rectificadores tardíos y las corrientes A 2. Los canales rectificadores entrantes, en los que se agrupan los canales acoplados a proteínas G 3. Los canales de potasio activados por Ca<sup>2+</sup> 4. Los canales tipo Isk o mink (Rudy, 1988).

Los estudios acerca de las conductancias al K<sup>+</sup> que se modifican por hinchamiento han mostrado una variabilidad muy grande. Se han descrito, por ejemplo que los canales de K<sup>+</sup> sensibles a osmolaridad tienen, en general, una conductancia de aproximadamente 30-40 pS pero también se reportan canales activados por hinchamiento con conductancias de 150-167 pS (Sackin, 1994). Acerca de la influencia del calcio, se han descrito canales de K<sup>+</sup> activados por hinchamiento que son independientes del Ca<sup>2+</sup> extracelular pero también se reportan otros que si son dependientes de este ión (Bender et al, 1994; Sánchez-Olea et al, 1995). Poco se conoce de

la participación del calcio liberado de fuentes endógenas en la activación de estos canales. En relación con los inhibidores de canales de  $K^+$  puede decirse que en general los activados por volumen son poco sensibles a la 4-AP, inactivados por bario a concentraciones en el rango milimolar y modificados sólo por concentraciones muy elevadas de tetraetilamonio; en general, son poco afectados por la caribdotoxina y por otras toxinas similares (Rudy, 1988).

Se han descrito canales rectificadores entrantes activados por hinchamiento en células MDCK mientras que en otros tipos celulares el DRV se vincula con canales de  $K^+$  dependientes de voltaje y también con los del tipo  $I_{SK}$  y  $minK$ . El estudio más concluyente acerca de la participación de un tipo particular de canales de  $K^+$  se hizo en una línea celular de linfocitos que no tienen la capacidad para regular el volumen y no muestran la activación de flujos de  $K^+$ . Cuando estas células son transfectadas con el canal  $Kv1.3$  adquieren la capacidad de regular volumen al mismo tiempo que presentan una conductancia al  $K^+$  activada por el hinchamiento (Sackin, 1994; Sachin, 1989).

Todas estas observaciones indican que no es posible generalizar los resultados obtenidos en un tipo o línea celular a otras células, y sugiere que, las distintas células tienen mecanismos diferentes de regulación del volumen en cuanto se refiere a los flujos de  $K^+$ , o bien que varios tipos de canales de  $K^+$  pueden contribuir al fenómeno regulador en una misma célula. Está posibilidad parece factible, ya que se ha demostrado que aún los flujos de  $K^+$  que se

activan a través de ionóforos como la valinomicina o la gramicidina participan en el DRV, o que la activación de canales de  $K^+$  bloqueables por  $Ca^{2+}$  es capaz de acelerar el proceso regulador (García et al, 1992; Rapoport et al, 1993; Sánchez-Olea et al, 1995). En las células gliales, hasta la fecha se han descrito canales de  $K^+$  rectificadores tardíos y rectificadores entrantes. Estos canales se han asociado con la función de remoción del  $K^+$  extracelular liberado durante la actividad de las neuronas. Esta es una de las funciones más importantes de la glia en el mantenimiento de la homeostasis neuronal. Estos canales parecen estar involucrados en aquellas patologías cerebrales asociadas a un incremento en los niveles de  $K^+$  extracelular como ocurre en las epilepsias. Los canales de  $K^+$  en las células gliales se han involucrado también como señales en los mecanismos de proliferación celular en los astrocitos (Sackin, 1994). En los astrocitos, la fisiología de la homeostasis del  $K^+$  no está completamente estudiada a la fecha. Las observaciones obtenidas por medio de estudios electrofisiológicos realizados durante la década de 1960, mostraron que la membrana plasmática de los astrocitos es permeable al  $K^+$  (Kuffler et al, 1966). Con ello se dió el primer paso para determinar la función de la glia en los procesos de homeostasis del  $K^+$  como resultado de la excitación neuronal. La eficacia con la cual se realiza este proceso depende de los tipos de canales de  $K^+$  presentes, su número, la distribución espacial en la membrana celular y la habilidad de las señales externas para regular su actividad. Los astrocitos en cultivo obtenidos del cerebelo,

expresan de forma natural diversos tipos de canales de  $K^+$  como son los canales de  $K^+$  dependientes de voltaje, los canales de  $K^+$  activados por  $Ca^{++}$ , los activados por ATP, los activados por  $Na^+$ . En los astrocitos, el camino de movilización del  $K^+$  en respuesta al incremento en el volumen celular se conoce muy poco. Los flujos de  $K^+$  se han estudiado utilizando trazadores radioactivos, en particular el  $Rb^{86}$  (Sánchez-Olea et al, 1993).

#### *Antecedentes directos y objetivos del trabajo*

En el estudio previo que constituye el antecedente directo de este trabajo, se investigó la permeabilidad de los distintos osmolitos presumiblemente involucrados en el DRV en los astrocitos, utilizando como protocolo experimental la sustitución del NaCl del medio extracelular por el osmolito examinado. Cuando una molécula es permeable a través de alguna de las vías que se abren por hinchamiento, se moverá en favor de su gradiente de concentración y por lo tanto al elevar sus niveles en el exterior se favorecerá su entrada, con lo cual el DRV se inhibe. En esta forma se pudo demostrar que la vía catiónica es muy selectiva, permitiendo el paso sólo de  $K^+$  ( y el  $Rb^{86}$ ), mientras que la aniónica tiene poca selectividad. Los aminoácidos ácidos y neutros son también permeables. Sin embargo, al reemplazar el NaCl por polialcoholes, con el objeto de conocer su permeabilidad, con este mismo procedimiento, lo que se observó fue una aceleración muy marcada del DRV. Esta observación es muy interesante, ya que desde el punto de vista patológico es importante acelerar el proceso de decremento

del volumen ya que el edema celular afecta negativamente todas las funciones celulares al diluir los componentes citosólicos que son señales importantes tanto en la función celular como en la comunicación intercelular. El edema en las células nerviosas es aún más grave, ya que, por estar comprimido en el cráneo, el cerebro no puede dilatarse libremente. En consecuencia, el edema celular cerebral produce aumento en la presión intracraneal, rompimiento de los vasos, anoxia y muerte neuronal. En casos extremos, el edema celular produce herniación del tejido cerebral a través del *Foramen magnum*, y la presión sobre los núcleos cardíaco y respiratorio del tallo cerebral causando la muerte por paro respiratorio. El edema celular cerebral se presenta en numerosas patologías, incluyendo las epilepsias, la hiponatremia y la encefalopatía hepática, de manera predominante en los traumatismos craneanos y a nivel local, durante la isquemia (MacManus et al, 1994).

Tomando en cuenta los antecedentes arriba descritos sobre la influencia de los flujos de  $K^+$  en la velocidad de la regulación, se consideró examinar la posibilidad de que la sustitución del NaCl por los polialcoholes tuviera una influencia sobre los flujos de  $K^+$ , lo que a su vez, fuera responsable del efecto acelerador observado. Esta hipótesis será examinada en el presente trabajo, a través de los siguientes objetivos:

1. Examinar si el efecto acelerador del DRV observado al reemplazar el NaCl por polialcoholes es específico, estudiando comparativamente la acción sobre el proceso regulador de volumen de otros azúcares -monosacáridos, disacáridos y polisacáridos- así como de distintos aminoácidos.
2. Investigar si el efecto acelerador observado está relacionado con un incremento en los flujos de  $K^+$  o de algún otro osmolito.
3. Tratar de aclarar el mecanismo responsable de este efecto acelerador.

## *Materiales y métodos.*

### *Soluciones y reactivos*

La solución isosmótica contiene en mM: 135 NaCl, 5 KCl, 0.6 MgSO<sub>4</sub>, 1 CaCl<sub>2</sub>, 10 glucosa y 10 ácido N-2-hidroxipiperazina-N'-2-2-hidroxipiperazina-N'-2-etanosulfónico (HEPES), a pH 7.4. Las soluciones hiposmóticas se prepararon disminuyendo la concentración de NaCl de 300 miliosmolar en un medio isosmótico a 150 miliosmolar en un medio hiposmótico 50 %.

Los medios libres de Na<sup>+</sup> fueron preparados omitiendo el Na<sup>+</sup> de la solución y agregando una concentración equiosmolar de cloruro de colina, cloruro de litio, cloruro de NMDG (N-metil-D-glucamina), cloruro de glucosamina. Las soluciones en las que se reemplazó el cloro, se prepararon sustituyendo todas las sales de Cl<sup>-</sup> por sales de gluconato. Los medios libres de sodio y cloro se prepararon utilizando una concentración equiosmolar de polialcoholes (mioinositol, sorbitol, manitol) y por azúcares del tipo de los monosacáridos (galactosa), disacáridos (lactosa, sacarosa) y trisacáridos (rafinosa), y aminoácidos. Para medir la cantidad de K<sup>+</sup> liberado en respuesta a un estímulo hiposmótico, se utilizó Rb<sup>86</sup> como trazador.



### *Cultivos celulares:*

Todos los experimentos se realizaron con cultivos primarios de astrocitos obtenidos del cerebelo de ratas Wistar de 8 días, y crecidos a confluencia en condiciones de esterilidad (Morán y Patel.,1989). Para obtener los cultivos, se disociaron a las células cerebrales de las ratas y se sembraron a una densidad de 700 000 a 1 000 000 células/ml de medio, en cajas de 35 mm de diámetro, para los experimentos de liberación de Rb<sup>86</sup>, y en cajas de 60 mm de diámetro para los experimentos de regulación del volumen y contenido intracelular de Ca<sup>2+</sup>. Las células fueron sembradas en un medio basal Eagle, complementado con 10 % de suero fetal bovino inactivado por calor, glutamina 10 mM, 50 U/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomicina. Las células se incubaron a 37 °C en atmósfera húmeda y una mezcla de 5 % CO<sub>2</sub> y 95 % de O<sub>2</sub>. La pureza del cultivo se determinó por inmunofluorescencia mediante anticuerpos policlonales contra marcadores específicos de fibroblastos como la Thy-1 para observar que no se encuentren presentes. De acuerdo a estas determinaciones se obtuvieron cultivos astrogliales compuestos en un 95-97 % de astrocitos. 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 presentan alteraciones de ninguna índole (Morán y Patel, 1989).

### *Regulación de volumen.*

Las medidas del volumen celular se realizaron en astrocitos en cultivo de 2 a 4 semanas, sembrados en cajas de 60 mm de diámetro. Para separar las células de la monocapa, se incubaron durante 2 min a 37 °C en 2 ml de solución salina buffer de fosfatos (PBS) sin  $\text{Ca}^{2+}$ , con EDTA 1 mM y tripsina 0.01 %. Una vez separadas, se detuvo la acción enzimática de la tripsina al agregar a la suspensión el mismo volumen de medio de cultivo con suero. Esta nueva suspensión se centrifugó 5 minutos a 1500 rpm. Las células sedimentadas se resuspendieron en medio isosmótico. Se midió el volumen celular por medio de un contador Coulter counter (modelo zf) acoplado a un analizador de partículas Channelizer (modelo 256). Esta técnica consiste en hacer pasar a través de un orificio de 100  $\mu\text{m}$  de diámetro una suspensión de células, lo que produce un cambio de impedancia determinado por el volumen de las células. El analizador de partículas detecta esta modificación a través de 256 canales, lo que da información sobre el número de células y la distribución estadística del volumen de la población. El volumen promedio se calculó como la mediana de las curvas de distribución de cada muestra analizada. El volumen celular se registró en fentolitros, pero los resultados se expresaron como volumen relativo, es decir, el cambio de volumen en relación al registrado en un medio isosmótico.

## *Liberación de Rb<sup>86</sup>.*

### *Sistema de perfusión.*

Para estudiar la liberación de Rb<sup>86</sup> las células se perfundieron de acuerdo a la técnica descrita por Drejer (1987). Los astrocitos crecidos en cajas de 35 mm se incubaron con 2.5  $\mu$ Ci/ml de Rb<sup>86</sup> en el medio de cultivo durante 60 minutos; al terminar la incubación, el medio de cultivo se sustituyó por el medio isosmótico (300 mOsm) antes descrito. Después de sustituir el medio de cultivo, se colocó un filtro delgado de seda para lograr una perfusión homogénea del medio sobre la monocapa. Las células se colocaron en un sistema de perfusión en el que se sustituye el medio a una velocidad de 2 ml/min mediante dos bombas peristálticas que actúan de manera sincrónica; una de ellas deposita 2 ml de medio, mientras que la segunda retira una cantidad igual de medio de las células a la misma velocidad. Las células se perfundieron con medio isosmótico durante 5 minutos; una vez obtenida la liberación basal, el medio se cambió por un medio hiposmótico reduciendo la osmolaridad en la forma indicada para cada uno de los experimentos, durante 15 minutos. Al final de cada experimento, se midió la radioactividad en las muestras colectadas y la remanente en el tejido, por medio de un contador de centelleo para muestras líquidas. Los resultados se expresaron como porcentaje del total liberado en cada fracción respecto a la radioactividad acumulada por las células durante el tiempo de incubación con el Rb<sup>86</sup>, es decir, la radioactividad liberada más la presente en las células al final del experimento.

*Contenido intracelular de calcio en astrocitos en cultivo.*

El contenido de calcio intracelular fue medido en células en suspensión utilizando el marcador fluorescente fura-2. Las células en suspensión se incubaron a 37 °C durante una hora en medio isosmótico conteniendo fura-2 AM 1  $\mu$ M . Después de la incubación, las células se centrifugaron y se resuspendieron en un volumen igual de medio e incubadas por 30 minutos más. Después de este período, las células se lavaron y la fluorescencia se midió en un espectrofotofluorómetro (SLM 8100). La longitud de onda de transmisión fue 340 y 380 nm y la intensidad de la fluorescencia fue monitoreada a una longitud de onda de emisión de 510 nm. La calibración del fura-2 asociado con las células fue realizada en células expuestas a lisis con Tritón en presencia de concentraciones de saturación de  $Ca^{2+}$  seguido por la adición de EGTA. El calcio citosólico se calculó de acuerdo a la ecuación descrita por Grynkiewicz (1985), usando un valor de  $K_D$  para la unión de  $Ca^{2+}$  al fura-2 de 278 nM a 22 °C.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### *Regulación del volumen en los astrocitos*

El volumen de los astrocitos medido en células en suspensión, en condiciones isosmóticas es de 1.2 pl por célula. Al exponer a las células a un medio con osmolaridad reducida al 50%, inicialmente se comportan como osmómetros perfectos e incrementan rápidamente su volumen alcanzando valores de aproximadamente 60% sobre el volumen en condiciones isosmóticas. El máximo volumen se observa aproximadamente 1 minuto después del estímulo hiposmótico y a partir de ese momento se inicia un proceso activo de regulación durante el cuál 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 siguió el fenómeno en este estudio, que fue de 15 min, pero después de este lapso, el volumen celular es solamente 13% superior al volumen en condiciones isosmóticas, es decir, se observa una regulación de más del 85% (Fig. 1). El proceso de regulación del volumen muestra una fase de corrección rápida, que tiene lugar entre el minuto 1 y el 3 y una fase más lenta que ocurre entre los minutos 5 y 15 (Fig. 1).

La regulación del volumen en los astrocitos es la consecuencia de la liberación rápida y masiva de los osmolitos intracelulares, tanto del tipo iónico, como el  $K^+$  y el  $Cl^-$  como de los osmolitos orgánicos, en particular los aminoácidos, y preferentemente la taurina, que se encuentra en concentraciones altas en estas células (30-40 mM). La Fig. 2 muestra el curso temporal de salida del  $K^+$ ,

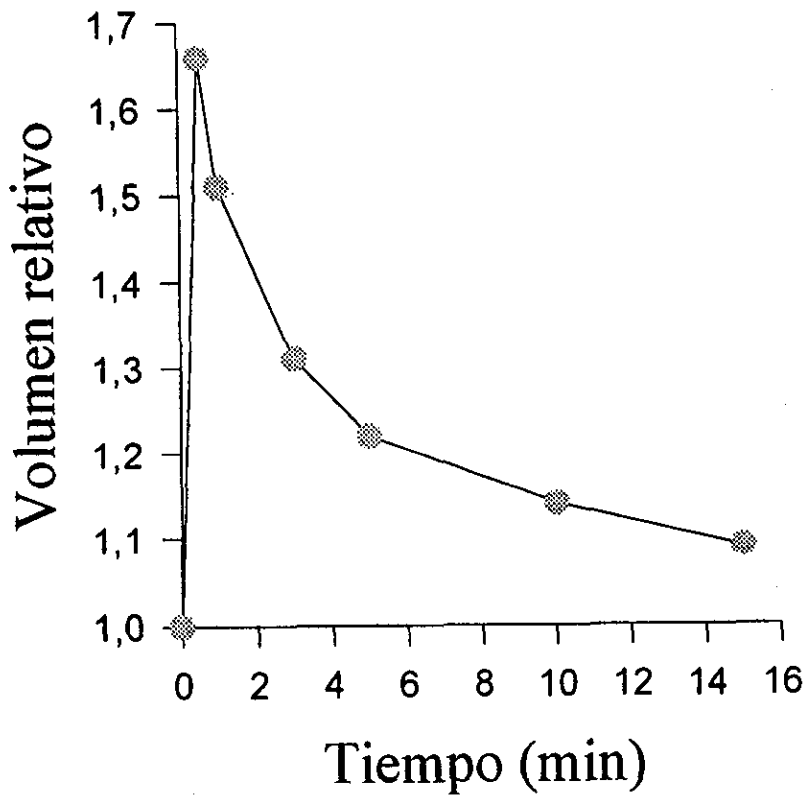


Fig 1. Regulación de volumen en astrocitos expuestos a condiciones de hiposmolaridad (50%). Los astrocitos al ser expuestos a un medio hiposmótico rápidamente incrementan su volumen seguido a este incremento una fase de regulación del volumen aún en presencia de las condiciones anisomóticas. Los datos se expresan como volumen relativo al volumen de los astrocitos en condiciones isosmóticas.

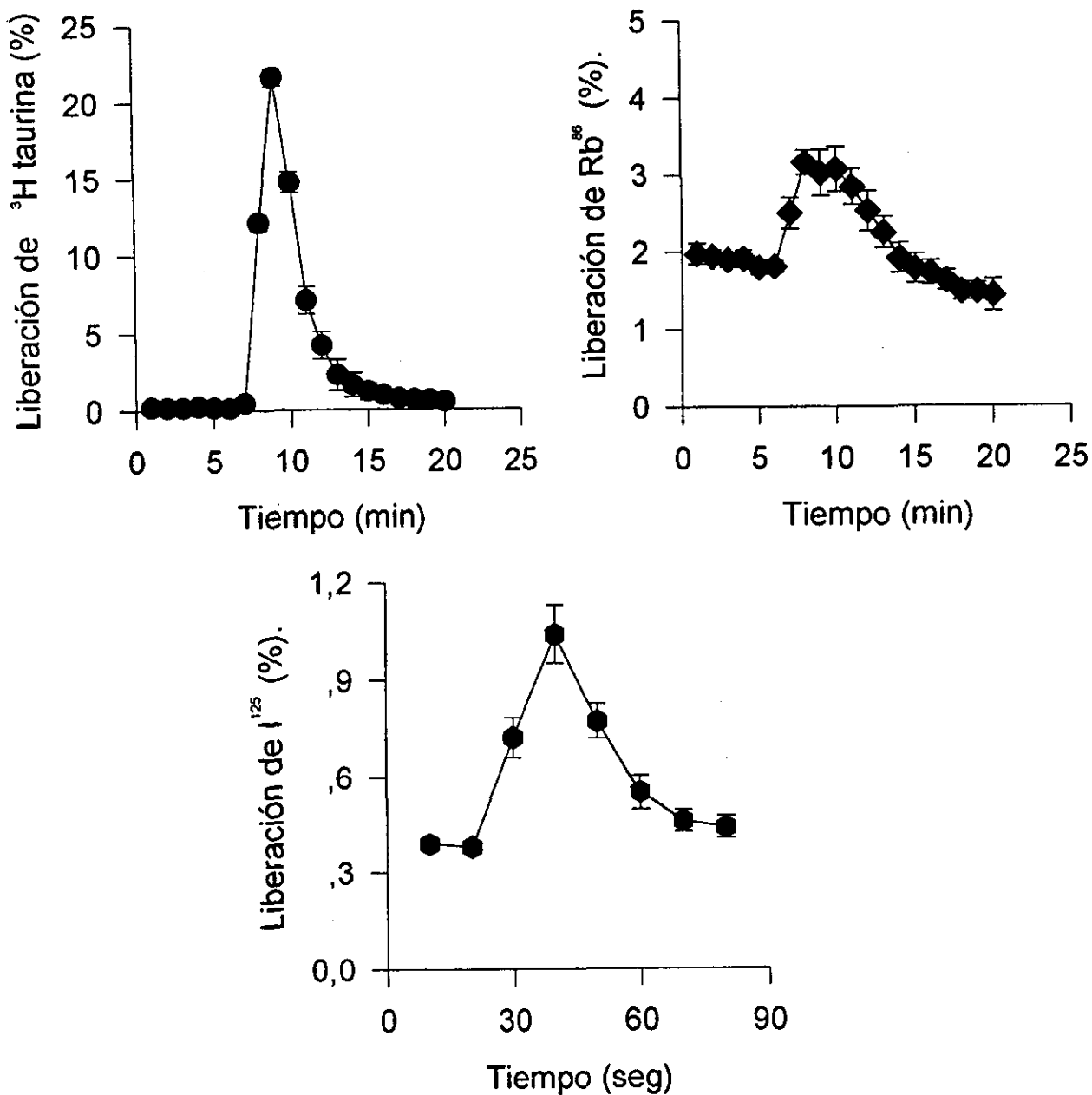


Fig 2. Curso temporal de la salida de osmolitos ( taurina, rubidio, iodo) en respuesta a un medio hiposmótico en astrocitos en cultivo. Los astrocitos así tratados, activan flujos de salida de osmolitos tanto orgánicos ( taurina) como inorgánicos (  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$ ). Los datos se expresan como el % liberado del total acumulado.

el  $\text{Cl}^-$  (usando  $\text{Rb}^{86}$  y  $\text{I}^{125}$  como trazadores) y de la taurina marcada con tritio. En las células expuestas a un medio con osmolaridad reducida al 50%, se moviliza cerca del 27 % de la poza de  $\text{K}^+$ , cerca del 50 % de la de  $\text{Cl}^-$  y más del 80% de la de taurina. Como se mencionó en la introducción, el mecanismo de movilización es a través de vías difusionales, por lo que la dirección del desplazamiento de los osmolitos está dada por el gradiente de concentración. La salida de  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$  tiene lugar a través de canales separados, aunque no se conoce con certeza si son interdependientes (Pasantes-Morales et al, 1994a).

#### *Efecto de la sustitución del NaCl en el medio por osmolitos orgánicos.*

Cuando el NaCl en el medio hiposmótico se reemplazó por una solución equiosmolar de mio-inositol, se observó una aceleración muy marcada de la regulación del volumen en todas sus fases (Fig. 3). Bajo estas condiciones, 3 min después del estímulo hiposmótico, la regulación del volumen es de casi el 82%, a diferencia de lo que ocurre en los controles en los que a este tiempo, la regulación es sólo de 31%. A los 5 minutos después del estímulo, las células expuestas al mio-inositol alcanzan ya una regulación del 97%, mientras que en los controles la regulación es apenas del 67%. El efecto acelerador de la regulación del volumen que se observa al reemplazar el NaCl por el mio-inositol es dependiente de la cantidad de la sal que se haya sustituido, como se ilustra en la Fig. 4.



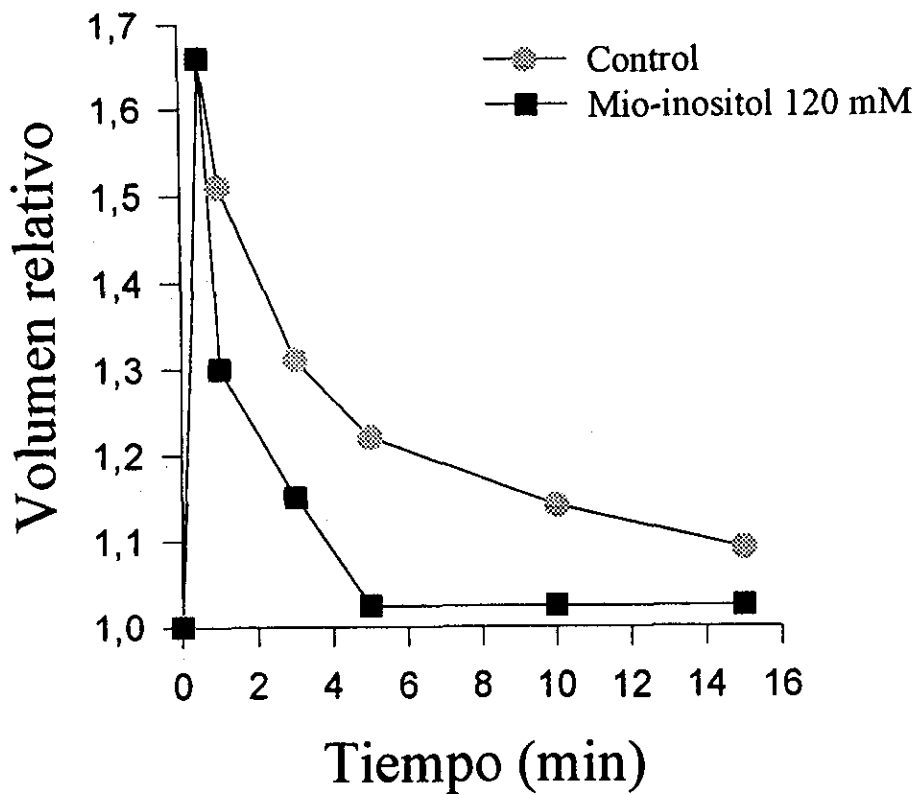


Fig 3. Efecto de la sustitución de NaCl por mio-inositol 120 mM sobre la regulación de volumen de astrocitos expuestos a condiciones hiposmóticas. Se observa una marcada aceleración de la regulación en medios con mio-inositol 120 mM los que al minuto 5 tienen una regulación del volumen de 96%.

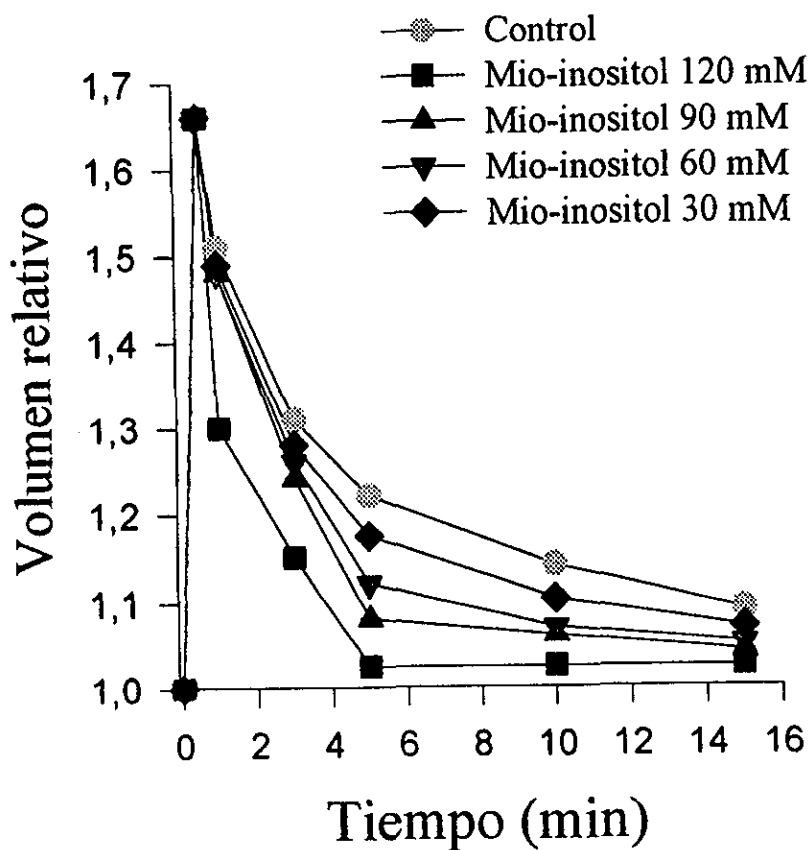


Fig 4. El efecto acelerador del mio-inositol es dependiente de la concentración. Al reemplazar el NaCl por mio-inositol se realizó de tal manera que la osmolaridad no fuera afectada, las concentraciones de 90, 60 y 30 mM de mio-inositol se les agregó la cantidad necesaria de NaCl para igualar la osmolaridad de los medios.

Con el propósito de investigar si éste es un efecto específico del mio-inositol, se llevaron a cabo experimentos similares en los que el NaCl de la solución hiposmótica se reemplazó por otros polialcoholes. La Fig. 5 muestra que el manitol y el sorbitol tienen también un efecto acelerador, pero menos potente que el mio-inositol. Así, a los 3 minutos después del estímulo, los astrocitos expuestos al sorbitol o al manitol alcanzaron una regulación del 55% y el 37% respectivamente. Con el mismo propósito, es decir, el investigar la especificidad de esta acción de los polialcoholes, se examinó el efecto de reemplazar el NaCl por otros azúcares, incluyendo monosacáridos (glucosa y galactosa), disacáridos (lactosa y sacarosa) y trisacáridos (rafinosa). Todos estos compuestos mostraron un efecto acelerador de la regulación del volumen, al menos tan potente como el del mio-inositol. La Fig. 6 muestra que en todos los casos, la regulación del volumen a los 3 minutos fue superior al 80% que se observa en el caso del mio-inositol, y en algunos los valores son superiores, entre el 86% para la galactosa y el 94% para la rafinosa.

Cuando se llevaron a cabo los experimentos para examinar el efecto de otras moléculas como los aminoácidos en la velocidad y eficiencia de la regulación del volumen, se observó que, al reemplazar el NaCl por taurina, glicina o alanina, debido al carácter difusional de las vías de transporte de estos osmolitos, al activarse la vía de permeabilidad que permite el movimiento de los aminoácidos en respuesta al hinchamiento de las células, cuando la concentración de los aminoácidos en el medio externo es

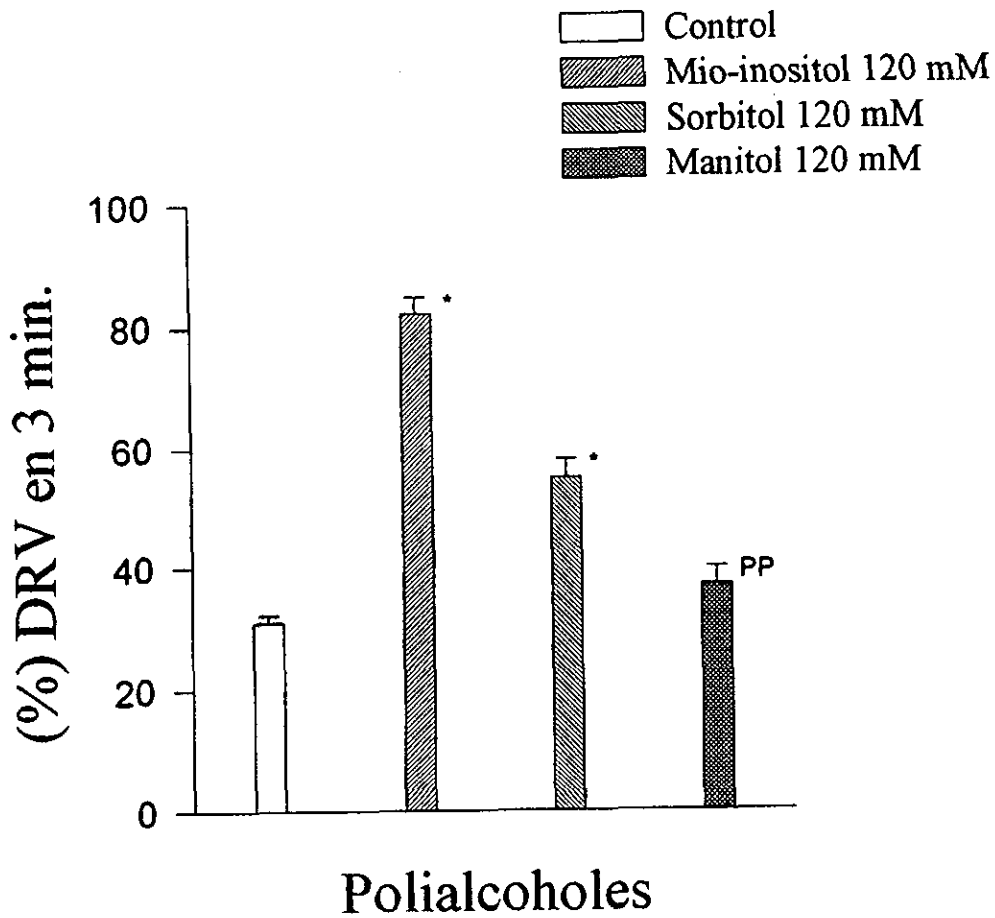


Fig 5. Efecto acelerador de los polialcoholes en la regulación de volumen en los astrocitos en cultivo. La figura muestra que el efecto acelerador de la regulación del volumen no es privativo del mio-inositol. Los datos se expresan como el % de regulación del volumen al minuto 3. Los resultados son la media de 4 - 18 experimentos. Significancia con respecto al control \* $P < 0.001$ ,  $^{PP}P < 0.05$ .

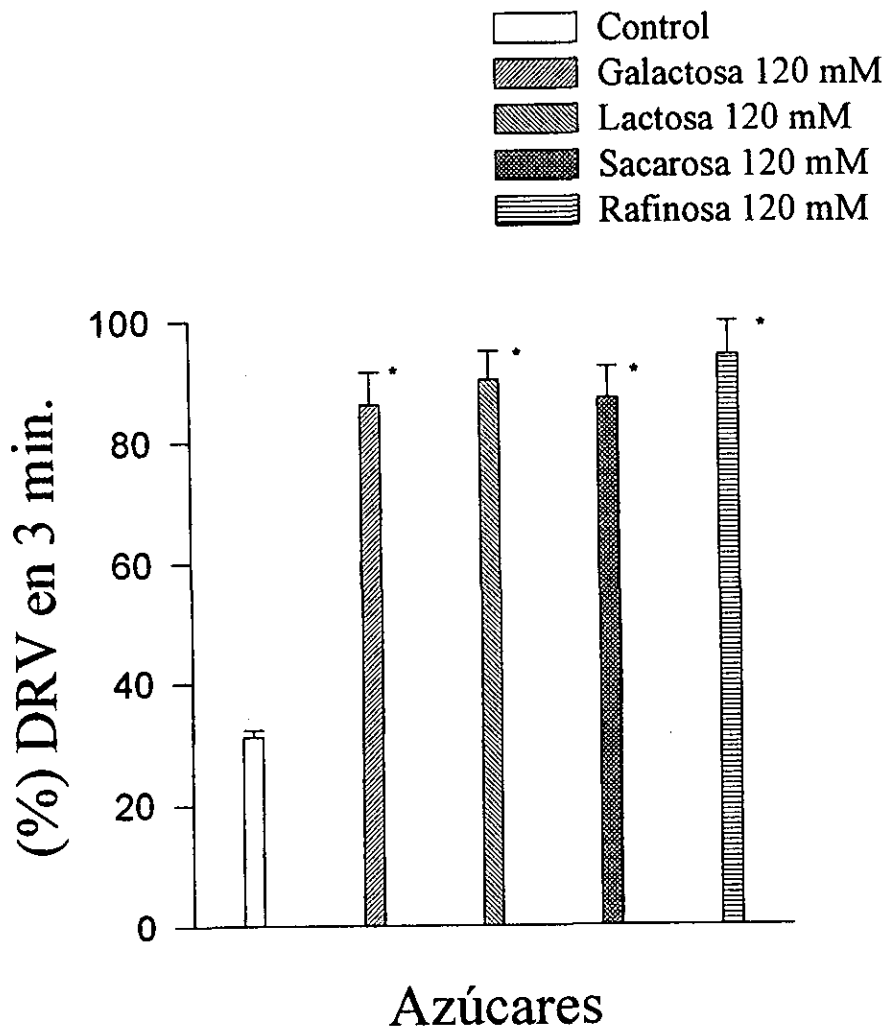


Fig 6. Efecto del reemplazo del NaCl por azúcares. La regulación del volumen es astrocitos también se ve acelerada cuando el NaCl de la solución hiposmótica se reemplaza con azúcares tanto monosacáridos (galactosa), disacáridos (lactosa y sacarosa) y polisacáridos (rafinosa). Los datos se expresan como el % de regulación del volumen en el minuto 3. Los resultados son la media de 4 - 18 experimentos. Significancia con respecto al control \* $P < 0.001$ .

superior a la del citoplasma, como ocurre en estos experimentos, lo que se observa es una entrada de los aminoácidos, lo que contrarresta la salida de los otros osmolitos, tanto orgánicos como inorgánicos y da como resultado un bloqueo del proceso de regulación en lugar de una aceleración (Pasantes-Morales et al, 1994b). Por ello no se observó ningún efecto acelerador de la regulación del volumen en el caso de la taurina, la glicina y la alanina y la glutamina. En el caso de los tres primeros, que son muy permeables a través de esta vía, no sólo no se vió un efecto acelerador sino un mayor hinchamiento de las células, mientras que en el caso de la glutamina, se observó un pequeño retraso en la eficiencia de la regulación (Tabla 1).

En estos experimentos se reemplaza tanto el  $\text{Na}^+$  como el  $\text{Cl}^-$  en la solución hiposmótica y por lo tanto, cabe la posibilidad de que el efecto observado sea debido no tanto a una acción específica y directa de los azúcares y los polialcoholes, sino una consecuencia de la sustitución del  $\text{Na}^+$  y/o el  $\text{Cl}^-$ . Para investigar esta posibilidad, se llevaron a cabo experimentos en los cuales el  $\text{Na}^+$  se reemplazó por otros cationes y el  $\text{Cl}^-$  por el anion impermeable gluconato. En estudios previos se encontró que el  $\text{K}^+$  intracelular, que se moviliza en respuesta al estímulo hiposmótico lo hace por una vía, posiblemente un canal, que es muy selectivo para el  $\text{K}^+$ , ya que es prácticamente impermeable a cationes como  $\text{Li}^+$ , colina, TRIS, y N-metil-D-glucamina; sólo es permeable al  $\text{Rb}^{86}$ , que es esencialmente idéntico al  $\text{K}^+$ . La movilización de  $\text{Cl}^-$  tiene lugar también por un canal, pero a diferencia del  $\text{K}^+$ , en este caso se

Tabla 1. Efecto de los electrolitos y osmolitos orgánicos sobre el DRV y la liberación de Rb<sup>86</sup> en astrocitos en cultivo.

Osmolito	% Volumen recuperado en 3 min.	% de liberación de Rb <sup>86</sup> en 5 min.
NaCl (control)	31±1.1	15.3±0.32
Gramicidina 5 µM	72±3.9*	
Mio-inositol 120 mM	82±2.7*	27.4±2.1*
Sorbitol 120 mM	55±3.1*	27.0±1.8*
Manitol 120 mM	37±2.9 <sup>PP</sup>	26.0±1.8*
Galactosa 120 mM	86±5.3*	27.6±1.4*
Lactosa 120 mM	90±4.8*	29.9±2.3*
Sacarosa 120 mM	87±5.0*	27.8±3.1*
Rafinosa 120 mM	94±5.6*	26.1±3.0**
Taurina 120 mM	0	26.2±2.8*
Glutamina 60 mM	21±1.5*	25.1±3.1**
LiCl 60 mM	40±3.1**	16.2±0.7*
Cloruro de colina 60 mM	43±2.8**	18.9±0.4 <sup>P</sup>
NMDG 60 mM	44±3.1**	18.6±1*

Los datos representan el % de volumen recuperado en 3 min. y la liberación de rubidio estimulada por medios hiposmóticos 50 % en un periodo de 5 min. Los resultados son la media de 4-18 experimentos. Significancia con respecto a el control \*P<0.001, \*\*P<0.01, <sup>P</sup>P<0.02, <sup>PP</sup>P<0.05.

trata de un canal muy poco selectivo, que permite el paso de numerosos aniones, incluyendo nitrato, yoduro, sulfocianato y aún aniones grandes como el benzoato y el glutamato. Es mucho menos permeable al sulfato y al gluconato (Pasantes-Morales et al, 1994a).

La Fig. 7 muestra que cuando se reemplazó el  $\text{Na}^+$  por distintos cationes, la regulación del volumen se vió ligeramente acelerada. En comparación con los controles, que a los 3 minutos habían regulado el 31%, cuando el  $\text{Li}^+$  reemplazó al  $\text{Na}^+$ , la regulación fue de 40%, mientras que cuando la colina y la N-metil-glucamina fueron los iones de reemplazo, la regulación del volumen fue del 43% y 44%, respectivamente. Estos valores son muy lejanos de los observados en la condición en la que los azúcares y el mio-inositol fueron usados para reemplazar el NaCl (Figs 5,6 y tabla I).

Cuando el  $\text{Cl}^-$  en la solución fue sustituido por el gluconato, se observó un perfil de regulación del volumen distinto del que aparece cuando el mio-inositol es el sustituto del NaCl. Como se ilustra en la Fig. 8, en estas condiciones la primera fase de la regulación del volumen, entre los minutos 1 y 3 no se vió particularmente afectada; sin embargo, a partir del minuto 5 se puede apreciar una aceleración del proceso, que hace que a los 10 minutos ya se alcance la máxima regulación.

El hecho de reemplazar en su totalidad el NaCl por solutos sin carga eléctrica, podría tener un efecto sobre las cargas de superficie de la membrana, lo que a su vez podría afectar la eficiencia del transporte de osmolitos a través de los canales.



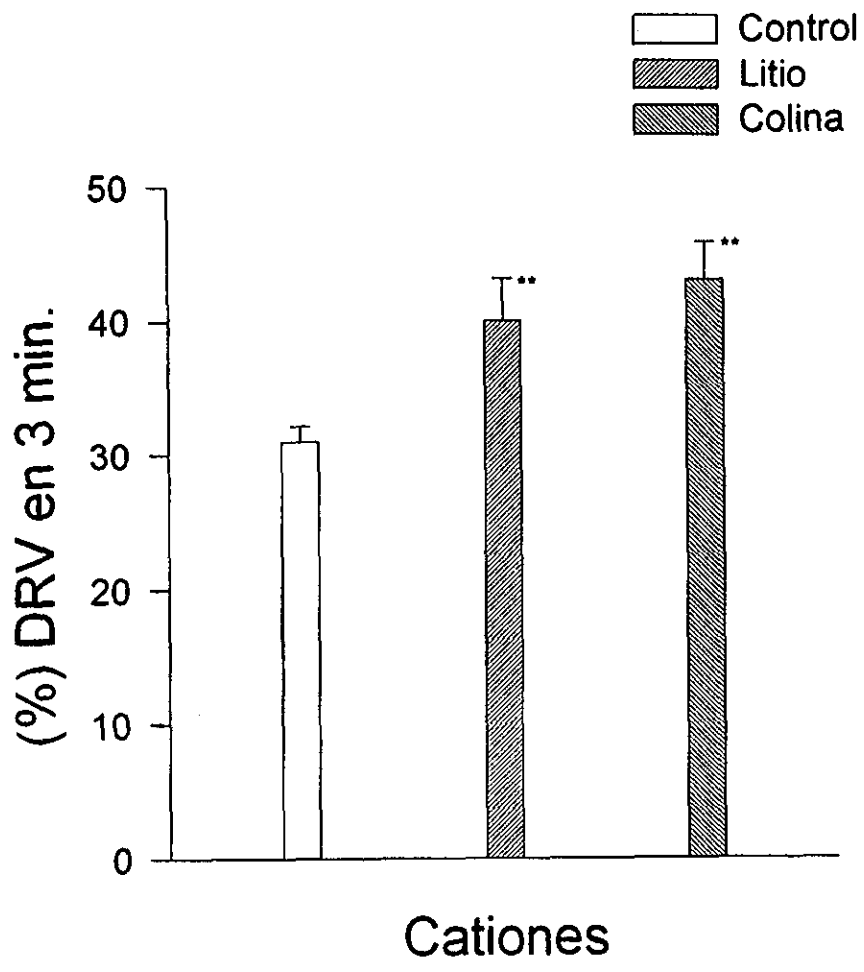


Fig 7. Efecto de reemplazar el NaCl por cationes tales como el litio y la colina en la regulación del volumen en astrocitos en cultivo. Los resultados se expresan como el % de regulación a 3 minutos y son la media de 4-18 experimentos. Significancia con respecto al control \*\*P<0.01

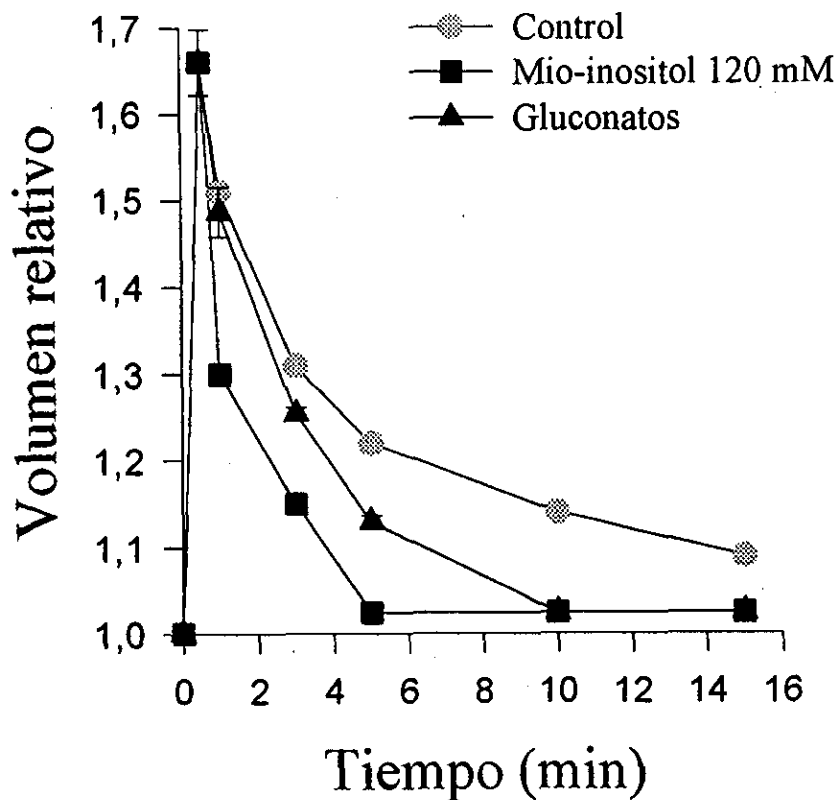


Fig 8. Efecto de reemplazar el  $\text{Cl}^-$  de la solución hiposmótica. La regulación del volumen en astrocitos en medios libres de  $\text{Cl}^-$ , se prepararon reemplazando el  $\text{Cl}^-$  de la solución y agregando el ion impermeable gluconato. Como se observa, el gluconato no posee un efecto acelerador de la regulación del volumen al menos en la primera fase de regulación (min 1-3). En cambio, la aceleración de la regulación se observa en la fase tardía de la regulación (min 5-15).

Existe evidencia en la literatura sobre un efecto importante del apantallamiento de las cargas de superficie sobre la actividad de los canales de  $K^+$  (Green et al, 1991; Spires et al, 1994). Con el objeto de explorar esta posibilidad, en los experimentos en los que el mio-inositol reemplazó al NaCl, se agregó al medio una concentración elevada de cloruro de calcio (10 mM). Se sabe que el calcio tiene un efecto de apantallamiento de las cargas de superficie notablemente mayor que el  $Na^+$ , por lo que esta concentración debería suplir por completo al  $Na^+$  que se reemplazó por el mio-inositol, y por lo tanto, revertir el efecto acelerador del mio-inositol. Con el objeto de mantener la osmolaridad de las soluciones, y ya que el  $Ca^{2+}$  es un catión divalente, fue necesario reducir la concentración del mio-inositol a 90 mM. Esta concentración, como puede apreciarse en la Fig. 4, produjo todavía un efecto acelerador muy notable de la regulación del volumen.

En la Fig. 9 se observa el resultado de estos experimentos y se muestra que la presencia de cloruro de calcio no revirtió la acción del mio-inositol, sugiriendo que la remoción del apantallamiento de las cargas de superficie por los cationes no tiene un papel importante en el efecto acelerador del reemplazo del NaCl.

*Efecto de la sustitución del NaCl sobre la liberación del K estimulada por hiposmolaridad.*

La notable aceleración de la regulación del volumen que se observa cuando el NaCl se sustituye por osmolitos orgánicos recuerda la acción de la gramicidina sobre este proceso. La gramicidina es un ionóforo que actúa como un canal inserto en la membrana por el que

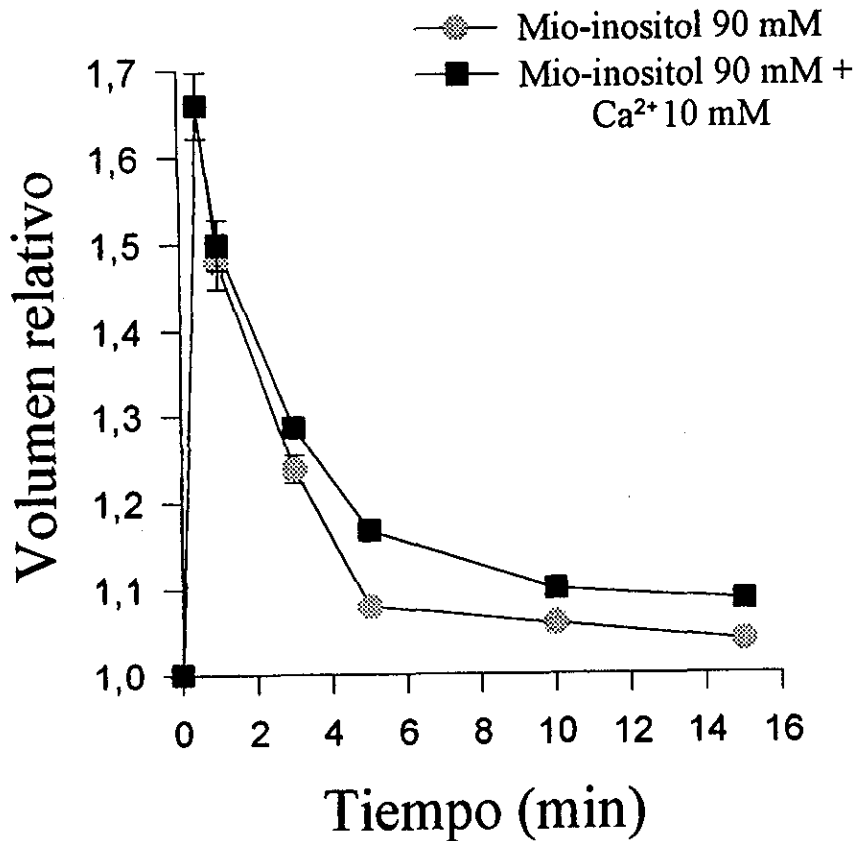


Fig 9. Efecto de las cargas de superficie sobre la regulación del volumen en astrocitos en cultivo. El reemplazo del NaCl por otro osmoltito, podría tener un efecto sobre las cargas de superficie, es decir que se activaran canales de  $K^+$ , en respuesta a el cambio de cargas de la membrana celular, para evitar esto, se realizaron experimentos en los que se agregó una concentración de 10 mM de  $CaCl_2$ , con el propósito de equilibrar las cargas de superficie. La figura muestra que la regulación de volumen sigue siendo eficiente en estas condiciones.

tiene lugar el paso de cationes en especial el  $K^+$ , dependiendo de su gradiente de concentración. Cuando los astrocitos se ponen en contacto con la gramicidina en un medio que no contiene sodio, el potasio intracelular se moviliza hacia afuera, siguiendo la dirección de su gradiente. Esto podría dar como resultado una pérdida del volumen celular, siempre y cuando el  $Cl^-$  pueda acompañar al  $K^+$  en su movimiento de salida. Se ha observado que en condiciones isosmóticas, la gramicidina produce sólo un cambio de volumen pequeño, lo que sugiere que la permeabilidad al  $Cl^-$  se encuentra restringida. Sin embargo, cuando la célula se hincha a consecuencia del estímulo hiposmótico, la permeabilidad al  $Cl^-$  se activa notablemente y en presencia de gramicidina, que abre una vía alterna de permeabilidad al  $K^+$ , el proceso de reducción del volumen se ve notablemente acelerado (Sánchez-Olea et al, 1993). Estas observaciones indican, por una parte, que en condiciones normales, la permeabilidad al  $Cl^-$  se activa en forma máxima por el cambio en volumen consecuente a la exposición a medios hiposmóticos y por otra, que la permeabilidad del  $K^+$  es el factor limitante de la velocidad del proceso de regulación del volumen.

El efecto del mio-inositol y otros azúcares sobre la regulación del volumen en los astrocitos es muy similar al de la gramicidina, lo que sugirió que, posiblemente, su acción se estaba ejerciendo precisamente sobre el canal de  $K^+$ , acelerando la salida del ion en respuesta a la hiposmolaridad. Con el propósito de examinar esta posibilidad, la segunda parte de este trabajo se dedicó a investigar el efecto de la sustitución del NaCl sobre la

movilización del  $K^+$  activada por volumen. La Fig. 10 muestra el curso temporal de la salida de  $K^+$  (medida usando  $Rb^{86}$  como trazador) en una condición isosmótica y luego, en respuesta a la activación por medios hiposmóticos. La salida de  $K^+$  se grafica como el  $Rb^{86}$  liberado en intervalos de 1 min expresada como el porcentaje del total acumulado por la célula. En el medio isosmótico, el  $Rb^{86}$  se libera a una tasa de aproximadamente 2%, por minuto. Este valor se incrementa en respuesta al estímulo hiposmótico hasta alcanzar un máximo de 3.5%. La activación de la liberación del  $Rb^{86}$  es lenta, observándose el máximo aproximadamente en el minuto 3 después del estímulo. La liberación máxima se mantiene por un período de 2-3 min y a continuación comienza a inactivarse lentamente llegando a los valores de liberación en condiciones isosmóticas, en aproximadamente 9 minutos después de la estimulación (Fig. 10). Cuando el NaCl en el medio de estimulación se reemplaza por mio-inositol se observa una modificación drástica tanto en la magnitud como en el curso temporal de la salida de potasio. En el primer minuto después de la estimulación se observa ya el máximo valor de liberación, el curso temporal de la inactivación también es más rápido y la cantidad neta de potasio que se moviliza aumenta significativamente. Cuando se suma la cantidad de potasio liberado, expresada en porcentaje durante cinco minutos después del estímulo, se observa un incremento de casi 100 % en las células expuestas a los medios que tienen mio-inositol con respecto a los que se encuentran en los medios hiposmóticos control (Tabla 1, fig 11). Con el objeto de investigar si el efecto observado es específico

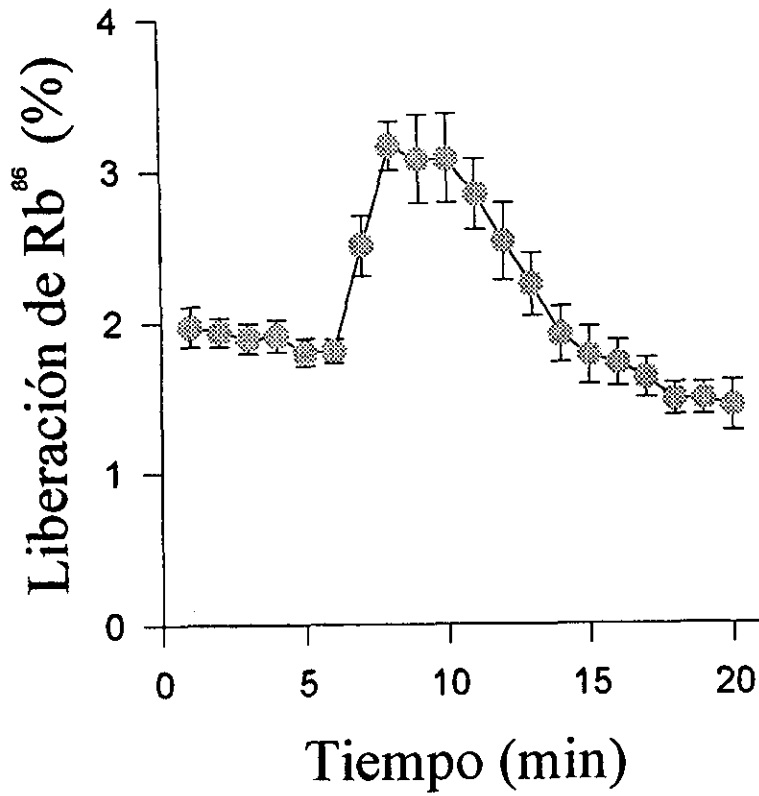


Fig 10. Liberación de Rb<sup>86</sup> en respuesta a un estímulo hiposmótico en astrocitos en cultivo. Los astrocitos en respuesta a un cambio en volumen ocasionado por una disminución en la osmolaridad, sacan algunas moléculas tanto orgánicas como inorgánicas. Tal es el caso del K<sup>+</sup> que se ilustra en esta figura.

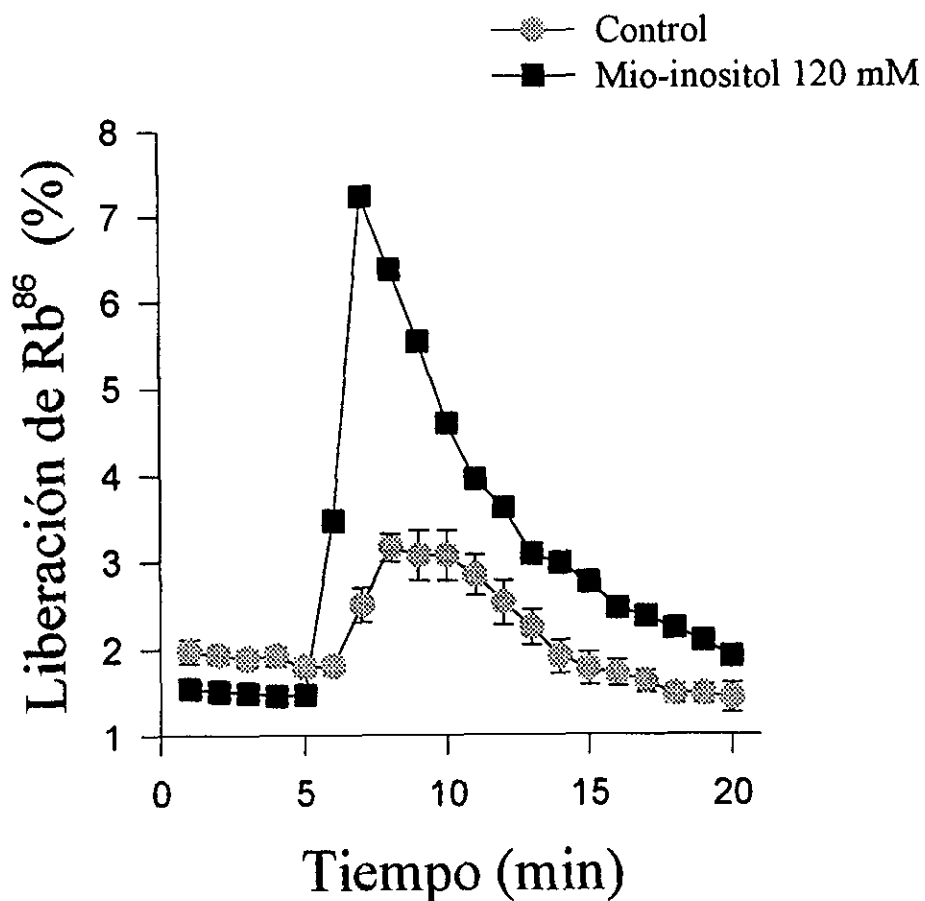


Fig 11. La liberación de  $Rb^{86}$  en respuesta a medios hiposmóticos con mio-inositol se acelera notablemente e incrementa su magnitud como se ilustra en la figura. En medios con mio-inositol, se libera hasta el 7% del  $Rb^{86}$  capturado por la célula, en tanto que con el medio hiposmótico control, la liberación es de apenas 3.3 % del total acumulado por la célula.



para el mio-inositol, se midió la liberación de potasio estimulada por medios hiposmóticos en los que el NaCl se reemplazó por otros polialcoholes y por azúcares tanto monosacaridos (galactosa) como disacáridos (lactosa y sacarosa) y trisacáridos (rafinosa). Las Figs 12 y 13 muestran que el efecto acelerador de la salida de potasio no es de ninguna manera exclusivo del mio-inositol, sino que se observa con la misma o mayor eficiencia cuando los osmolitos utilizados para reemplazar el NaCl son otros polialcoholes o azúcares de distinta complejidad. Estos resultados nos llevaron a examinar el efecto sobre la liberación de  $K^+$  de otros osmolitos orgánicos como los aminoácidos utilizados en sustitución del NaCl. En la tabla 1 se muestra que los aminoácidos también produjeron un incremento notable en la salida de  $K^+$  aunque, como se indicó en la sección correspondiente, la regulación del volumen no se ve acelerada, debido a la acumulación intracelular de los aminoácidos, determinada por la dirección de su gradiente.

En conjunto todas estas observaciones sugieren que posiblemente los efectos que se están observando son debidos a la remoción del NaCl, independientemente de cual sea el compuesto que se utilice para reemplazarlo. Estos resultados parecen indicar que la presencia del NaCl está inhibiendo de alguna manera a la vía responsable de la liberación de  $K^+$  activada por hiposmolaridad y que su remoción elimina este posible efecto inhibitor. Por esta razón, el siguiente aspecto que fue abordado en este estudio, como en el caso de la regulación del volumen, fue investigar cuál de los dos componentes de la sal, es decir el  $Na^+$  y el  $Cl^-$ , es el que está ejerciendo este

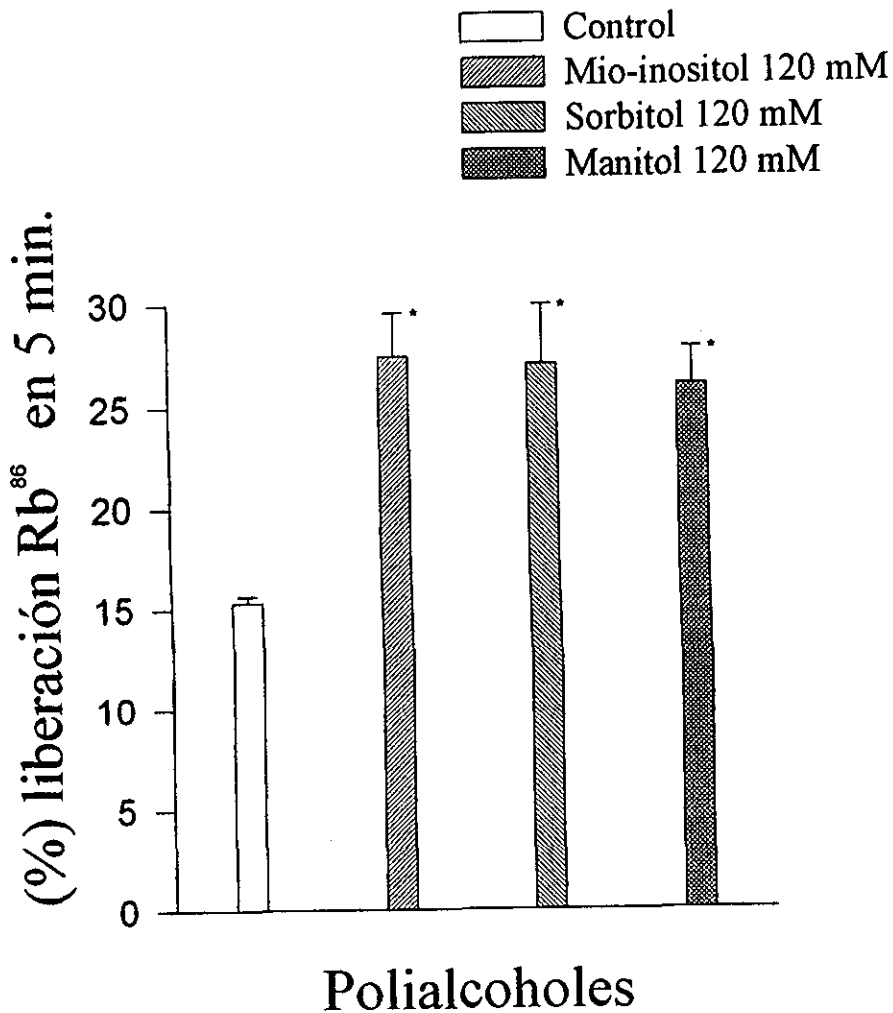


Fig 12. La liberación de Rb<sup>86</sup> también se ve acelerada cuando el NaCl de la solución hiposmótica, se reemplaza por otros polialcoholes, como se ilustra en la figura. Los resultados se expresan como el % de liberación de Rb<sup>86</sup> en 5 minutos y son la media de 4 - 18 experimentos. Significancia con respecto al control \*P<0.001.

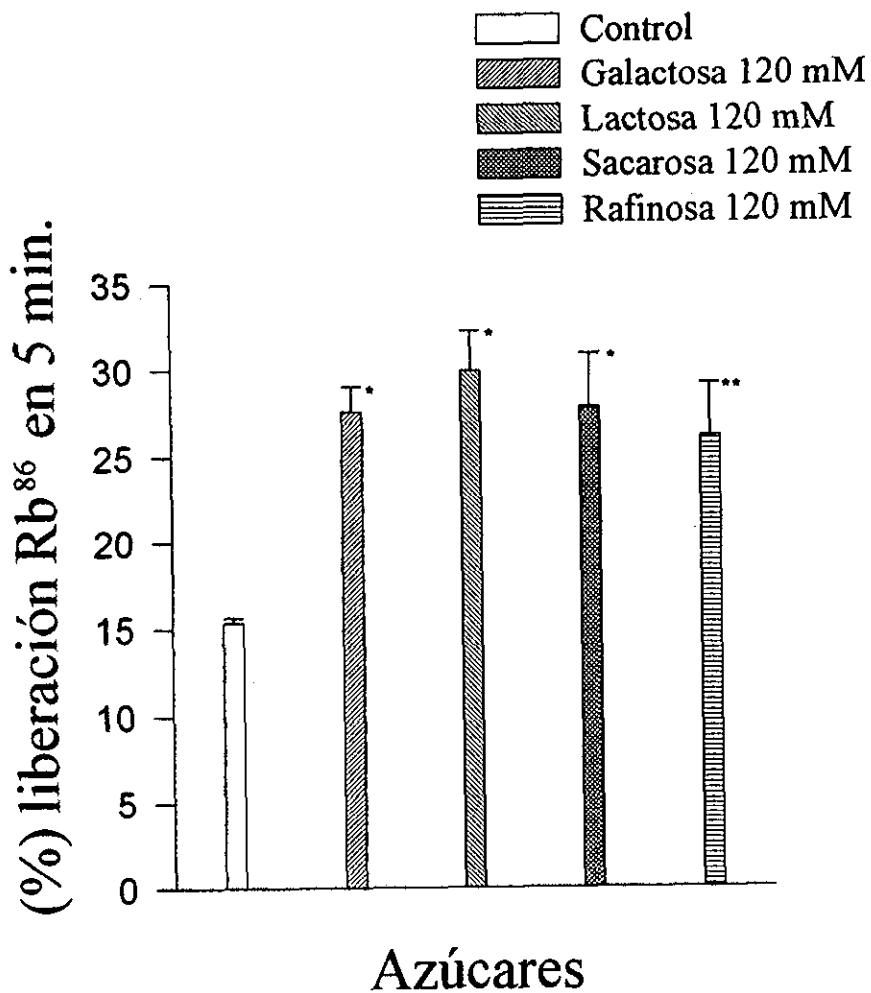


Fig 13. La liberación de Rb<sup>86</sup> es acelerada también por diferentes azúcares, tanto monosacáridos, disacáridos como polisacáridos. Los resultados se expresan como el % de liberación de Rb<sup>86</sup> en 5 minutos y son la media de 4-18 experimentos. Significancia con respecto al control \*P<0.001, \*\*P<0.01

efecto inhibitor sobre el movimiento de  $K^+$ . Para ello los medios hiposmóticos se prepararon reemplazando el  $Na^+$  por los cationes colina, litio, N-metil-D-glucamina y el  $Cl^-$  por el anión impermeable gluconato. La Fig 13 y la tabla 1 muestran el efecto de estas substituciones. Cuando el  $Na^+$  se reemplazó por colina y NMDG se observó un aumento pequeño pero significativo en la salida de  $K^+$ , aunque no se modificó el curso temporal de este fenómeno.

Cuando el  $Na^+$  se reemplazó por el litio no se observó un cambio significativo aunque sí existe una tendencia, como resultado de esta sustitución, a incrementar la salida de  $K^+$ . Estos resultados concuerdan de manera muy clara con los efectos en la regulación del volumen, es decir, hay una correlación entre el efecto de los distintos cationes sobre el incremento en la salida de  $K^+$  y su acción aceleradora de la regulación del volumen. Al reemplazar el  $Cl^-$  por gluconato se observó un incremento mayor en la salida de  $K^+$  al que se observó cuando se reemplazó el  $Na^+$ , pero menor todavía que el observado cuando ambos,  $Na^+$  y  $Cl^-$ , se reemplazaron por otros osmolitos. El curso temporal de la salida de potasio en medios conteniendo gluconato no se vió significativamente afectado (Fig 14).

*Posibles mecanismos responsables de los efectos de remoción del NaCl.*

Los resultados de los experimentos que se acaban de describir muestran que el reemplazar ya sea el  $Na^+$  o el  $Cl^-$  en los medios hiposmóticos tiene, cada uno por su parte un efecto acelerador. El efecto del gluconato acelerando la salida de  $K^+$ , puede deberse a

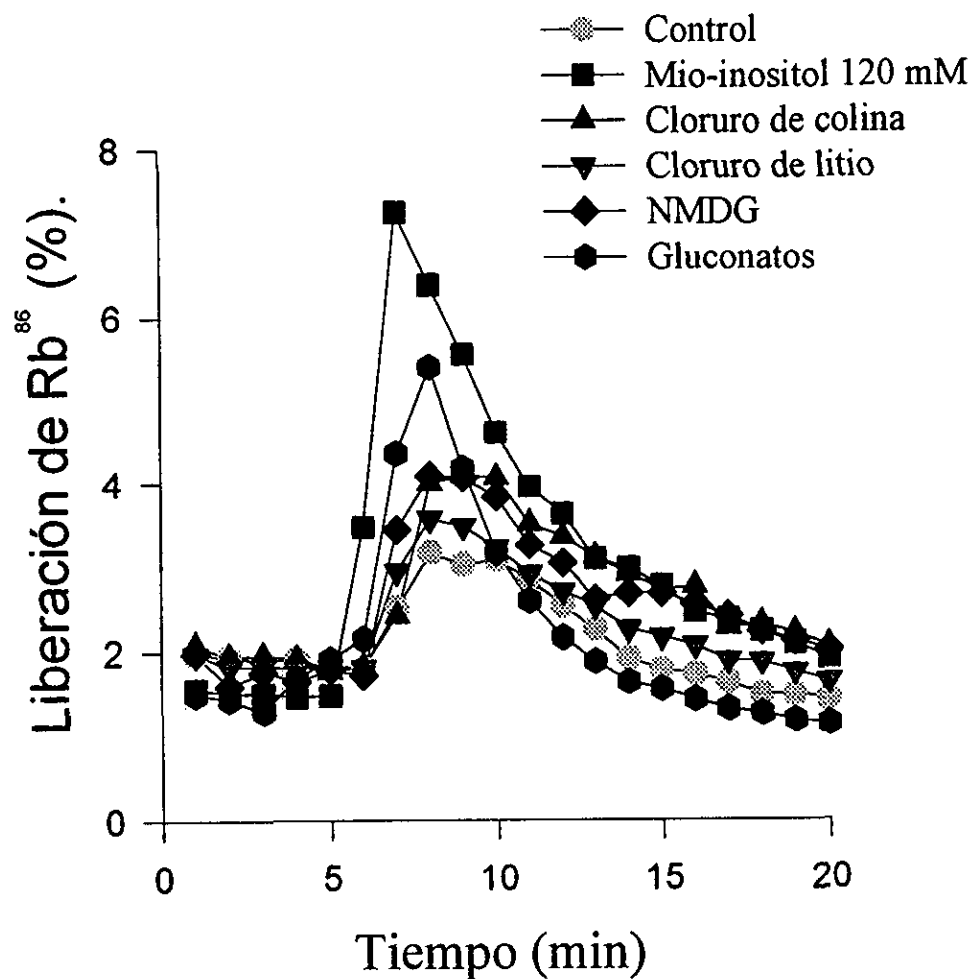


Fig 14. Efecto de reemplazar el NaCl por diferentes cationes en la liberación de  $Rb^{86}$ . En la figura también se observa el efecto de reemplazar el  $Cl^-$  por gluconatos en la liberación de  $Rb^{86}$  en astrocitos en cultivo. Los resultados se expresan como el % del total de  $Rb^{86}$  acumulado.

una mayor salida de  $\text{Cl}^-$  favorecida por el nuevo gradiente de concentración, y puede suceder que esta mayor salida de  $\text{Cl}^-$  sea a su vez responsable de la aceleración en la salida de  $\text{K}^+$ . El mecanismo por el cual ocurriría este efecto no está claro en este momento, ya que no se tiene un conocimiento preciso de la interdependencia de la salida de  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$  activada por el cambio en volumen. Es posible que la mayor movilización de  $\text{Cl}^-$  produzca un cambio en el potencial de membrana que a su vez afecte la salida de  $\text{K}^+$ . Sin embargo tampoco se sabe en este momento si los canales de  $\text{K}^+$  sensibles al cambio en volumen se afectan por el potencial transmembranal.

Un efecto de la remoción de  $\text{Cl}^-$  que podría acelerar directamente su salida e indirectamente la movilización de  $\text{K}^+$  podría explicar sólo en parte los resultados observados, ya que como se mencionó, ni la magnitud ni el curso temporal de la salida de  $\text{Rb}^{86}$  en esta condición son iguales a los que se observan cuando se eliminan el  $\text{Na}^+$  y el  $\text{Cl}^-$ . Además los inhibidores de canales de  $\text{Cl}^-$  como el NPPB que suprimen por completo la salida de  $\text{Cl}^-$ , sólo disminuye parcialmente la liberación de  $\text{Rb}^{86}$  activada por la remoción del  $\text{NaCl}$  y finalmente cuando se reemplaza el  $\text{Cl}^-$  por gluconato afecta únicamente la fase tardía de la regulación del volumen, al contrario de lo que ocurre al eliminar el  $\text{NaCl}$  en donde la aceleración más marcada se observa en la fase temprana del proceso regulador.

Las diferencias observadas en la eficiencia en los diferentes cationes para reemplazar el  $\text{Na}^+$  podría indicar que el sitio de

modulación de la vía de salida de  $K^+$  por el  $Na^+$  es más accesible a cationes pequeños como el litio, que a los más grande como la colina y la NMDG. Existen reportes en la literatura (Bertrand et al, 1989) que señalan que algunos canales de  $K^+$  pueden estar modulados por la concentración de  $Na^+$  intracelular y cuando, como en estos experimentos, se reemplaza el  $Na^+$  extracelular, es posible que los niveles de  $Na^+$  citosólico disminuyan también debido al nuevo gradiente de concentración, y que sea esta disminución la que, en cierta forma active los canales de  $K^+$  involucrados en la regulación del volumen. En cualquier caso, la suma del incremento en la salida de  $K^+$  inducida por reemplazar el  $Na^+$  y el  $Cl^-$  es casi equivalente a la que se observa cuando los dos iones se reemplazan por el mio-inositol o alguno de los otros osmolitos orgánicos.

Otro efecto asociado a la remoción del NaCl podría ser la modificación de las pozas citosólicas de  $Ca^{2+}$ . En este trabajo se observó que cuando los astrocitos se exponen a un medio hiposmótico la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular aumenta en forma muy notable (Fig 15). En condiciones isosmóticas la concentración de calcio es de aproximadamente 100 nM y a consecuencia de choque hiposmótico esta concentración aumenta hasta aproximadamente 400 nM. Cuando el medio hiposmotico contiene mio-inositol reemplazando al NaCl los niveles de  $Ca^{2+}$  aumentan hasta llegar a un máximo de 600 nM. El significado de estos resultados no puede evaluarse por completo en este momento, ya que existe controversia acerca de la participación del  $Ca^{2+}$  como mensajero transductor de señales en la regulación del volumen. La movilización de  $K^+$  activada por los medios hiposmóticos

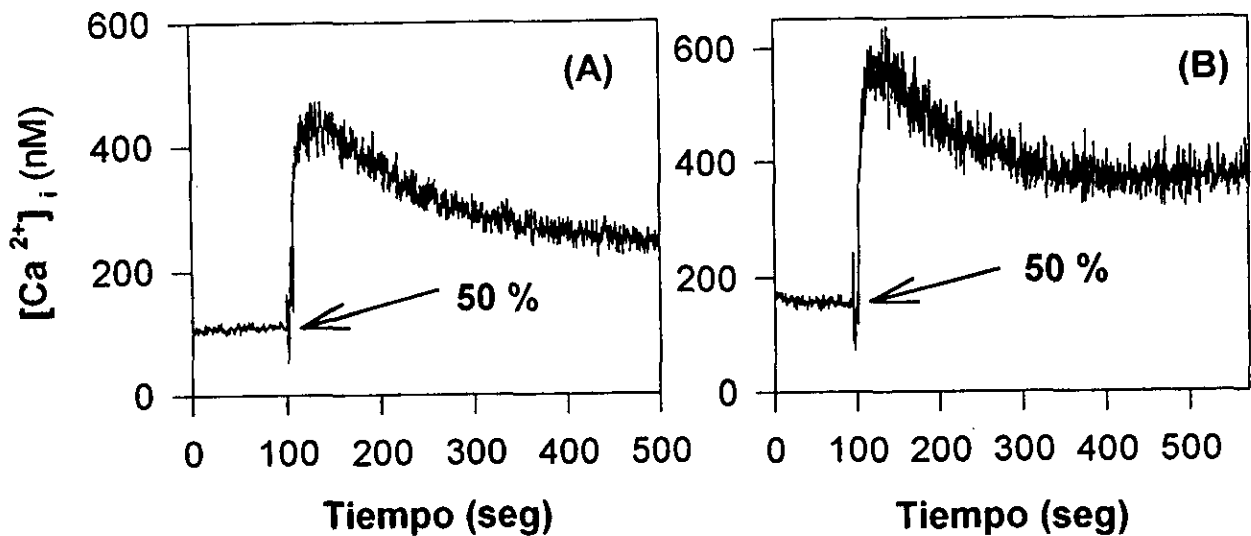


Fig 15. Muestra la concentración intracelular de calcio en astrocitos en cultivo, en A, se observa la concentración intracelular de calcio en un medio isosmótico, la concentración de calcio se aumenta en respuesta a un cambio en la osmolaridad, de 100 nM incrementa a 400 nM. En B, se observa la concentración de calcio intracelular en medios isosmóticos con mio-inositol, y el cambio en la concentración de calcio en respuesta a un medio hiposmótico con mio-inositol, el calcio intracelular aumenta de 200 nM a 600 nM. Los resultados se expresan como la concentración intracelular de calcio en nM. El método de detección del calcio intracelular se describe en materiales y métodos.



es independiente del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, y su dependencia del  $\text{Ca}^{2+}$  liberado de pozas endógenas tiene también muchos aspectos oscuros. Finalmente, no puede excluirse un efecto directo de los azúcares y los polialcoholes sobre la vía de movilización del  $\text{K}^+$ . Se ha reportado que algunos disacáridos como la sacarosa tienen un efecto modulador de las corrientes catiónicas (Hirose et al, 1992).

Del análisis de los resultados y las referencias al estado del campo en relación con los canales de  $\text{K}^+$  asociados a la regulación del volumen en los astrocitos, se desprende que el mecanismo exacto de los efectos observados en este trabajo deberá esperar el conocimiento más detallado de algunos aspectos todavía indefinidos del proceso de regulación del volumen. Sin embargo lo que resulta claro es que los movimientos de  $\text{K}^+$  representan el paso regulador en el fenómeno y por lo tanto, cualquier intento destinado a hacer más eficiente el proceso regulador del volumen de las células nerviosas debe dirigirse a la modificación de estos flujos. Es por ello muy importante que los esfuerzos de investigación acerca del volumen celular en astrocitos se dirijan a la caracterización farmacológica y funcional de los canales de  $\text{K}^+$  así como a la identificación molecular de esta vía.

## REFERENCIAS

1. **Bender, A.S. and M.D. Norenberg.** Calcium Dependence of hyposmotically induced potassium release in cultured astrocytes. *J. Neurosci.* 14:4237-4243, 1994.
2. **Bertrand, D., Bader, C.R., Berheim, L., and Haimann, C.** Kna<sup>+</sup> A sodium-activated potassium current. *Pflügers Arch* 414 (suppl): S76-S79. 1989.
3. **Cala, P.M.** Volume regulation by red blood cells. Mechanism of ion transport. *Mol. Physiol* 4, 33, 1983.
4. **Chamberlin, M. E. and Strange, K.** Anisosmotic cell regulation: a comparative view. *Am. J. Physiol.* 257, C159, 1989
5. **Chan, P.H., and Fishman, R.A.** Elevation of rat brain aminoacids, ammonia and idiogenic osmoles induced by hyperosmolality. *Brain Res.* 161:293-301, 1979.
6. **Drejer, J; Honore, T y Shousboe, A.** Excitatory amino acid induced release of GABA from cultured mouse cerebral cortex interneurons. *J. Neurosci.* 7:2910-2923, 1987.
7. **Eveloff, S.L., Warnock, D.G.** Activation of ion transport systems during cell volume regulation. *Am. J. Physiol.* 252(Renal Fluid Electrolyte Physiol.21):F1-F10, 1987.
8. **Foskett, J.K., and Spring, K.R.** Involvement of calcium and cytoskeleton in gallbladder epithelial cell volume regulation. *Am. J. Physiol.* 248, C27, 1985.
9. **García, M.C., A.F. Díaz, R. Godínez and J. Sánchez.** Effect of sodium deprivation on contraction and charge movement on frog skeletal muscle fibers. *J. Muscle Res. Cell Motil.*

13:354-365, 1992.

10. **González, E., Sánchez-Olea, R. and Pasantes-Morales, H.** Inhibition by Cl channel blockers of the volume activated, diffusional mechanism of inositol transport in primary astrocytes in culture. *Neurochem. Res.* 20:895-900, 1995.
11. **Green, W.N. and O.S. Andersen.** Surface charges and ion channel function. *Ann. Rev. Physiol.* 53:341-359, 1991.
12. **Grynkiewicz, G., M. Poenie and R.Y. Tsien.** A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.*, 260, 3440-3445, 1985.
13. **Hirose M, S. Hashimoto, H. Nose, T. Morimoto, T Itoh, T. Natsuyama and Y. Tanaka.** Mechanism underlying the changes in plasma potassium concentration during infusion of isosmotic non electrolyte solution. *Anesthesiology* 77:336-344, 1992.
14. **Hallows, R.K. and Knauf, P.A.** Principles of cell volume regulation In:(StrangeK. ed.), Cellular and molecular physiology of cell volume regulation. *CRC Press USA.* 1994.
15. **Hoffman, E.K. Sjöholm, C. and Simonsen L.O.** Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> cotransport in Ehrlich ascites tumor cells activated during volume regulation (regulatory volume increase). *J. Membr. Biol.* 76,269, 1983.
16. **Hoffmann, E. K. and Simonsen, L. O.** Membrane mechanisms in volume and pH regulation in vertebrate cells. *Physiol. Rev.* 69:315-382, 1989.
17. **Know, M.H., and Handler, J.S.** Cell volume regulated transporters of compatible osmolytes. *Current Opinion in*

*Cell Biology* 7:465-471, 1995.

18. **Kuffler, S.W., J.G. Nicholls, and R.K. Orkand.** Physiological properties of glial cells in the central nervous system of amphibia. *J. Neurophysiol.* 29:768-787, 1966.
19. **Law, R.O., and M.B. Burg.** The role of organic osmolytes in the regulation of mammalian cell volume. In: *Advances in comparative and environmental physiology*, edited by R. Gilles, E.K. Hoffmann, and L. Bolis. Berlin: Springer-Verlag, vol. 9 pp 189-225, 1991.
20. **Macknight, A. D.C.** Principles of cell volume regulation. *Renal Physiol. Biochem* 3:114-141, 1988.
21. **Macknight, A. D.C. Gordon, L.G.M. and Purves, R.D.** Problems in the understanding of cell volume regulation. *The J. of Exp. Zool.* 268:80-89, 1994.
22. **MacManus, M.L. and Churchwell, K.B.** Clinical significance of cellular osmoregulation In:(Strange K. ed.), *Cellular and molecular physiology of cell volume regulation.* CRC Press USA. 1994.
23. **Mills, J.W., Schiewebert, E.M., and Staton, B.A.** The cytoskeleton and cell volume regulation. In (K. Strange, ed), *Cellular and Molecular physiology of cell volume regulation.* CRC Boca Ratón, F.L., U.S.A. pp 241-258, 1994.
24. **Moorman, J.R., Ackerman, S.J., Kowdley, G.C., Griffin, M.P., Monsey, J.P., Chen, Z., et al.** Unitary anion currents through phospholemman channel molecules. *Nature* 377:737-740, 1995.
25. **Morán, J., and A.J., Patel.** 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.

26. **Parker, J.C. MacManus, T.J. Starke, L.C. and Gitelman, H.J.** Coordinated regulation of  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange and  $[\text{K}^+-\text{Cl}^-]$  cotransport in dog red cells. *J. Gen. Physiol.* 96,1141, 1990.
27. **Pasantes-Morales, H; Alavez, S; Sanchez-Olea, R; Moran, J.** Contribution of organic and Inorganic Osmolytes to Volume Regulation in Rat Brain Cells in Culture. *Neurochemical Research.* 18:445-452, 1993.
28. **Pasantes-Morales, H., R.A. Murray, L. Lilja and J. Morán.** Regulatory volume decrease in cultured astrocytes: I. Potassium and chloride activated permeability. *Am. J. Physiol.* 266: C165-C171, 1994a.
29. **Pasantes-Morales, H., R.A. Murray, R. Sánchez-Olea and J.Morán.** Regulatory volume decrease in cultured astrocytes: II. Activated permeability to amino acids and polyalcohols. *Amer. J. Physiol.* 26:C172-C178, 1994b.
30. **Pasantes-Morales, H.** Volume regulation in brain cells: Cellular and molecular mechanisms. *Metabolic brain disease.* 11:3 187-204, 1996.
31. **Rapoport, R.M.** Regulation of vascular muscle contraction by extracellular Na. *Gen. Pharmacol.* 24, 531-537, 1993.
32. **Roy, G., Sauvé, R.** Effect of anisotonic media on volume, ion and aminoacid content membrane potential of kidney cells (MDCK) in culture. *J. Membr. Biol.* 100:83-96, 1987.

33. **Rudy, B.** K<sup>+</sup> Channels. 1988
34. **Sachin, H.** A stretch-activated K<sup>+</sup> channel sensitive to cell volume. *Proc Natl. Acad. Sci.* 86:1731-1735, 1989.
35. **Sackin, H.** Stretch-activated ion channels In:(Strange K. ed.), Cellular and mollecular physiology of cell volume regulation. *CRC Press USA.* 1994.
36. **Sánchez-Olea, R., J. Morán, A. Martínez and H. Pasantes-Morales.** Volume-activated Rb transport in astrocytes in culture. *Am. J. Physiol.* 33:C836-C842, 1993.
37. **Sánchez-Olea, R., M. Morales-Mulia, J. Morán and H. Pasantes-Morales.** Inhibition by dihydropyridines of regulatory volume decrease and osmolyte fluxes in cultured astrocytes is unrelated to extracellular calcium. *Neuroscience Lett.* 165-168, 1995.
38. **Sarkadi, B., Parker, J.C.** Activation of ion transport pathways changes in cell volume. *Biochem-Biophys. Acta* 1071:407-427, 1991.
39. **Spires S. and T. Begenisch.** Modulation of potassium channel gating by external divalent cations. *J. Gen. Physiol.* 104: 675-692, 1994.
40. **Strange, K., Morrison, R., Heilig, C. W., DiPietro, S., and Gullans, S.R.** Upregulation of inositol transport mediates inositol accumulation in hyperosmolar brain cells. *Amer. J. Physiol.* 260:C784-C790, 1991.
41. **Tratchmann, H., S. Futterweit, E. Hammer, T.W. Siegel, and P. Oates.** The role of polyols in cerebral cell volume regulation

in hypernatremic and hyponatremic states. *Life Sci.* 49:677-688, 1991.

42. Vitarella, D., DiRisio, D.J., Kimelberg, H.K., and Aschner, M. Potassium and taurine release are highly correlated with regulatory volume decrease in neonatal primary rat astrocyte cultures. *J. Neurochem.* 63:1143-1149, 1994.
43. Wong, S.M.E., Chase, H.S. Role of intracellular calcium in cellular volume regulation. *Am. J. Physiol.* 250:C841-C852, 1986.
44. Yancey, P.H. Compatible and counteractin solutes. In: (strange, K. ed.), Cellular and molecular physiology of cell volume regulation. CRC Press USA, 1994.